

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

ABORDAGEM DE ANÁLISE DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES

Autora: Daiane Paiva de Oliveira

PORTO ALEGRE

2015/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

ABORDAGEM DE ANÁLISE DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM CÃES

DAIANE PAIVA DE OLIVEIRA

**Trabalho de conclusão de
curso apresentado à
Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para
obtenção da Graduação em
Medicina Veterinária**

Orientador: Stella de Faria Valle

Co-Orientador: Juliana Pereira Matheus

PORTO ALEGRE

2015/2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por iluminar meu caminho e abençoar os meus sonhos.

Ao meu pai Elton Oliveira, por ser exemplo de força, dedicação e garra. Toda minha vontade de crescer é reflexo do homem que é.

Á minha mãe Solange Oliveira, por ser meu norte e estar comigo em todos os momentos, demonstrando amor e confiança. Tenho muito orgulho de ser filha de uma mulher tão guerreira, dedicada à família e de uma força absurda.

Á minha irmã Bianca Oliveira, por suportar todos os meus defeitos e, ainda assim, ser minha amiga em todas as horas.

Ao meu amor Ciro Martins, por ser meu braço direito, estar comigo em todos os momentos, me incentivando e amando. Por dividir uma vida comigo e me tornar todos os dias uma pessoa melhor.

A todos os demais familiares e amigos que sempre me apoiaram nesse caminho.

Á minha colega e amiga para vida Thaís Santin, por dividir estes longos 6 anos e tornar-los lindos. Com certeza essa jornada não teria sido a mesma se não estivéssemos juntas.

Á professora Stella de Faria Valle e a Juliana Pereira Matheus por acreditarem em mim e me apoiarem neste final de curso.

RESUMO

O líquido cefalorraquidiano é um fluido claro ou incolor e tem como função proteger, lubrificar e nutrir o sistema nervoso central e parte do sistema nervoso periférico. Entretanto, em condições patológicas, como isquemias, tumores ou infecções, sua homeostasia pode ser modificada, gerando alterações de características físicas, contagem de proteínas, celularidade e citologia. A análise laboratorial do líquido, associada ao exame clínico, permite a definição de diagnóstico neurológico e da conduta terapêutica, e pode consistir em uma avaliação microbiológica, bioquímica e citológica, avaliando aspectos físicos, químicos e ainda, diferenciais das células encontradas. Para isso é necessário que os veterinários conheçam e executem as técnicas de forma correta. Este trabalho objetiva fazer uma revisão sobre anatomia e fisiologia do líquido cefalorraquidiano e sobre a análise laboratorial, destacando as características de padrões fisiológicos do paciente hígido e as alterações decorrentes de processos patológicos, capazes de desestabilizar esta normalidade, afim de auxiliar o médico veterinário em sua rotina clínica.

Palavras chave: Líquor, diagnóstico complementar, análise laboratorial, metodologia, canino.

ABSTRACT

Cerebrospinal fluid is a clear or colorless fluid and its function is to protect, lubricate and nourish the central nervous system and of the peripheral nervous system. However, in pathological conditions such as ischemia, tumors or infections, its homeostasis can be modified, generating changes in physical characteristics, proteins count, cytology and cellularity. Laboratory analysis of cerebrospinal fluid associated with the clinical examination, allows the definition of neurological diagnosis and therapeutic management, and can consist of a microbiological, biochemical and cytological, assessing physical, chemical and yet, differentials found cells. This requires that veterinarians know and execute the techniques correctly. This work aims to make a review of anatomy and physiology of the cerebrospinal fluid and the laboratory analysis, highlighting the characteristics of physiological standards of healthy patient and the changes resulting from pathological processes, able to destabilize this normality in order to assist the veterinarian in your clinical routine.

Keywords: CSF, complementary diagnostic, laboratory analysis, methodology, canine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Localização anatômica da cisterna magna.....	15
Figura 2 -	Coleta de LCR por punção lombar.....	16
Figura 3 -	LCR turvo.....	18
Figura 4 -	LCR xantocrômico.....	18
Figura 5 -	Pleocitocise neutrofílica em um cão.....	24
Figura 6 -	Plecitose eosinofílica.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL -	Microlitros
BHE -	Barreira hemato-encefálica
BHLCR -	Barreira hematoliquórica
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
G -	Gauge
HEE -	Hematoxilina e eosina
Kg -	Kilograma
L4 -	4° vértebra lombar
L5 -	5° vértebra lombar
L6 -	6° vértebra lombar
LCR -	Líquido cefalorraquidiano
MEG -	Meningoencefalite granulomatosa
mm -	Milímetros
PCR -	Reação em cadeia polimerase
RNA -	Ácido ribonucléico
RT - PCR -	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SCN -	Sistema nervoso central
SNP -	Sistema nervoso periférico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Descoberta do líquido cefalorraquidiano (LCR)	10
2.2	Anatomia e proteções do SNC	11
2.3	Produção do LCR	11
2.4	Funções do LCR	12
3	COLETA DO LCR	13
3.1	Técnicas de Coleta	14
3.1.1	Cisterna Magna (atlanto-occipital).....	14
3.1.2	Cisterna Lombar.....	15
4	CARACTERÍSTICAS E ANÁLISE LABORATORIAL DO LCR	17
4.1	Técnicas de avaliação laboratorial	17
4.1.1	Avaliação física: coloração, turvação e coagulação.....	17
4.1.2	Avaliação quantitativa: proteína total.....	19
4.1.3	Contagem celular.....	20
4.1.4	Citodiagnóstico.....	21
4.1.5	Aspectos citológicos do LCR.....	21
5	CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO LCR PATOLÓGICO	23
5.1	Contagem de células e aspectos citológicos	23
5.1.1	Pleocitose neutrofilica.....	23
5.1.2	Pleocitose eosinofilica.....	24
5.1.3	Pleocitose mononuclear.....	25
5.1.4	Pleocitose mista.....	26
6	CONCLUSÃO	27
7	REFERENCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquor, é um fluido claro ou incolor e tem como funções proteger, lubrificar e nutrir o sistema nervoso central (SNC) e parte do sistema nervoso periférico (SNP) que, em condições patológicas, as suas características poderão estar modificadas.

O SNC fica envolto por ossos, dificultando um exame clínico completo, sendo necessário recorrer aos exames diagnósticos complementares como ressonância, tomografia e a colheita do líquor. Tendo em vista que os dois primeiros métodos diagnósticos são muito onerosos e nem sempre estão o alcance do médico veterinário ou das condições de investimento dos proprietários, a colheita e avaliação do líquor se torna um importante aliado para condução do caso clínico.

A análise laboratorial do LCR em cães objetiva auxiliar o diagnóstico de patologias, especialmente as que acometem o SNC. Apesar de não conclusiva, quando utilizada isoladamente, é uma ferramenta diagnóstica extremamente útil para direcionar o raciocínio do médico veterinário. Este exame consiste na avaliação física, bioquímica e citológica, sendo possível ainda realizar cultura de microorganismos, assim como algumas técnicas moleculares referência. Para tanto, o conhecimento acerca da fisiologia de formação, fluxo e absorção, técnicas de coleta, interpretação dos resultados, indicações e contraindicações é fundamental para realização de um exame adequado. Neste contexto, o presente trabalho busca abordar temas relacionados à anatomia e fisiologia do líquido cefalorraquidiano e sua análise laboratorial, destacando as características consideradas fisiológicas do paciente hígado e as alterações decorrentes de processos patológicos, capazes de desestabilizar esta normalidade, tendo como objetivo final auxiliar os médicos veterinários para a correta realização e interpretação deste exame, o qual poderá guiar uma adequada conduta clínica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A consideração a respeito da existência de um fluído na cavidade do sistema nervoso central (SNC) remonta do século XVII A.C., quando mencionado no Egito, por Edwin Smith, em suas primeiras descrições sobre as meninges. Esse fluído, o líquido cefalorraquidiano (LCR), é o produto tecidual do sistema nervoso central (SNC) mais facilmente acessível. É estéril, de aparência translúcida e límpida e serve de proteção e suporte para o SNC (De LAHUNTA, 2015).

2.1 Descoberta do líquido céfaloaraquidiano (LCR)

Até o século XVI, o LCR era conhecido como o "espírito animal" no interior dos ventrículos cerebrais. Sua correta localização cerebrospinal só foi adequadamente abordada três séculos mais tarde (HERBOWSKI, 2013). O primeiro relato anatômico do sistema ventricular foi feito por anatomistas egípcios e gregos, que descreveram a existência de um fluído (EDWIN et al., 1996). Baseado nas crenças de Hipócrates a partir de Kos (460-370 a.c.) e Cladius Galeno a partir de Pergamon (130-200 d.c.), o "espírito animal" localizado nos ventrículos cerebrais era responsável pelas funções mentais (WOOLLAM, 1957).

Em 1761, Domenico Cotugno, professor de anatomia da Universidade de Nápoles, demonstrou os ventrículos cerebrais e o espaço subaracnoide banhados por um fluído circulante e, posteriormente, líquido cefalorraquidiano. Segundo, esse professor, o espaço entre a dura-máter e a medula espinhal "era preenchido por com água, como a que está presente no pericárdio ao redor do coração ou como a que preenche os ventrículos cerebrais, labirinto da orelha ou outras cavidades do corpo, que são impermeáveis ao ar" (LONGATTI, 2008).

O primeiro relato de colheita de LCR através de drenagem por punção lombar, data do final do século XIX e foi descrito por Heinrich Quincke e após, por Walter Wynter, porém, nesses casos, todos os paciente vieram a óbito (PEARCE, 1994). A primeira indicação para método diagnóstico partiu do médico alemão Von Ziemssen, que em 1893 indicou a colheita do líquido para diagnosticar patologias como meningite e tuberculose. Foi, em 1895, corroborado por George Jacoby, que descreveu as primeiras considerações técnicas da colheita de líquido para análise em laboratório, e que atualmente ainda são levadas em consideração (WRIGHT et al., 2012).

2.2 Anatomia e proteções do SNC

As barreiras anatômicas e imunológicas mantêm a estabilidade do SNC, restringindo a entrada de patógenos, causadoras de danos ao parênquima cerebral e para tanto, o encéfalo e a medula espinhal são circundados por três membranas de tecido conjuntivo: as meninges, que se situam abaixo do periósteo dos ossos do crânio, classificadas, do exterior para o interior como: duramáter, aracnóide e pia-máter. Estas duas últimas são interligadas e por vezes denominadas pia-aracnóide ou leptomeninges (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). A produção do LCR é da responsabilidade de capilares sanguíneos localizados por todo o SNC e também da leptomeninge (KING, 2005; De LAHUNTA, 2015).

As trabéculas da aracnóide realizam ligações com a pia-mater, e os espaços intertrabeculares são designados por espaço subaracnóide, (KING, 2005; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008), local preenchido por grandes vasos, onde se encontra e para onde flui o LCR, que atua como um sistema hidráulico, protegendo o sistema nervoso central contra traumatismos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008; AKERS E DENBOW, 2013).

Em alguns pontos de sua extensão, o espaço subaracnóide, sofre alargamentos (cisternas) nos quais o LCR se acumula e pode ser colhido. Os dois espaços mais importantes são a cisterna cerebelo-medular e a cisterna lombar (KÖNIG et al., 2004). A aracnóide forma expansões que perfuram a dura-máter em direção aos seios venosos, onde terminam como dilatações fechadas, chamadas vilosidades aracnóides. Estas atuam transferindo o líquido para o sangue (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

O endotélio capilar do SNC não é fenestrado. A exceção é o plexo coróide, para garantir permeabilidade à produção do LCR. Os capilares fenestrados formam a barreira Hematoliquórica (BHLCR), enquanto que a barreira hemato-encefálica (BHE) é composta pelo endotélio capilar não fenestrado do SNC (FURR E ANDREWS, 2008; DAMKIER et al., 2010).

2.3 Produção do LCR

O LCR é formado, primariamente, pela ultrafiltração do plasma e secreção através dos plexos coróides dos ventrículos cerebrais, embora o líquido seja mais hipertônico do que o plasma e suas concentrações iônicas de sódio e potássio, cloro e bicarbonato sejam diferentes das concentrações de um ultrafiltrado plasmático (DAMKIER et al., 2010). Outros locais de secreção incluem o revestimento ependimário dos ventrículos e os vasos sanguíneos dos

espaços subaracnóideos e pia-máter. Estudos em cães demonstraram que 35% do LCR é derivado dos ventrículos laterais e terceiro ventrículo, 23% do quarto ventrículo e 42% do espaço subaracnóide (De LORENZI E MANDARA, 2011).

O LCR é produzido de forma constante, com variações entre espécies, mas estima-se sua taxa de produção no cão como aproximadamente 0,05 mililitro/minuto/grama (mL/min/g) (De LAHUNTA, 2015) e a sua secreção independe da pressão hidrostática dos vasos, mas depende do gradiente osmótico das movimentações iônicas, e assim, quaisquer substâncias que alterem a osmolaridade do LCR causam variações na taxa de produção deste (FURR E ANDREWS, 2008).

O equilíbrio entre produção, fluxo e absorção é essencial para manter o volume adequado de LCR no interior do SNC evitando o aparecimento de alterações patológicas, como a hidrocefalia (THOMAS, 2010).

2.4 Funções do LCR

O líquido exerce um papel de proteção, nutrição e suporte ao SNC. Protege o cérebro das mudanças de pressão decorrente da respiração, postura e exercícios, regula a variação normal da pressão intracraniana juntamente com o fluxo sanguíneo cerebral. A densidade e a pressão hidrostática garantem a proteção do SNC à traumatismos e choques, pois o parênquima flutua neste meio líquido. Ocorre uma redução de até trinta vezes do peso normal do cérebro, fazendo com que o impacto seja menos danoso (Di TERLIZZI E PLATT, 2006; ALMEIDA, 2013).

Alem disso, atua como um meio de transporte para nutrientes, metabólitos, neurotransmissores e substâncias neuroendócrinas, desempenhando um importante papel na manutenção do equilíbrio iônico (Di TERLIZZI E PLATT, 2006), fornecendo ainda, um ambiente iônico estável, fundamental para função neuronal, atuando como um tampão químico, e já que certas afecções que envolvem o SNC podem alterar a composição do LCR, uma das funções/aplicações clínicas da sua análise é indicar alterações patológicas, daí a importância da realização da sua colheita (De LAHUNTA, 2015).

3 COLETA DO LCR

A colheita do LCR é indicada para pacientes com sinais neurológicos periféricos ou centrais, ou por suspeitas inflamatórias, infecciosas, traumáticas, neoplásicas ou degenerativas (Di TERLIZZI E PLATT, 2009; LUCAS et al., 2008; DEWEY E DUCOTÉ, 2008). Da mesma forma, a contra-indicação se dá à pacientes que não estão aptos a receber anestesia, assim como, àqueles pacientes com pressão intracraniana elevada, pelo risco de herniação cerebral ou cerebelar (LORENZ et al., 2011; FREEMAN, 2005). Segundo Wood et al. (2012) outros fatos que impedem a colheita são, evidências de coagulopatias, instabilidade ou patologia no local da colheita (instabilidade atlanto axial, por exemplo), hidrocefalia severa, trauma craniano recente e lesão intracraniana extensa.

Os dois principais locais de punção, em cães e gatos, são: a cisterna magna e a região lombar, entre L5 e L6. Deve-se levar em consideração o local suspeito de lesão, puncionado o mais próximo possível e sempre caudalmente a este ponto (FITZMAURICE, 2011b). O espaço lombar gera uma maior dificuldade à colheita, pois há uma menor concentração de LCR, além de ocorrerem maiores taxas de contaminação por sangue (ELIAS E BROWN, 2008).

Para realização da colheita é necessário que o paciente esteja sob efeito de anestesia geral, para correta imobilização, visto que a movimentação da agulha pode causar danos, por vezes irreversíveis e também, redução do desconforto da punção. O local de colheita deve ser tricotomizado e assepticamente preparado (Di TERLIZZI E PLATT, 2009; FREEMAN, 2005).

O volume de líquido coletado, em quantidades seguras, varia com o porte do paciente (TAYLOR, 2010). Podem ser retirados com segurança, de 1 a 2 mL de LCR, sem que para isso se faça aspiração (pressão negativa), já que isto aumenta o risco de dano celular e hemorragia, hérnia, coma e até óbito do paciente (WAMSLEY E ALLEMAN, 2004). Segundo Freeman (2005), a colheita de 1mL a cada 30 segundos se faz segura, embora, geralmente, não se obtém mais do que 1mL para cada 5kg de peso vivo (CARMICHAEL, 1998, FREEMAN, 2005).

Os materiais utilizados para o procedimento incluem, agulha raquidiana com mandril, tubo com EDTA, tubo estéril e um frasco sem adição de anticoagulante (LUCAS et al, 2008). A escolha da agulha varia com o tamanho e peso do paciente. Em geral, para a maior parte dos cães, são usadas agulhas com mandril de cerca de 40 milímetros (mm) de comprimento e 20 a 22 gauge (G). Pode ser necessário utilizar agulhas entre 50 e 90 mm para cães com peso

superior a 25 kg, de raças gigantes ou animais obesos de raças médias. Para cães com peso inferior a 8 Kg recomenda-se a utilização de catéteres venosos com 15 mm de 22 G (DESNOYERS et al., 2008; FREEMAN, 2005).

3.1 Técnicas de Coleta

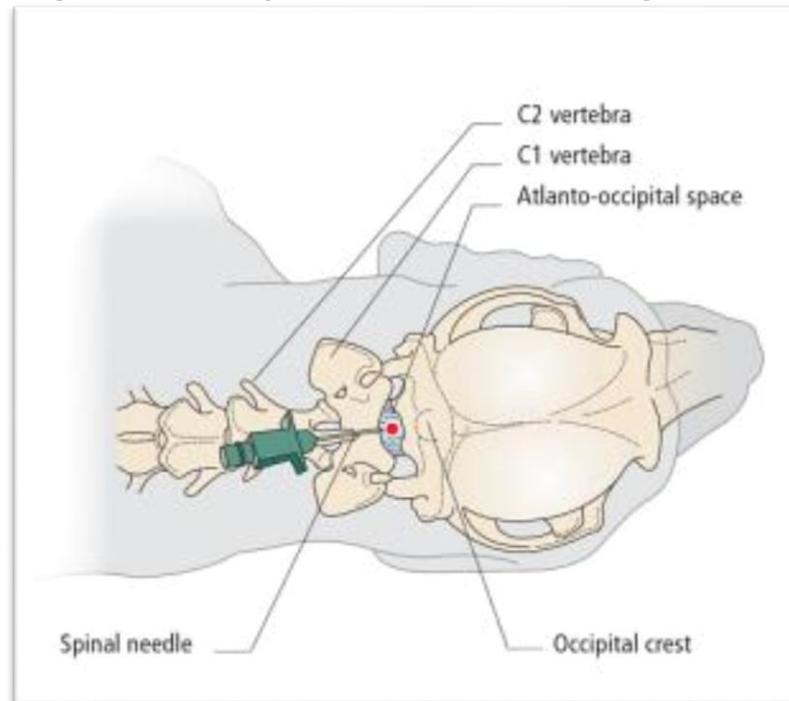
O líquido pode ser colhido tanto da cisterna magna quanto da lombar, na região entre a 5^o e 6^o vértebras lombares. A coleta na cisterna magna é preferida nos casos de lesões localizadas acima do forame magno e da extremidade rostral da medula espinhal craniocervical (DESNOYERS et al., 2008) ou quando os sinais clínicos envolvem convulsões, incoordenação generalizada, inclinação de cabeça (head tilt) ou andar em círculos (FREEMAN, 2005). Já para lesões mais caudais, com alteração medular, a colheita deve ser realizada na cisterna lombar (DESNOYERS et al., 2008; FREEMAN, 2005).

3.1.1 Cisterna Magna (atlanto-occipital)

A colheita na cisterna magna é mais fácil e apresenta menor risco de contaminação por sangue periférico. Deve-se flexionar o pescoço do paciente já em decúbito lateral, formando um ângulo de 90° em relação a coluna vertebral e manter o focinho paralelo à mesa (FREEMAN, 2005). A agulha deve ser inserida no ponto de intersecção da linha horizontal, entre a protuberância occipital e o processo espinhoso do eixo, e a linha vertical, que se estende ao longo dos bordos craniais das asas do atlas (WOOD et al., 2012).

A agulha deve penetrar através da pele no ponto indicado (Figura 1) e o mandril retirado.

Figura 1: Localização anatômica da cisterna magna.



Fonte: Platt E Garosi, 2012. p. 122.

Deve-se continuar a introdução da agulha, devagar e cuidadosamente, até que se sinta uma diminuição da resistência e se observe o LCR fluir no centro da agulha, sinal de que o espaço subaracnóide foi atingido (WOOD et al, 2012; FREEMAN, 2005). O líquido deve fluir livremente e nunca ser aspirado com seringa, pois aumenta o risco de herniação. O fluxo pode ser aumentado por meio de compressão jugular (FREEMAN, 2005).

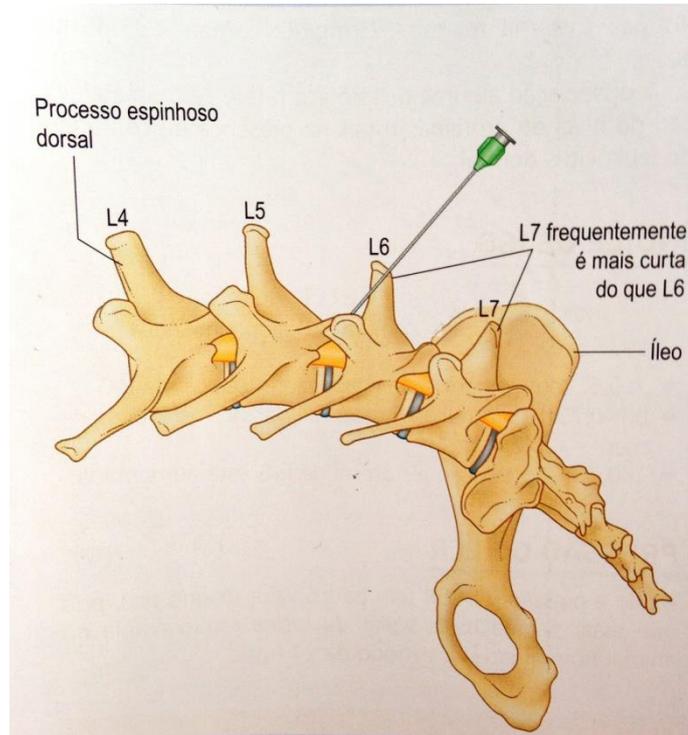
3.1.2 Cisterna Lombar

A punção lombar é mais difícil e apresenta maior risco de contaminação por sangue, do que a cisterna magna. Geralmente colhe-se no espaço entre L5 e L6, mas também pode-se colher entre L4 e L5. A coleta pode ser realizada tanto em decúbito lateral quanto ventral, de acordo com a preferência do profissional que irá realizar o procedimento (ADAMO, 2010; FITZMAURICE, 2011b).

O ponto de inserção da agulha é definido palpando a borda cranial das assas do íleo e o processo espinhoso de L6. Essa deve ser inserida no espaço cranial à L6 em um ângulo de 45° (Figura 2), em direção ventrocranial, até o espaço subaracnóide. Na punção lombar o líquido flui mais lentamente (ADAMO, 2010; FITZMAURICE, 2011b). Caso não haja saída de LCR pode-se proceder à ligeira e cuidadosa rotação da agulha e/ou remover por alguns milímetros até que se veja o LCR fluindo. 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 magna. Entretanto, o fluxo pode ser aumentado com compressão jugular (FREEMAN, 2005; Di TERLIZZI E PLATT, 2009).

Figura 2: Coleta de LCR por punção lombar.



Fonte: Fitzmaurice, 2011b. p 313.

4 CARACTERÍSTICAS E ANÁLISE LABORATORIAL DO LCR

As fases de colheita, transporte, armazenamento e preparo da amostra são muito importantes para garantir resultados confiáveis das análises realizadas. Fatores como contaminação, temperatura, tempo de estocagem e condições de realização do exame são fundamentais (DIMAS E SOHLER, 2008).

A análise laboratorial deve ocorrer entre 30 a 60 minutos após a colheita (FRY et al., 2006; FREEMAN, 2005), já que o ambiente líquido propicia rápida lise celular em função de sua concentração proteica reduzida. Quando um maior tempo entre colheita e análise for necessário, pode-se adicionar uma gota de formalina 10% em 1 a 2mL de LCR, para preservação celular (De LORENZI E MANDARA, 2011).

O volume necessário varia de 1 a 2mL tanto para cães quanto para gatos. Para contagem de células uma amostra de 0,5mL é suficiente, mas para mensuração da proteína o volume dependerá do equipamento e método utilizado, geralmente sendo necessários de 200 a 250 microlitros (μL) de amostra. Para citologia e/ou outros testes um volume de 0,25 a 0,5mL deve ficar disponível (De LORENZI E MANDARA, 2011).

4.1 Técnicas de avaliação laboratorial

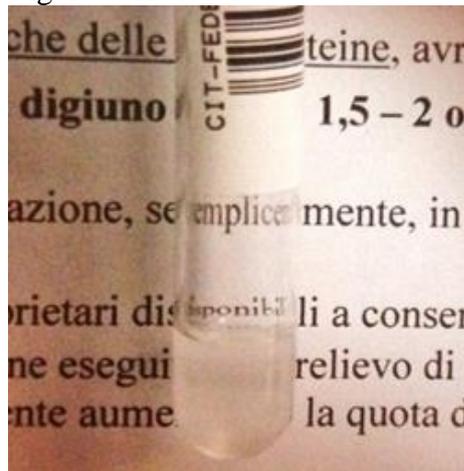
A análise laboratorial do LCR deve incluir: avaliação física e macroscópica, contagem de células, determinação do teor proteico e avaliação citológica (FREEMAN, 2005).

4.1.1 Avaliação física: coloração, turvação e coagulação

O LCR do paciente saudável é fluido e não coagula, tendo aspecto aquoso. Sua viscosidade pode aumentar, ainda que raro, pode coagular, devido a um grande aumento da proteína total, fibrinogênio reativo das meninges, por exemplo (DUCOTÉ E DEWEY, 2008).

Sua principal característica física é o aspecto límpido, incolor e transparente. A presença de qualquer alteração de coloração e turvação são consideradas alterações significativas. A turbidez ocorre quando a contagem de células nucleadas ultrapassa 500 células/ μL , ou > 200 leucócitos/ μL ou 700 eritrócitos/ μL . Sua graduação é avaliada através da habilidade de ler palavras impressas através do tubo (Figura 3) e varia de discreta, moderada a marcada (DESNOYERS et al., 2008.; De LORENZI E MANDARA, 2011).

Figura 3: LCR turvo.



Fonte: De LORENZI E MANDARA, 2011. p.330.

LCR com cor vermelha ou rosa sugerem presença de sangue, devendo haver distinção entre hemorragias iatrogênicas (devido à colheita) e hemorragias patológicas, centrifugando a amostra: na presença de um sobrenadante incolor sobre um sedimento celular vermelho, a alteração de cor é consequência de eritrócitos intactos por contaminação iatrogênica ou hemorragia no espaço subaracnóide recente (poucas horas). A cor vermelha ou amarelada indica hemorragia crônica. A xantocromia (Figura 4) (coloração amarela/alaranjada) indica presença de acúmulo de oxihemoglobina ou metahemoglobina, devido a degradação dos eritrócitos geralmente resultante de hemorragia crônica (até 10h antes da colheita), mas também pode ocorrer em casos de hiperbilirrubinemia (Di TERLIZZI E PLATT, 2009).

Figura 4: LCR de aspecto xantocrômico.



Fonte: De LORENZI E MANDARA, 2011. p.330.

Outras cores descritas, embora raras, são amarelo/esverdeado, devido à elevação na concentração de células nucleadas relacionadas a inflamações purulentas ou neoplasias. Pode ainda apresentar-se de cor cinzento/preto por grânulos de melanina, ou até mesmo melanócitos, (KIM et al., 2009).

4.1.2 Avaliação quantitativa: proteína total

A concentração proteica do LCR é extremamente baixa quando comparada ao plasma, sendo cerca de 0,5% da concentração de proteínas totais do sangue. No LCR normal, cerca de 90% da proteína presente é representada pela albumina (Di TERLIZZI E PLATT, 2009; ALMEIDA, 2013).

Os valores de referência variam de acordo com o local de colheita. Para cisterna magna o valor indicado usualmente é de <30 mg/dL e para lombar é de <45 mg/dL (De LORENZI E MANDARA, 2011). Alguns autores acreditam que esta variação ocorra devido a circulação mais lenta do líquido na região lombar, havendo um acúmulo de proteínas, ou que a barreira hemato-líquórica seja mais permeável às proteínas nesta região (Di TERLIZZI E PLATT, 2009).

A mensuração proteica através do uso de refratometria ou por técnicas bioquímicas convencionais não fornecem uma avaliação precisa, devido à baixa concentração de proteínas no líquido (DESNOYERS et al., 2008; De LORENZI E MANDARA, 2011). Entretanto, o corante Vermelho de Pirogalol (Sensiprot®) é um método que utiliza-se de refratometria e possui elevada sensibilidade, detectando concentrações tão pequenas quanto 2mg/dL (FALCÃO, 2008), sendo indicado para mensuração proteica do LCR (GAMA *et al.*, 2005). Além disso, a concentração pode ser obtida através da utilização de tiras de análise de urina, na qual somente albumina é detectada e os valores indicados como traços até 1+ são considerados normais (DESNOYERS et al., 2008).

As globulinas compõem a fração proteica mais importante a ser mensurada em uma análise de LCR. A técnica mais utilizada para esta determinação é método de Pandy, que consiste na mistura de LCR (sem contaminação sanguínea) com fenol. Em um tubo de ensaio, cerca de 1 mL do reagente de Pandy é misturado a duas ou três gotas de LCR. Se houver, nessa amostra, uma concentração de globulinas superior ao normal, a reação irá resultar no aparecimento de filamentos ou estruturas floculares brancas. O resultado é dado numa escala de 0 a 4+ de acordo com a quantidade de flocos resultantes, sendo “0” a normalidade

(RAKICH E LATIMER, 2003). O teste de Pandy tem sua utilização limitada devido à ausência de especificidade (De LORENZI E MANDARA, 2011).

A elevação de proteínas no LCR pode ocorrer juntamente ao aumento de células nucleadas, com ou sem alterações citológicas, ou pode ocorrer isoladamente, sendo denominada "dissociação albumino-citológica" (De LORENZI E MANDARA, 2011). Altos níveis de proteína e alterações celulares podem estar associados a doenças inflamatórias, degenerativas, compressivas ou neoplásicas (CARMICHAEL, 1998), havendo associação com encefalomielite viral não supurativa, algumas neoplasias, lesões agudas ou compressivas da medula espinhal, mielopatias isquêmicas, atividade pós-convulsão, febre, mielomalácia e meningoencefalomielite granulomatosa (MEG) (De LORENZI E MANDARA, 2011; CLEMMONS, 1991).

4.1.3 Contagem celular

A técnica utilizando hemocítmetro (câmara de Neubauer) ainda é considerada padrão ouro para contagem de eritrócitos e células nucleadas (DESNOYERS et al., 2008; De LORENZI E MANDARA, 2011; Di TERLIZZI E PLATT, 2009), embora esteja propensa a imprecisão dos resultados (BECKER, BAUER E MORITZ, 2008). Estudos avaliando esse método revelaram moderada correlação com a técnica tradicional para leucócitos, excelente correlação com eritrócitos e grande variação no diferencial celular (LORENZI E MANDARA, 2011). A utilização de técnicas automatizadas parece oferecer maior precisão nos resultados. No estudo de Becker, Bauer e Moritz (2008), avaliando a contagem e diferenciação celular usando o ADVIA 2120 (Siemens Medical Solution), foi demonstrada uma precisão equivalente ou superior aos métodos manuais para contagem de células nucleadas totais e eritrócitos. Embora existam algumas limitações para contagem de monócitos e para amostras com pleocitose leve (BECKER, BAUER E MORITZ, 2008).

Para contagem em câmara de Neubauer, o LCR não diluído deve ser colocado nas duas câmaras do hemocítmetro, acondicionado por 10 a 15 minutos em câmara úmida, facilitando a adesão das células ao vidro (De LORENZI E MANDARA, 2011; Di TERLIZZI E PLATT, 2009). Eritrócitos e células nucleadas são contabilizados separadamente, nos nove quadrantes da câmara (DESNOYERS et al., 2008). No cão, o valor de referência para eritrócitos é zero, embora possam ser identificados em baixa quantidade nos casos de contaminação iatrogênica por sangue e o número de células nucleadas deve ser menor que 6

células/ μ L (DESNOYERS et al., 2008; Di TERLIZZI E PLATT, 2009; De LORENZI E MANDARA, 2011).

A diferenciação entre leucócitos e eritrócitos deve ser feita com cautela e cuidado, pois leucócitos pequenos podem facilmente ser confundidos com eritrócitos. Para facilitar essa diferenciação pode-se utilizar o corante Azul de Metileno, com o qual os leucócitos apresentam-se azulados e os eritrócitos permanecem sem coloração (DESNOYERS et al, 2008).

Anormalidades celulares podem estar presentes mesmo sem elevação do número de células nucleadas, portanto a avaliação morfológica é indispensável em todos os casos (De LORENZI E MANDARA, 2011).

4.1.4 Citodiagnóstico

O LCR apresenta normalmente baixa celularidade, sendo necessária a utilização de técnicas de concentração celular. A citocentrifugação, sedimentação ou técnicas de filtração em membrana podem ser usadas para este fim (DESNOYERS et al., 2008; De LORENZI E MANDARA, 2011)

A citocentrifugação utiliza-se de uma baixa velocidade de aceleração e centrifugação para concentrar as células em uma pequena área circular na lâmina de vidro (Di TERLIZZI E PLATT, 2009). As células apresentam-se dispersas sobre a lâmina, fornecendo uma imagem com maior detalhamento e melhor preservação morfológica. Entretanto, alterações estruturais e aumento de vacuolização podem ocorrer em células mononucleares grandes (monocitóides) e macrófagos, em decorrência do processamento da amostra (Di TERLIZZI E PLATT, 2009).

As técnicas de coloração tanto para preparações por citocentrifugação quanto por sedimentação utilizam corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido, Diff-Quick, MayGrunwald-Geimsa, Wright's, Giemsa, ou associações). Para as preparações por filtração em membrana as colorações indicadas são Papanicolau ou hematoxilina e eosina (HEE). Em alguns casos, são indicadas colorações especiais (MARCOS E SANTOS, 2011; De LORENZI E MANDARA, 2011).

4.1.5 Aspectos citológicos do LCR

É realizado o diferencial de células nucleadas, assim como avaliadas suas morfologias, de acordo com a dimensão, aparência e taxa de mitose. O LCR dos cães saudáveis é composto

predominantemente por linfócitos e células monocitóides (FREEMAN, 2005). O tipo celular predominante é mononuclear, por vezes com presença de neutrófilos (DUCOTÉ E DEWEY, 2008; MARCOS E SANTOS, 2011). A presença de neutrófilos ou eosinófilos é considerada normal quando não ultrapassarem 10% e 1%, respectivamente, do total de células nucleadas. Poucos neutrófilos degenerados, células do plexo coróide, ependimárias ou do revestimento meníngeo, assim como figuras mitóticas podem ser vistas ocasionalmente no LCR normal (De LORENZI E MANDARA, 2011; FREEMAN, 2005).

5 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS DO LCR PATOLÓGICO

A ausência de alterações líquóricas não descarta doença de fundo neurológico (FREEMAN, 2005). Se o volume de LCR é limitado, a contagem total e diferencial de células deve ser a prioridade (PARENT, 1999).

Casos como epilepsia idiopática, hidrocefalia congênita, intoxicação, distúrbios metabólicos ou funcionais e doenças vertebrais, geralmente não apresentam alterações na análise (De LORENZI E MANDARA, 2011). Portanto é fundamental obter anamnese detalhada, exames físico e neurológico completos e, quando possível, exames de imagem, para a correta interpretação dos achados no líquido (CHRISMAN, 1992).

5.1 Contagem de células e aspectos citológicos

A contagem de células nucleadas totais pode estar dentro do seu padrão de referência, e após centrifugação, revelar elevação de neutrófilos ou eosinófilos. Para ambas as células, este aumento é considerado anormal quando não há contaminação por sangue. No caso dos neutrófilos, porcentagens acima de 10 a 20% podem indicar inflamação discreta ou inicial, lesões sem contato com meninges ou células ependimárias, ou uso prévio de glicocorticóides e antibióticos (De LORENZI E MANDARA, 2011).

Já para os eosinófilos, com porcentagens acima de 1% pode indicar migração parasitária ou doenças causadas por protozoários (DESNOYERS et al., 2008). Através da análise citológica, pode-se também constatar a presença de contaminação sanguínea iatrogênica, quando são visíveis plaquetas, estando contudo a eritrofagocitose ausente (RAKICH E LATIMER, 2003).

O aumento das células nucleadas no LCR, denominado pleocitose, pode ser considerado discreto (6 a 50 células/ μ L), moderado (51 a 200 células/ μ L) ou marcado (>200 células/ μ L) e pode ser definida pelo tipo celular predominante, ou seja, neutrofílica, eosinofílica, mononuclear ou mista. Os graus de pleocitose variam com a causa, severidade e localização da lesão (COOK E DENICOLA, 1988).

5.1.1 Pleocitose neutrofílica

A pleocitose neutrofílica (Figura 5) é definida quando se observa $>50\%$ de neutrófilos e pode ser de origem infecciosa ou não infecciosa (DESNOYERS et al., 2008).

Essa alteração está associada à trauma, meningite asséptica pós-mielografia, mielopatia embólica fibrocartilaginosa, mielomalácia, hemorragia, neoplasia e meningite micótica ou bacteriana (De LORENZI E MANDARA, 2011). Nos casos marcantes é mais associada a meningoencefalite bacteriana ou fúngica, neoplásica, meningite responsiva a esteróides ou vasculite necrosante (De LORENZI E MANDARA, 2011).

Figura 5: Pleocitose neutrofílica em um cão.

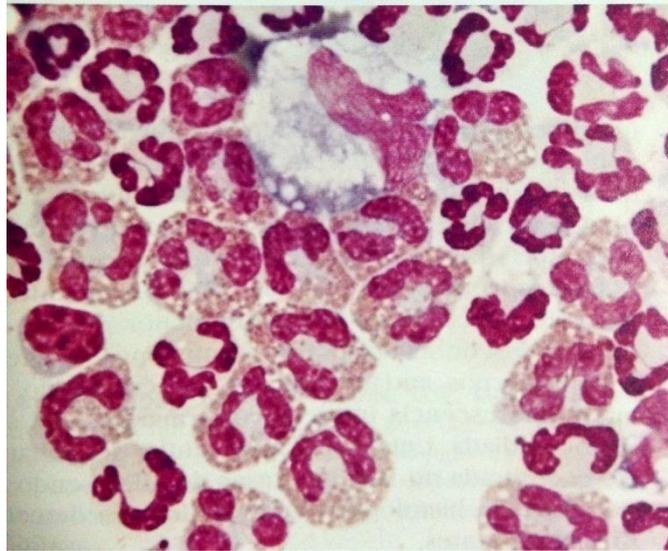


Fonte: De LORENZI E MANDARA, 2011. p.336.

5.1.2 Pleocitose eosinofílica

A pleocitose eosinofílica é rara e ocorre quando se observa >20% de eosinófilos (DESNOYERS et al., 2008) (Figura 6).

Figura 6: Pleocitose eosinofílica.



Fonte: De LORENZI E MANDARA, 2011. p. 339.

Esse tipo de alteração pode estar relacionada com resposta inflamatória aguda não específica, hipersensibilidade, neoplasias, parasitismo e infecções por protozoários (De LORENZI E MANDARA, 2011). A meningite eosinofílica responsiva a esteróides também tem sido relatada, sendo a raça Golden Retriever predisposta à alteração. Nesse caso observa-se >80% de eosinófilos, com pleocitose discreta a marcada, sem evidências de infecção por protozoários, parasitas ou fungos (De LORENZI E MANDARA, 2011).

5.1.3 Pleocitose mononuclear

Este tipo de pleocitose é característica de infecções virais (cinomose e raiva, por exemplo), podendo ser também observada em infecções protozoárias ou fúngicas, uremias, hérnias discais ou malformações e instabilidades vertebrais, intoxicação, reação vacinal, discoespondilite, encefalite necrosante, meningoencefalomielite responsiva a esteróides, erliquiose e neoplasias. Além disso, em condições de hemorragias pode-se encontrar macrófagos espumosos (GAROSI et al., 2010; De LORENZI E MANDARA, 2011).

A citologia do LCR pode ser diagnóstica de neoplasias, identificando células esfoliadas a partir de tumores primários (astrocitoma, papiloma de plexo coróide, ependimomas, meningioma e oligodendroglioma) ou metastáticos. Entretanto, há evidências de que em tumores primários as células tumorais não sejam visualizadas (BEHLING-KELLY et al., 2010). observando-se células linfóides grandes junto com uma população de linfócitos normais, no caso de linfomas. São células linfoblásticas, facilmente reconhecidas por seu

núcleo, rico em cromatina condensada, nucléolo proeminente e ruptura da membrana nuclear (DUCOTÉ E DEWEY, 2008). Em algumas afecções do SNC, monócitos são ativados e transformados em macrófagos, que representam uma reação inespecífica à inflamação ou hemorragia.

5.1.4 Pleocitose mista

A pleocitose mista é classificada quando nenhum tipo de células atingir 85% das células nucleadas totais. Registra-se um tipo celular predominante quando esse ultrapassar 50% da população total (BOHN et al. 2006). Pode estar relacionada a diversas doenças, dentre elas, MEG, cinomose, meningoencefalite responsiva a esteróides, toxoplasmose, doença de disco degenerativa, isquemia e neoplasia (De LORENZI E MANDARA, 2011). Também são observadas em quadros de infecções fúngicas (Criptococose, Blastomicose e Aspergilose), em toxoplasmose e neosporose, erlichiose e histoplasmose (WOOD et al., 2012). No estudo de Bohn et al. (2006), os cães com doença do disco intervertebral apresentaram pleocitose mista com predomínio de neutrófilos e, um cão, com hidrocefalia e herniação de tronco cerebral apresentou pleocitose mista com predomínio de linfócitos.

6 CONCLUSÃO

A análise do líquido cefalorraquidiano é um importante componente para o diagnóstico das afecções neurológicas e vem sendo usada desde o final do século XIX. Entretanto sua interpretação deve estar assegurada em sinais clínicos, exame neurológico e demais exames complementares. Para que seja confiável, esta análise deve ser feita de maneira correta e para isso, profissionais envolvidos devem ter conhecimento das técnicas e sua forma correta de execução. Ainda assim, mesmo não fornecendo um diagnóstico definitivo, a colheita de líquido não deve ser desconsiderada, pois tem o potencial de excluir possível suspeita e direcionar o médico veterinário a um diagnóstico definitivo.

REFERÊNCIAS

- ADAMO P.F. Cerebrospinal Fluid Collection, Myelography, Epidurography, and Discography. *In*: ETTINGER, S.J; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia: Saunders, 2010, cap. 117, p. 447–450.
- AKERS, M.R.; DENBOW, M.D. Central Nervous System. *In*: _____. **ANATOMY AND PHYSIOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS**. 2 ed. Wiley Blackwell, 2013, cap. 9, p. 241-264.
- ALMEIDA, F. F. A Importância Clínica da Análise do Líquido Cefalorraquidiano para o Diagnóstico de Afeções do Sistema Nervoso Central do Cão. 2013. 110f. **Dissertação** - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2013.
- BECKER, M.; BAUER, N.; MORITZ, A. Automated Flow Cytometric Cell Count and Differentiation of Canine Cerebrospinal Fluid Cells Using the ADVIA 2120. **Veterinary Clinical Pathology**. 2008. p. 344-352.
- BEHLING-KELLY, E., et al. Neoplastic Pleocytosis in a Dog With Metastatic Mammary Carcinoma and Meningeal Carcinomatosis. **Veterinary Clinical Pathology**. 2010. p. 247-252.
- BOHN, A.A. et al. Cerebrospinal Fluid Analysis and Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Neurologic Disease in Dogs: A Retrospective Study. **Veterinary Clinical Pathology**. 2006. v. 35, n. 3, p. 315-320.
- CARMICHAEL, N. Nervous System. *In*: DAVIDSON, M., ELSE, R., LUMSDEN, J. **Manual os Small Animal Clinical Pathology**. Cheltenham: British Small Animal Veterinary Association. 1998. p. 235-240.
- CHRISMAN, C.L. Cerebrospinal Fluid Analysis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. 1992, p.781-810.
- CLEMMONS, R. M. Therapeutic considerations of Degenerative Myelopathy of German Shepherds. **New Orleans, Proceedings of the 9th ACVIM Forum**, 1991, p. 773-775.
- COOK, J. R. JR.; DENICOLA, D.B. Cerebrospinal fluid. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, 1988, p. 475-499.
- DAMKIER, H. H.; BROWN, P. D.; PRAETORIUS, J. Epithelial Pathways in Choroid Plexus Electrolyte Transport. **Physiology**, 2010, v.25, p. 239-249.
- DE LAHUNTA, A. et al. Cerebrospinal fluid and Hydrocephalus. *In*: _____. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 4. ed. Canada: Elsevier, 2015b, cap 4, p. 78-101.
- DE LORENZI D.; MANDARA M. T. *In*: RASKIN, R. E; MEYER D. J. **Citologia Clínica de Cães e Gatos: Atlas Colorido e Guia de Interpretação**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, cap. 14, p 325-365.

DESNOYERS *et al.* Cerebrospinal Fluid Analysis. *In: COWELL et al. Diagnostic Cytology and Hematology of The Dog and Cat.* 3 ed. Elsevier. 2008, cap 14, p. 215-234.

DEWEY, C. W.; DUCOTÉ, J. M. Neurodiagnostics. *In: _____*. **A Practical Guide to Canine and Feline Neurology.** 2ed. Blackwell Publishing 2008, cap. 4, p. 75-114.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. R. The Function, Composition and Analysis of Cerebrospinal Fluid in Companion Animals: Part II - Analysis. **The Veterinary Journal**, 2009, p. 15-32.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. R. The Function, Composition and Analysis of Cerebrospinal Fluid in Companion Animals: Part I - Function and Composition. **The Veterinary Journal**, 2006, p. 422-431.

DIMAS, L.F; SOHLER, M.P. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2008, v 44, p. 97-106.

EDWIN C., DEWHURST K. AND AMINOFF M. J. Transition: The ventricles. *In: An Illustrated History Of Brain Function: Imaging the Brain from Antiquity to the Present.* 2 e.d. San Francisco: Norman Publishing, 1996, cap 4, p. 54-58.

ELIAS, A.; BROWN, C. Cerebellomedullary Cerebrospinal Fluid Collection in the Dog. **Lab Animal - Clinical Techniques**, 2008, v 37, p. 457 - 458.

FALCÃO, M. S. A. **Proteinograma do Humor Aquoso de Cães (*Canis familiares - LINNAEUS, 1758*) Clinicamente Saudáveis.** 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2008.

FITZMAURICE, S. N.; Coleta de LCR. *In: _____*. **Neurologia em Pequenos Animais.** 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011b, Apêndice 3, p.310-311.

FITZMAURICE, S. N.; Líquido Cefalorraquidiano e o Sistema Ventricular. *In: _____*. **Neurologia em Pequenos Animais.** 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011a, Apêndice 2, p.310-311.

FREEMAN, K. Laboratory Evaluation of Cerebrospinal Fluid. *In: VILLIERS, E.; BLACKWOOD, L. BSAVA Manual of Canine and Feline of Clinical Pathology.* 2ed. BSAVA. 2005, cap. 23, p. 373-380.

FRY, M. M., VERNAU, W., KASS, P. H.; VERNAU, K. M. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. **Veterinary clinical pathology**, 2006, v 35, p. 72-77.

FURR, M.; ANDREWS, F.; Cerebrospinal Fluid and the Blood-Brain Barrier. *In: FURR, M.; REED, S. Equine Neurology.* Oxford: Blackwell Publishing, 2008, v. 1, cap. 2, p. 33-46.

GAMA, F.G. V., NISHIMORI, C. T., SOBREIRA, M. R., SANTANA, A. E. Características Físico-químicas e Citológicas do Líquor de cães em Diferentes Fases da Cinomose. **Ciência Rural**, v. 35, n.3, p. 596-601, 2005.

HERBOWSKI, L. The Maze of the Cerebrospinal Fluid Discovery. **Hindawi Publishing Corporation, Anatomy Research International**, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. *In: _____*. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2012, cap. 9, p. 153-181.

KÖNIG, E.H.; LIEBICH, G.H.; CERVENY,C. Nervous system. *In: _____*. **Veterinary Anatomy of Domestic Mammals**. Stuttgart: Schattauer, 2004, cap. 14, p. 465-536.

LORENZ, M. D.; COATES, J. R.; KENT, M. Confirming a Diagnosis. *In: _____*. **Handbook of a Veterinary Neurology**. 5 ed. St. Louis: Elsevier. 2011, cap. 4, p. 75-92.

LUCAS, R. A. P.; GODOY, R. C.; SACCO, S. R. Análise de Líquido Cefalorraquidiano em Pequenos Animais. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2008, no. 11.

MARCOS, R.; SANTOS, M. Líquido Cefalorraquidiano. *In: PALETEIRO, M. C.; MARCOS, R.; SANTOS, M.; CORREIRA, J., PISSARRA, H.; CARVALHO, T. Atlas de Citologia Veterinária*. Portugal: Lidel. 2011, cap.12, p. 249-261.

PEARCE, J.M. Walter Essex Wynter, Quincke and Lumbar Puncture. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 57, p. 179, 1994.

RAKICH, P. M.; LATIMER, K. S. Cytology. *In: LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; J. R.. Presse, Duncan & Prasse's Veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. 4^a ed. Iowa, USA. 2003, p. 304-330.

TAYLOR, S. M. Exame Diagnóstico do Sistema Neuromuscular. *In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010, cap 64, p. 1009-1020.

THOMAS, W. B. Hydrocephalus in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America-Small Animals Practice**, 2010, v40, p. 143-159.

WAMSLEY, H.; ALLEMAN, A. R. Clinical pathology. *In: PLATT, R. S.; OLBY, N. J. BSAVA manual of canine and feline neurology*. 3^a ed, pp. 2004, p. 42 - 53.

WOOD, A.; GAROSI, A.; PLATT, S. Cerebrospinal Fluid Analysis. *In: PLATT,S; GAROSI, A. Small Animal Neurological Emergencies*. London: Manson Publishing. 2012, cap 5, p. 121-136.

WOOLLAM, DAVID H. M. The Historical Significance of the Cerebrospinal Fluid. **Medical History**, 1957, v.1, no.2 ,p. 91-114.