

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**VARIACION DE PARÁMETROS CITOQUÍMICOS DE LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO CANINO FRESCO Y CONGELADO A - 80°C**

TG 156

Variacion de param



FV/28428

POR

**ARISMENDI, María Pía
ESTRADÉ, Gabriela
LADO, Tatiana**



TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

Modalidad: ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2009**

PÁGINA DE APROBACIÓN

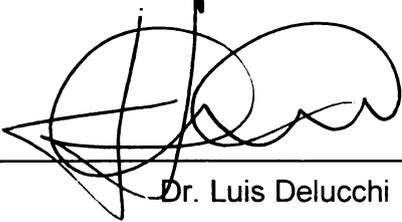
TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Rodolfo Ungerfeld

Segundo Miembro (tutor):



Dr. Luis Delucchi

Tercer Miembro:

Dr. Marcelo Rodriguez

Co – tutor:



Dr. Pedro Martino

Fecha:

11 de enero 2010

Autores:



Br. María Pía Arismendi

Br. Gabriela Estradé

Br. Tatiana Lado

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 9 (nueve) 60

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestras familias por el apoyo y respaldo durante todo el trayecto universitario, el cual ha sido de mucha importancia para desarrollarnos como personas y futuras profesionales.

Al Dr. Luis Delucchi y al Dr. Pedro Martino, por su tutoría y co-tutoría y el constante respaldo brindado.

Al Dr. Álvaro Rodrigues por su ayuda para la extracción de las muestras y a la Dra. Graciela Oliver por su colaboración en el procesamiento de las mismas.

Al Dr. Fernando Vila por su guía en el análisis estadístico de los resultados.

A la Bibliotecóloga Rosina Vilaró por su contribución y paciencia en el desarrollo bibliográfico.

A su vez, para no olvidar a nadie, agradecemos a todas aquellas personas que nos apoyaron en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>SUMMARY</u>	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u>	
3.1. Formación y localización del LCR	3
3.2. Funciones del LCR	3
3.3. Análisis del LCR	4
3.4. Parámetros a evaluar y sus variaciones	
3.4.1. Características físicas	4
3.4.2. Análisis químico	5
3.4.3. Análisis citológico	6
4. <u>OBJETIVOS</u>	8
5. <u>HIPÓTESIS</u>	8
6. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
6.1. Población animal	8
6.2. Métodos de obtención y almacenamiento	9
6.3. Características físicas	9
6.4. Evaluación citológica	9
6.5. Evaluación de proteínas	10
6.6. Evaluación enzimática	10
6.7. Análisis estadístico	10
7. <u>RESULTADOS</u>	
7.1. COMPARACIÓN ENTRE LCR FRESCO Y CONGELADO	
7.1.1. Características físicas	10
7.1.2. Recuento celular	11
7.1.3. Proteínas totales	11
7.1.4. Globulinas	12
7.1.5. Enzimas	12
7.2. COMPARACIÓN ENTRE LCR DE ANIMALES CON PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS Y ANIMALES SIN PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS	
7.2.1. Recuento celular	14
7.2.2. Proteínas totales	14
8. <u>DISCUSIÓN</u>	15
9. <u>CONCLUSIONES</u>	16
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	17
11. <u>ANEXOS</u>	
11.1. Cuadro 1: Resultados del análisis del LCR	21
11.2. Cuadro 2: Resultados del análisis del LCR de animales sin patologías neurológicas	23
11.3. Cuadro 3: Resultados del análisis del LCR de animales con patologías neurológicas	23

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Páginas
Gráfico 1: Recuento celular en muestras pareadas	11
Gráfico 2: Proteínas totales en muestras pareadas	12
Gráfico 3: AST en muestras pareadas	12
Gráfico 4: LDH en muestras pareadas	13
Gráfico 5: CK en muestras pareadas	13
Gráfico 6: Recuento celular en muestras frescas	14
Gráfico 7: Proteínas totales en muestras frescas	15
Cuadro 1: Resultados del análisis del LCR	21
Cuadro 2: Resultados del análisis del LCR de animales sin patologías neuroológicas	23
Cuadro 3: Resultados del análisis del LCR de animales con patologías neuroológicas	23

LISTA DE ABREVIATURAS

LCR = Líquido Cefalorraquídeo

CSF = Cerebrospinal fluid

BHE = Barrera Hematoencefálica

PIC = Presión Intracraneana

SNC = Sistema Nervioso Central

AST = Aspartato Amino Transferasa

LDH = Lactato Deshidrogenada

CK = Creatin Kinasa

mL = mililitros

mg = miligramos

dL = decilitros

μ L = microlitros

DMSO = Dimetil Sulfóxido

1. RESUMEN

El análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) en animales con patologías neurológicas, puede ser útil como complemento en el diagnóstico, siempre que se tenga en cuenta que no es un método específico y los valores obtenidos no siempre son constantes.

Se buscó evaluar las variaciones entre LCR frescos y refrigerado a 4°C y LCR congelados y almacenados a - 80°C, en su composición celular, proteica y enzimática y estudiar la cantidad de células y concentración de proteínas del LCR en animales con sintomatología neurológica y sin la misma.

Se estudiaron 31 muestras de LCR, obtenido mediante la punción espinal a nivel de la cisterna magna en caninos sometidos a anestesia general y en caninos eutanasiados. De éstas, 23 fueron procesadas frescas y congeladas a - 80°C para su posterior procesamiento (muestras pareadas), el resto (8 muestras) solo se procesaron en fresco. Los parámetros evaluados fueron: características físicas (color y turbidez), enzimas (Aspartato Amino Transferasa- AST, Lactato Deshidrogenasa- LDH y Creatin Kinasa- CK), estudio cuantitativo y cualitativo de proteínas y recuento celular.

El estudio enzimático y proteico cuantitativo de las muestras se realizó mediante el uso de reactivos específicos para cada parámetro y su posterior lectura en un espectrofotómetro. El análisis cualitativo de proteínas (globulinas) se llevó a cabo mediante la reacción de Nonne-Apelt. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer y observación en microscopio óptico.

El objetivo de este estudio fue evaluar las variaciones en dichos parámetros entre LCR frescos y LCR congelados, haciendo especial énfasis en el análisis de proteínas y recuento celular. Otro objetivo planteado fue determinar diferencias en la composición del LCR en animales con diagnóstico de enfermedad neurológica y animales con otras patologías.

Se encontraron diferencias significativas cuando se evaluaron los recuentos de células y la cuantificación de proteínas totales, entre LCR fresco y post congelación a - 80°C. En ambos casos se verifica una disminución en los valores. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas al evaluar enzimas en las muestras pareadas.

No se hallaron diferencias significativas al evaluar los recuentos celulares y el nivel de proteínas totales al comparar los estudios de LCR de animales con patologías neurológicas y aquellos sin las mismas.

No es útil la congelación del LCR a - 80°C sin conservantes (citoprotectores) para su posterior procesamiento, ya que los valores de importancia que se analizan (recuento celular y proteínas totales) sufren alteraciones que pueden llevar a una conclusión errónea por parte del investigador. El recuento celular del LCR y la determinación de proteínas totales no son métodos específicos para llegar al diagnóstico de patologías neurológicas.

2. SUMMARY

The analysis of cerebrospinal fluid (CSF) in animals with neurologic pathologies, can be useful as a complementary diagnostic method, as long as one keeps in mind that it is not a specific method and that the results obtained can be variable.

Thirty-one samples of CSF were studied. They were obtained through a spinal puncture at the cisterna magna for canines under general anesthesia, as well as for euthanized canines. Of these, 23 were analyzed as fresh samples and then frozen at - 80°C for later analysis (paired samples). The remaining 8 samples were processed fresh but were not frozen. The parameters evaluated were: physical characteristics (color and turbidity), enzymes (Aspartate Transaminase- AST, Lactate Dehydrogenase- LDH y Creatine Kinase- CK), qualitative and quantitative protein study, and cell count.

The quantitative enzymatic and protein study of the samples was carried out with the use of specific reagents for each parameter, and its subsequent analysis with a spectrophotometer. The qualitative analysis of proteins (Globulin) carried out with the Nonne-Apelt reaction. The cell count was done with a Neubauer chamber, and the observation in an optical microscope. The objective of this study was to evaluate the variation in the aforementioned parameters between the fresh and frozen CSF samples, with a special emphasis on the protein and cell count analysis. Another proposed objective was to determine differences in the composition of CSF among animals diagnosed with a neurological pathologies and animals with other pathologies. Significant differences were found between the fresh and frozen CSF samples for cell counts and quantitative protein evaluation. On the other hand, no significant differences were found upon analysing the enzymes in the paired samples.

No significant differences were found during the evaluation of the cell counts and the total protein levels in the study of CSF samples from animals with and without neurological pathologies.

3. INTRODUCCIÓN

El análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) provee un amplio rango de información acerca de la salud neurológica del paciente. Similar a un completo examen de sangre, el análisis del LCR tiene buena sensibilidad (para la detección de enfermedades). Sin embargo, los cambios raramente aportan un diagnóstico específico. De todas formas, el análisis del LCR permite agrupar diferentes enfermedades en categorías (inflamatorias, neoplásicas, metabólicas) de acuerdo con su habilidad para crear cambios similares (Di Terlizzi y Platt, 2006)

3.1 FORMACIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL LCR

El LCR se forma en el interior de los ventrículos, en los plexos coroideos y fluye caudalmente hacia el espacio subaracnoideo donde será reabsorbido. La filtración se lleva a cabo a través de la membrana permeable del plexo coroideo (Chrisman y col., 2003). El rango de producción de LCR por los plexos coroideos es aproximadamente de 0,05 ml/minuto (3ml/hora) en el perro (Flecher, 1993). El LCR es considerado un dializado que está en equilibrio osmótico e hidrostático con la sangre, sin embargo su composición es diferente a la del plasma (Mayhew y Beal, 1980).

El flujo del LCR hacia el espacio subaracnoideo es variable. Durante la respiración los cambios en la cavidad torácica y abdominal causan diferencias de presión, haciéndolo fluir cranealmente durante la inspiración y caudalmente durante la espiración (Coles, 1989; Chrisman, 1992; Bailey y Vernau, 1997).

La barrera hematoencefálica (BHE) actúa como una membrana semipermeable, permitiendo selectivamente el pasaje libre de algunas sustancias y transportando activamente otras. El pasaje o no de una sustancia a través de la BHE, está determinado por su peso molecular, siendo el máximo 65.000 daltons (peso molecular de la albúmina) (Duncan y Prasse, 1977; Di Terlizzi y Platt, 2006).

3.2 FUNCIONES DEL LCR

El LCR tiene un rol protector, principalmente del cerebro, de los cambios de presión venosa central y arterial asociados con la postura y la respiración. Junto con la sangre cerebral, ayuda a modular las variaciones normales de la presión intracraneana (PIC). El cráneo es una estructura rígida de volumen constante que en su interior contiene el tejido nervioso, el volumen vascular intracraneal y el volumen intracraneal del LCR. Solamente estos últimos son capaces de desplazarse para mantener constante el volumen y la PIC sin causar daño cerebral (Di Terlizzi y Platt, 2006).

El LCR, además, cumple una importante función en la excreción de metabolitos tóxicos del metabolismo cerebral. Las neuronas son muy sensibles a los cambios iónicos de su medio, por lo que una variación en la composición del líquido extracelular podría dañarlas. Por esta razón, es necesario que los fluidos que bañan las células cerebrales tengan una composición química bien regulada. El cerebro carece de un sistema linfático, por lo tanto, sustancias como las proteínas abandonan primariamente el tejido cerebral a través del espacio perivascular y por

difusión directa a través de la piamadre, hacia el espacio subaracnoideo. Al llegar a este espacio, las proteínas fluyen en el LCR para ser absorbidas finalmente hacia las venas cerebrales. Por lo tanto, el espacio perivascular actúa como un sistema de transporte linfático modificado. Además del transporte de fluidos y proteínas, el espacio perivascular transporta otras partículas como células y bacterias, desde el cerebro hacia el espacio subaracnoideo (Di Terlizzi y Platt, 2006).

El LCR es un vehículo de sustancias biológicamente activas, tales como factores liberadores de hormonas que se forman en el hipotálamo y se descargan al LCR del tercer ventrículo para ser trasladadas a sus sitios efectivos en la eminencia media. También transporta neurotransmisores y neuropéptidos que se pueden ver alterados en enfermedades tales como epilepsia y compresión de la médula espinal (Di Terlizzi y Platt, 2006).

3.3 ANÁLISIS DEL LCR

El agujero magno es la apertura caudal del cráneo, en la continuidad del encéfalo con la médula espinal. Éste se llama cisterna magna y es el sitio predilecto de punción para extracción de LCR en los animales domésticos. Se realiza mediante la inserción de una aguja espinal entre el borde caudal del cráneo y la primera vértebra cervical (atlas). El LCR también puede ser colectado del espacio subaracnoideo entre las vértebras lumbares L4-L5 o L5-L6. La colección es simple y raramente resulta en daño del sistema nervioso central (SNC) (Bailey y Vernau, 1997; Chisman y col., 2003).

Los parámetros en el LCR pueden verse alterados en diferentes situaciones como ser inflamación, traumas, neoplasias, alteraciones vasculares, infecciosas, tóxicas, metabólicas, nutricionales, congénitas e idiopáticas. Por esta razón, el estudio del mismo nos orienta al diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, además permite evaluar la evolución del paciente ante un tratamiento instaurado (Chrisman, 1992).

Las técnicas de rutina del análisis del LCR son simples y no requieren la utilización de equipamientos sofisticados. Sin embargo, es necesaria la previa capacitación del técnico, ya que los valores (especialmente el recuento celular) se alteran con el paso del tiempo. Existen autores que afirman que la muestra debe ser procesada en un tiempo no mayor a los 30 minutos post-extracción (Abate y col., 1998). Mientras que otros aseguran que no hay variaciones significativas hasta 48 horas luego de realizada la extracción de la muestra (Bienzle y col, 2000).

3.4 PARÁMETROS A EVALUAR Y SUS VARIACIONES

Los parámetros a evaluar en el análisis del LCR se pueden clasificar en tres grandes categorías: características físicas, componentes químicos y examen citológico.

3.4.1 Características Físicas

Dentro de las características físicas se evalúa el color y la turbidez. El líquido normal es incoloro y claro. En caso de encontrarse rojo brillante, puede ser debido a sangre entera de hemorragias iatrogénicas, que al centrifugar queda un sobrenadante claro

e incoloro. La presencia de sangre puede indicar hemorragia del sistema nervioso central (SNC). Un sobrenadante amarillo indica xantocromia que se puede deber a la presencia de bilirrubina producida uno o dos días posteriores a la hemorragia. La xantocromia también está presente cuando hay alta concentración proteica (más de 400 mg/dl), hidrocefalia e inflamación. La turbidez se presenta cuando las células están por encima de 500 células/ μ l (Duncan y Prasse, 1977; Chrisman, 1992).

3.4.2 Análisis Químico

El estudio químico del LCR habitualmente incluye: proteínas, glucosa, iones, urea, enzimas, ácido úrico, densidad y equilibrio ácido-base. El estudio de las proteínas puede realizarse de manera cualitativa y cuantitativa. Las proteínas de alto peso molecular (globulinas) son evaluadas cualitativamente mediante el Test de Pandy o Reacción de Nonne-Apelt. Las pruebas cuantitativas son colorimétricas o turbidimétricas y los valores normales varían según el lugar de extracción del LCR. Si se extrae de la cisterna magna, el rango es de 10 a 27 mg/dl, mientras que si se extrae a nivel lumbar debe ser hasta 45 mg/dl (Chrisman, 1992). El contenido de proteínas aumenta en inflamaciones (asociado con un incremento celular) y condiciones no inflamatorias como hemorragia, encefalomalacia y neoplasias. Un aumento no patológico de las proteínas puede deberse a la presencia de proteínas plasmáticas a causa de la contaminación con sangre durante la extracción (Duncan y Prasse, 1977). La electroforesis permite un estudio discriminado de las proteínas: albúmina 31-44%, alfa-globulina 24-31%, beta-globulina 19-30% y gamma-globulina 6-9% (Sorojonen y col, 1989; Behr y col., 2002). En el caso de las enzimas, al ser relativamente de alto peso molecular (usualmente del tipo de las globulinas), la concentración de las mismas en el LCR será baja y su entrada o salida a través de la BHE será controlada de manera similar a las proteínas. El aumento de enzimas puede deberse a alteración de la BHE o por necrosis de células del SNC, siendo esta causa la más común. Las enzimas que se detectan más comúnmente son: Aspartato Amino Transferasa (AST), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Creatin Kinasa (CK). El rango normal de la AST es de $48,6 \pm 44,8$ mU/ml; la LDH oscila entre $31,9 \pm 12,1$ mU/ml y la CK entre $6,9 \pm 4,3$ mU/ml (Mayhew y Beal, 1980; Bailey y Vernau, 1997; Nečas y Sedláková, 1999).

Las proteínas resisten el proceso de congelación de los diferentes fluidos orgánicos, sin sufrir cambios en su estructura y concentración cuando se evalúa posteriormente al descongelado (Rosychuk y col, 1988; Schoonenboom y col., 2005).

Una elevación de las proteínas puede ocurrir en enfermedades que alteren la BHE, que causen necrosis local, interrupción del flujo y absorción normales del LCR o alteración de la producción intratecal de globulinas. La alteración de la BHE permite el pasaje de proteínas séricas al LCR. La elevación de las proteínas se puede ver acompañada o no por pleiocitosis. El Distemper canino (encefalomielitis viral no supurativa) cursa normalmente con un aumento en las proteínas totales causado por una mayor producción de inmunoglobulinas intratecal (Chrisman, 1992; Abate y col, 1998). Los tumores producen un aumento de proteínas totales debido a necrosis del tejido local o pasaje de proteínas séricas a través de la BHE alterada (Bailey y Higgins, 1986; Abate y col, 1998). Además, algunos procesos tumorales pueden provocar aumento en la producción de inmunoglobulinas locales (Bailey y Higgins, 1986). En lesiones de la médula espinal por procesos mecánicos, el

aumento de las proteínas en el LCR se debe a roturas de vasos sanguíneos, interrupción del flujo y absorción del LCR y necrosis de tejido. Lesiones leves como las asociadas a Síndrome de Wobbler y Hansen tipo II, cursan con aumento de proteínas sin pleiocitosis. En caso de mielopatía degenerativa se da un aumento de las proteínas totales y de la fracción de gamma-globulinas debido a daño en la BHE (Abate y col., 1998).

La variabilidad en las enzimas presentes en el LCR, a pesar de no indicar una enfermedad específica, ayudan a diferenciar entre una enfermedad estructural y funcional del SNC (Bailey y Vernau, 1997). Existe un aumento de estas enzimas en el caso de encefalitis, especialmente de LDH y CK en las formas supurativas. La CK aumenta significativamente en patologías degenerativas, neoplasias e inflamaciones como Toxoplasma y Distemper (Abate y col., 1998).

3.4.3 Análisis Citológico

A pesar de que el número y el tipo de células en el LCR son limitadas, la detección total del número y tipo celular puede aproximarnos a un diagnóstico definitivo. Las células presentes en el LCR normal serán linfocitos y más raramente fagocitos mononucleares, neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas y células tumorales (Mayhew y Beal, 1980; Coles, 1989).

Debido a que las células se degeneran rápidamente luego de la extracción de la muestra, se recomienda realizar el recuento total lo más rápido posible. En el caso de retrasarse el procedimiento, es recomendable agregar la misma cantidad de etanol a la muestra (Coles, 1989). Otros autores sugieren la adición de suero autólogo o suero fetal, ya que se ha probado que estabiliza el LCR canino y felino durante más tiempo (D'Angelo, 2009). El examen citológico se basa en el recuento total de células nucleadas a partir de una alícuota del LCR. Existe una fórmula para corregir el conteo de células en LCR por hemorragias iatrogénicas que ocurren durante la extracción (Duncan y Prasse, 1977; Mayhew y Beal, 1980).

Las células presentan una extrema fragilidad por lo que no resisten el proceso de congelación y descongelación sin criopreservantes. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávila-Portillo y col., 2006)

La lesión celular frío-inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida

que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (Ávila-Portillo y col., 2006)

Existen diferentes métodos y sustancias utilizadas en la congelación de diferentes fluidos orgánicos con el fin de su posterior análisis o utilización (semén) (Ivanova y col., 1999; Yang y col., 2005; Ide y col., 2008). Suele agregarse glicerol para proteger los espermatozoides contra los efectos letales del congelamiento. También pueden ser benéficos el DMSO y azúcares como lactosa y rafinosa, ya que sirven como agentes deshidratantes. Aún con las mejores técnicas de congelamiento, es necesario poner más espermatozoides en cada unidad de inseminación que en el caso de semen líquido (no congelado), debido a la pérdida de algunas células viables durante el congelamiento (Hafez, 2002).

Uno de los criopreservantes utilizados normalmente para la conservación de células blancas es el DMSO. Sin embargo, el mismo no asegura una completa protección ya que de todas maneras hay una significativa disminución del número total de células post congelación a -60°C (Yang y col., 2005).

Los valores normales de leucocitos presentes en LCR de caninos son menores a 25 células/ μl (Duncan y Prasse, 1977). Estos valores normales pueden verse alterados debido a lesiones superficiales o meníngeas, encontrando una pleiocitosis (aumento en el recuento celular); en el caso de inflamación viral, fúngica, neoplasias y enfermedades degenerativas, habrá una pleiocitosis de leve a moderada, mientras que la misma será marcada en procesos purulentos (Duncan y Prasse, 1977; Bailey y Vernau, 1997). En el caso de tumores (primarios o secundarios) del sistema nervioso central, donadores de células, esta pleiocitosis se puede deber a la presencia de células tumorales (Martino, 2008). Si el recuento total de células nucleadas es igual o mayor a 500 células/ μl , va a afectar directamente la turbidez de la muestra a la observación macroscópica (Duncan y Prasse, 1977). En este caso, se puede realizar un conteo diferencial mediante citocentrifugación y posterior realización de un frotis. El predominio de linfocitos asociado a un alto recuento de células, podría indicar procesos virales, fúngicos, tóxicos, degenerativos e incluso listeriosis. Los neutrófilos predominan en meningitis, encefalitis bacteriana, abscesos y hemorragias (Mayhew y Beal, 1980; Chrisman, 1992).

Recuentos elevados de células blancas se asocian a enfermedades inflamatorias del SNC. A mayor compromiso de meninges mayor será el recuento de células blancas (Chrisman, 1992). Sin embargo, un número elevado de células no significa que el animal presente déficit neurológico severo. Al haber compromiso meníngeo leve, como en el caso de una leucoencefalomielopatía asociada al virus del Distemper canino, los recuentos de células blancas en el LCR pueden ser normales o moderadamente elevados (menos de 50 células/ μl). Las neoplasias no se asocian normalmente a una pleiocitosis, aunque algunos procesos neoplásicos con necrosis o compromiso meníngeo pueden resultar en marcados aumentos en el recuento celular (más de 500 células/ μl , siendo mayor a 1000 células/ μl en casos de meningiomas y linfomas cerebrales) (Bailey y Higgins, 1996; Chrisman, 1992).

Casos de compresión medular por hernia de disco intervertebral, fractura del cuerpo vertebral y absceso epidural, cursan con una leve pleiocitosis especialmente cuando se presentan a nivel lumbar (Chrisman, 1992). Desórdenes vasculares como infarto tromboembólico cerebral, lesión del fibrocartilago espinal, vasculitis y mielomalacia cursan con una leve pleiocitosis (hasta 39 células/ μ l) (Jamison y Lumsden, 1988).

El estudio del LCR presenta como limitante que debe ser analizado en un período menor a 48 horas si se mantiene refrigerado a 4°C. Por lo tanto, sería interesante poder almacenarlo a -80°C para su posterior análisis.

4. OBJETIVOS

1. Evaluar las variaciones entre LCR frescos y refrigerado a 4°C y LCR congelados y almacenados a -80°C, en su composición celular, proteica y enzimática.
2. Estudiar la cantidad de células y concentración de proteínas del LCR en animales con sintomatología neurológica y sin la misma.

5. HIPÓTESIS

1. Existen similitudes en los parámetros entre el LCR fresco y congelado en cuanto a proteínas y enzimas, no así en cuanto al recuento celular ya que no resisten el proceso de congelación y descongelación.
2. Existen diferencias significativas entre las muestras de aquellos animales con signos neurológicos y sin los mismos. El recuento celular y las proteínas totales en los animales que sufren de patologías neurológicas están aumentados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La experiencia se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, desde agosto 2008 a agosto 2009.

6.1. Población animal

Se estudiaron 31 muestras de LCR obtenidas de caninos sometidos a anestesia general para estudios mielográficos y otros eutanasiados por causas humanitarias. De éstas, 23 muestras se dividieron en 2 tubos Ependorff, el LCR de uno de los tubos se refrigeró a 4°C y se analizó dentro de las siguientes 48 horas y el otro se congeló a -80°C para su posterior descongelación y análisis de células y proteínas. En el caso de las enzimas, se analizaron en 12 de las muestras AST y LDH y en 9 muestras CK. En ningún caso se tomó en cuenta la patología que presentaba el animal.

Para cumplir con el segundo objetivo se analizaron 31 muestras de LCR en fresco, refrigerado a 4°C dentro de las 48 horas post extracción. Dentro de éstas, 16

muestras pertenecían a animales que no presentaban patologías neurológicas y 15 muestras a animales con patologías neurológicas. De estas últimas, 6 animales presentaban Distemper canino, 5 presentaban tumores, 2 sufrían de compresión medular mecánica, 1 presentaba una fractura a nivel de T11 y 1 paresia del tren posterior.

6.2. Métodos de obtención y almacenamiento

Las muestras se obtuvieron mediante la punción de la cisterna magna en la articulación atlanto-occipital con aguja 21 G. El animal se colocó en decúbito lateral derecho con el dorso hacia el operador, un asistente le sostuvo la cabeza y la mantuvo en ángulo de 90° (ventroflexión) con relación al eje mayor del cuello. La nariz debió elevarse de manera que quedara paralela a la mesa, porque los cóndilos del occipital se separan del atlas y aumenta el área a puncionar. Para delimitar la zona debimos trazar una línea imaginaria desde el borde anterior de las alas del atlas y otra línea desde la protuberancia occipital hasta la apófisis espinosa de la segunda vértebra cervical (axis). Donde ambas líneas se cruzaron fue el sitio de punción (Coles, 1989). La zona se preparó de manera aséptico-quirúrgica. La muestra de 1 a 2 ml se colectó directamente en un tubo Ependorff, ya que por la presión dentro del espacio subaracnoideo, el LCR fluye sin resistencia a través de la aguja. Posteriormente se refrigeraron a 4°C o congelaron inmediatamente a - 80°C y almacenaron para luego procesarse. El tiempo de almacenamiento tuvo una duración en un rango de un mes hasta diez meses. Las muestras congeladas fueron descongeladas a baño maría a 37°C inmediatamente antes del estudio de sus parámetros.

6.3. Características físicas

Las características físicas (color y turbidez) del LCR se evaluaron por inspección macroscópica, evitando la llegada directa de la luz, que puede ser natural o preferentemente artificial (blanca). La escala de color utilizada fue de incoloro a sanguinolento y para el caso de la turbidez, de claro a turbio.

6.4. Evaluación citológica

El examen citológico se realizó a partir de una alícuota de 1 µl de la muestra, medida con micropipeta y colocada en Cámara de Neubauer. Se realizó el recuento total de células con microscopio óptico en aumento 10x. Se contaron en los cuatro cuadrantes de los vértices y el central de la cámara de Neubauer. Al número de células contadas se las multiplicó por 2 y el resultado se expresó en células/µl. En el caso de que existieran dudas de que hubo hemorragia iatrogénica durante la extracción, se debió realizar un nuevo recuento mediante el agregado de un diluyente para lisar los glóbulos rojos. El diluyente utilizado fue una solución de azul de metileno con ácido acético (10 µl), que debió ser agregado a 90 µl de LCR en un tubo de ensayo. El resultado obtenido se expresó en células/µl (Mayhew y Beal, 1980; Jamison y Lumsden, 1988; Parent, 2004).

6.5. Evaluación de proteínas

Se realizó un estudio cualitativo y cuantitativo de las proteínas. El cualitativo constó de la detección de globulinas aumentadas (proteínas de alto peso molecular), a partir de la reacción de Nonne-Apelt (Ross Jones test). Se pipeteó y colocó en un tubo de vidrio 0,5 ml de solución saturada de sulfato de amonio y luego se le agregó 0,5 ml de LCR. En caso de que las muestras contuvieran globulinas aumentadas, se observó un precipitado de coloración blanca en la superficie del LCR. En los líquidos que no contenían globulinas, la prueba fue negativa (no hubo precipitado) (Mayhew y Beal, 1980; Jamison y Lumsden, 1988). El estudio cuantitativo se realizó mediante el kit de reactivos "Protein kit urin and CSF ®" de "Cypress Diagnostics" (Belgium) que utiliza el método Rojo de Pyrogallol. Se colocó 1 ml de reactivo en tres tubos de ensayo, luego a uno de los tubos se le pipetearon 20 µl de standard (concentración 100 mg/dl) y al tercero se le colocaron 20 µl de LCR. Luego de esperar 10 minutos a temperatura ambiente, se leyó el resultado en espectrofotómetro. El resultado se midió en mg/dl.

6.6. Evaluación enzimática

Finalmente, para el estudio de las enzimas se utilizaron reactivos específicos "Humazym Test ®" de "Human GMBH" (Germany) para AST, LDH y CK mediante un método cinético.

Los métodos de análisis y los parámetros para la evaluación, fueron elegidos debido a que eran los únicos disponibles en el laboratorio en que se llevó a cabo el estudio.

6.7. Análisis estadístico

Al ser las proteínas y las células variables numéricas, se utilizó como estimación de estadísticos, la media y el desvío estándar para presentar los resultados. Para la comparación de dos grupos (frescos y congelados) se utilizó el test de t para muestras pareadas mientras que, para el caso de muestras independientes, se utilizó el test de t'. Finalmente se calculó el coeficiente de correlación y de regresión para las células y las proteínas entre el LCR fresco y congelado, de modo de poder establecer si es posible predecir un valor a partir del otro (que valor tenía un parámetro en el LCR fresco si tenemos el valor del mismo post congelamiento).

7. RESULTADOS

7.1. COMPARACION ENTRE LCR FRESCO Y CONGELADO

7.1.1 Características físicas

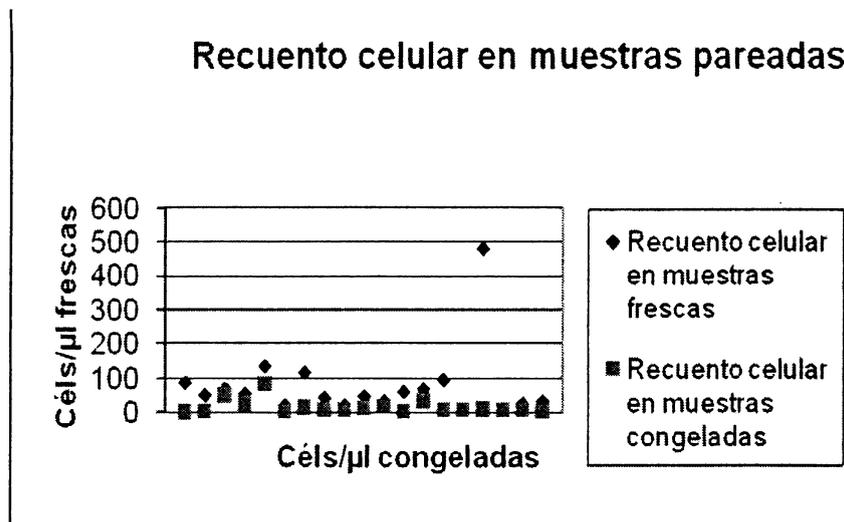
No se encontraron cambios en las características físicas (color y turbidez) entre la mayoría (21 de 23) de las muestras pareadas (LCR fresco y post congelamiento a -80°C). En los casos en que se encontraron diferencias, el cambio fue en la turbidez (de turbio a claro) y en el color (de sanguinolento a incoloro).

7.1.2 Recuento celular

Las variaciones en el recuento celular entre el LCR fresco y congelado fueron altamente significativas ($P= 0,008$). El recuento celular en el LCR congelado fue menor en todos los casos (Gráfico 1).

La correlación y el coeficiente de regresión entre los valores del recuento celular de LCR fresco y post congelación son muy bajos ($r(x,y)= -0,064$ y $b(x,y)=0,004$).

Gráfico 1: Recuento celular en muestras pareadas



7.1.3 Proteínas totales

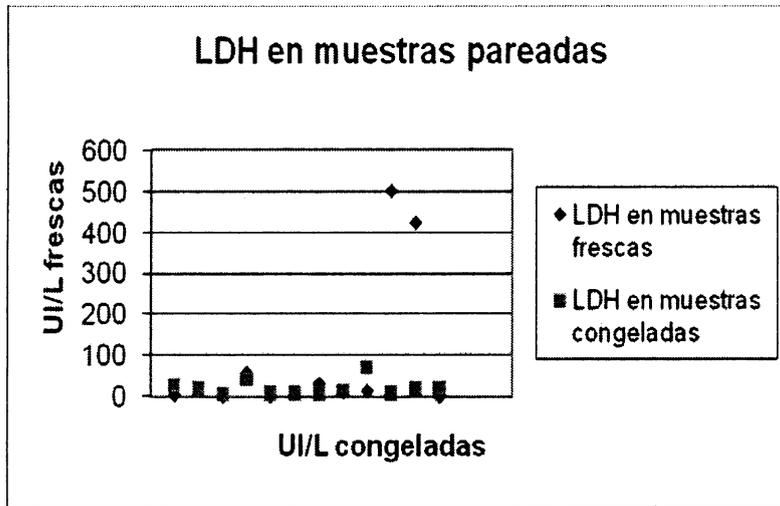
La concentración de proteínas totales en el LCR fresco comparado con la concentración de proteínas en al LCR congelado fueron significativas ($P= 0,011$). El contenido de proteínas en el LCR congelado fue menor que en el LCR fresco (Gráfico 2).

La correlación y el coeficiente de regresión entre los valores de proteínas totales de LCR fresco y post congelación son bajos ($r(x,y)=0,343$ y $b(x,y)=0,118$).

- LDH

Las variaciones de la LDH entre el LCR fresco y congelado no fueron significativas ($P= 0,212$). Las variaciones observadas no fueron siempre en el mismo sentido.

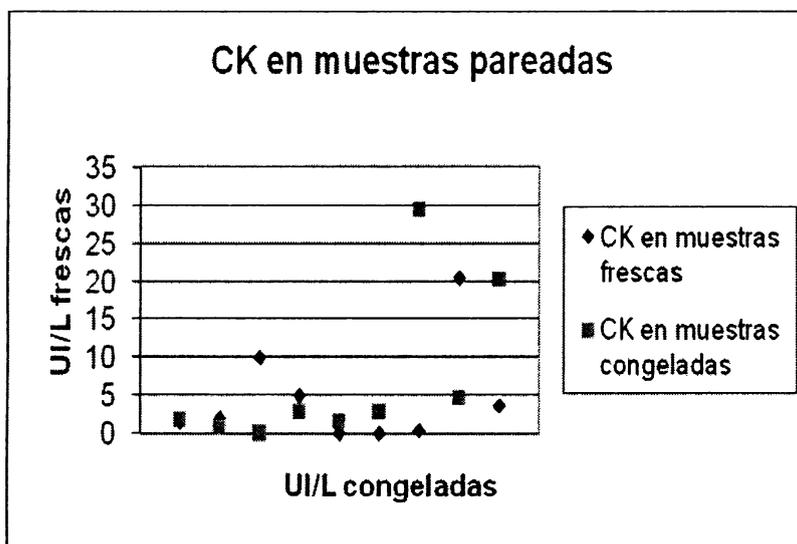
Gráfico 4: LDH en muestras pareadas



- CK

Las variaciones de la CK entre el LCR fresco y congelado no fueron significativas ($P= 0,611$). Las variaciones observadas no fueron siempre en el mismo sentido.

Gráfico 5: CK en muestras pareadas

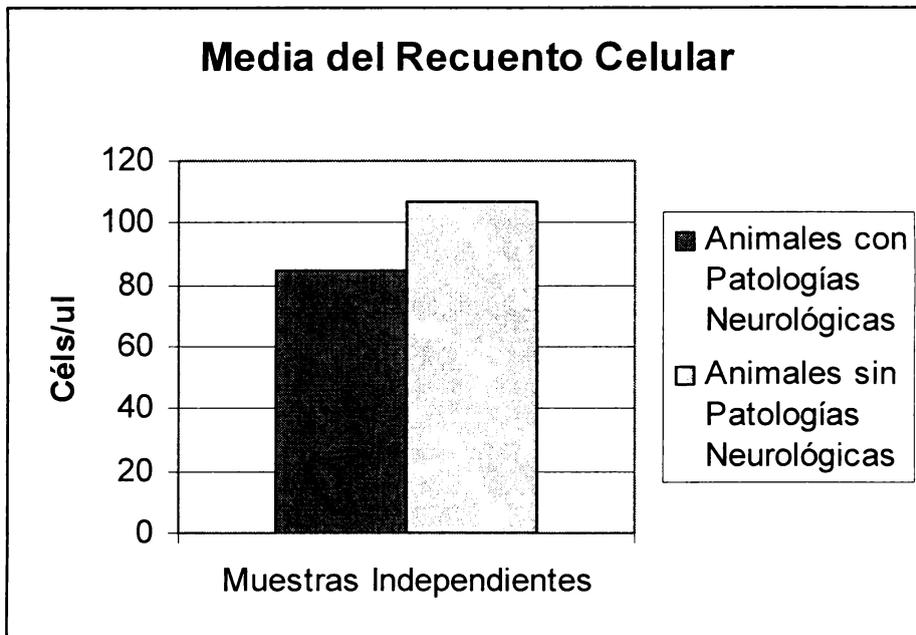


7.2. COMPARACION ENTRE LCR DE ANIMALES CON PATOLOGIAS NEUROLOGICAS Y ANIMALES SIN PATOLOGIAS NEUROLOGICAS

7.2.1. Recuento celular

No se encontraron diferencias significativas entre los recuentos celulares de los animales que presentaban signos neurológicos y aquellos que no presentaban signos neurológicos ($P=0,631$).

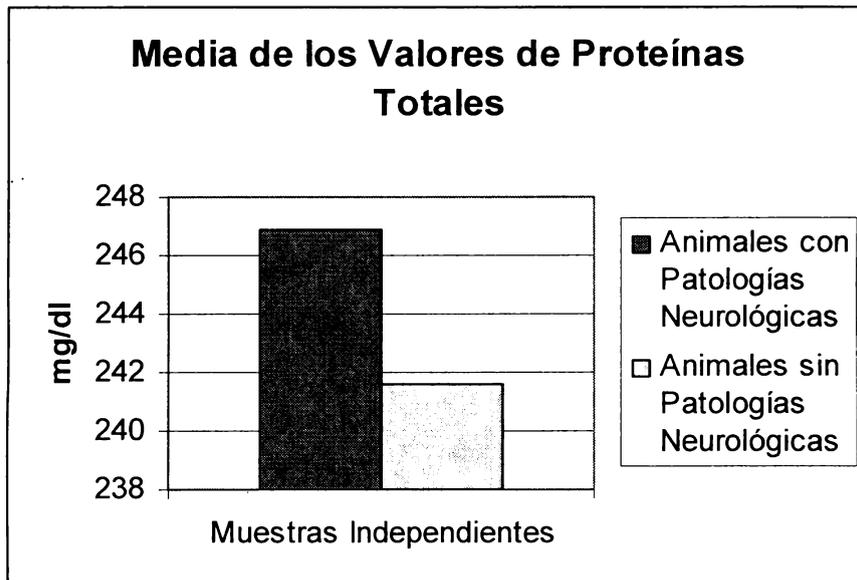
Gráfico 6: Recuento celular en muestras frescas



7.2.2. Proteínas totales

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de proteínas totales al comparar muestras de LCR de animales con patologías neurológicas y animales sin las mismas ($P=0,952$).

Gráfica 7: Proteínas totales en muestras frescas



8. DISCUSION

Los cambios observados en las características físicas entre el LCR fresco y congelado se atribuyen a la disminución en el recuento celular posterior al proceso de congelamiento y descongelamiento. Esto coincide con lo estudiado por Duncan y Prasse que afirman que la turbidez del LCR se relaciona con un alto recuento celular.

En cuanto a la variación (disminución) en el recuento celular entre las muestras frescas y congeladas, podemos decir que era lo esperado, ya que las células no resisten el proceso de congelación y descongelación y la mayoría de ellas se destruye debido a su extrema fragilidad. Si lo que se pretende en un primer momento es hacer una evaluación celular del LCR, la muestra se debe evaluar lo antes posible después de su extracción para evitar cambios. La congelación para posterior recuento celular no es de valor ya que las células se ven afectadas en el proceso y los datos obtenidos no son representativos de la realidad. Se encontró una correlación y un coeficiente de regresión cercanos a cero entre las muestras frescas y congeladas lo que no permite realizar una predicción de un valor a partir del otro, ya que para formular una ecuación de predicción, es necesario que exista una regresión alta.

Para el caso de las proteínas, no se esperaban encontrar variaciones entre los niveles del LCR fresco y congelado ya que, si las muestras son congeladas a -80°C inmediatamente después de colectadas, las proteínas deberían conservarse en sus valores originales, como afirman Schoonenboom y col. En cambio los resultados muestran una significativa disminución del nivel de proteínas totales en las muestras congeladas. Por esta razón, no es adecuada la congelación del LCR si lo que se busca es obtener información respecto al estudio de las proteínas totales, ya que se obtendrían valores alterados de las mismas, llevando a una conclusión imprecisa. Como no se encontró una correlación, ni un coeficiente de regresión lo

suficientemente altos no es posible realizar una predicción del valor de las proteínas totales que tenía el LCR fresco a partir del congelado.

Los resultados obtenidos en el estudio cualitativo de las globulinas fueron poco específicos. Como solamente se obtuvieron 2 muestras positivas en el LCR fresco y solo una de estas muestras volvió a dar positivo luego del congelado y descongelado, no se pueden sacar conclusiones válidas para el caso. Sería conveniente utilizar otro test para el estudio de las globulinas, ya que el test de Nonne-Apelt no parece ser muy sensible.

Los resultados obtenidos del estudio de las enzimas (AST, LDH, CK), tanto en el LCR fresco como en el congelado, no son significativos. Por lo tanto, no se puede concluir que existan cambios en los niveles de enzimas cuando se somete al LCR a congelamiento a -80°C . Se debe tener en cuenta que se utilizó un número muy pequeño de muestras (12 muestras para AST y LDH, y 9 muestras para CK), por lo tanto, los resultados obtenidos podrían estar sesgados.

En los casos en los que se obtuvieron aumentos en la actividad enzimática en el LCR congelado, podría deberse a que las enzimas analizadas (AST, LDH y CK), son del tipo de las intracelulares. Por lo tanto, al producirse la destrucción de las células en el proceso de congelación y descongelación, estas enzimas son liberadas al medio y por esto aumentarían en las muestras congeladas.

Si se comparan los valores de recuento celular entre los animales que sufrían alteraciones nerviosas con aquellos que no sufrían alteraciones nerviosas, no se encuentran diferencias significativas. Esto indica que el estudio del LCR como un método para diagnosticar patologías nerviosas no es específico, y puede llevar a conclusiones erróneas si se basa en los niveles de células blancas. Los valores obtenidos en este estudio difieren de lo expresado por Chrisman. En ese caso, el autor encontró un aumento en el recuento de células blancas (pleiocitosis) de leve a moderado cuando estaba en presencia de patologías con sintomatología nerviosa (por ejemplo, Distemper, algunos tipos de neoplasia, compresiones medulares, fracturas vertebrales y abscesos epidurales).

Al comparar los niveles totales de proteínas en el LCR entre animales que presentaban alteraciones del SNC con aquellos que no las presentaban, no se encontraron diferencias significativas. Estos valores difieren de lo encontrado por Abate y col. Estos autores encontraron diferencias en los niveles de proteínas totales, al comparar LCR de animales normales y animales enfermos. Chrisman afirma que pueden ocurrir elevaciones en el nivel de proteínas en enfermedades que alteran la barrera hematoencefálica, causen necrosis local, interrupción del flujo normal del LCR o su absorción.

9. CONCLUSIONES

No es útil la congelación del LCR a -80°C sin conservantes (citoprotectores) para su posterior procesamiento, ya que los valores de importancia que se analizan (recuento celular y proteínas totales) sufren alteraciones que pueden llevar a una conclusión errónea por parte del investigador.

Con respecto al estudio cualitativo de globulinas no se pudieron sacar conclusiones debido a que solamente se obtuvieron 2 resultados positivos en las muestras frescas de LCR y solamente una volvió a dar positivo luego de congelada a - 80°C y descongelada.

En cuanto a los valores de las diferentes enzimas no se puede llegar a ninguna conclusión ya que, al haber procesado un pequeño número de muestras, los datos obtenidos podrían estar sesgados.

El recuento celular del LCR no es un método específico para llegar al diagnóstico de patologías neurológicas, ya que no siempre la pleiocitosis se debe a patologías neurológicas sino que también puede ser causada por otros procesos mórbidos.

La cuantificación del total de proteínas en LCR tampoco es un método específico para llegar a un diagnóstico de enfermedad del SNC, ya que estos aumentos pueden ser provocados por otras enfermedades. Se debería discriminar qué fracción proteica está alterada para poder aproximarse mejor al diagnóstico.

El análisis del LCR como método colateral de diagnóstico presenta limitantes, entre ellas, el tiempo desde la extracción de la muestra hasta su análisis, que no puede exceder las 48 horas y como se demostró en el estudio su congelamiento no mantiene los parámetros importantes (recuento de células totales y proteínas totales) constantes. Además se debe tener en cuenta el hecho de que el animal debe ser sometido a anestesia general para la extracción de la muestra exponiéndolo a los riesgos que ésta conlleva. Como última limitante se destaca la necesidad de entrenamiento del técnico, tanto para la extracción como para el procesamiento de la muestra.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abate, O.; Bollo, E.; Lotti, D.; Bo, S. (1998) Cytological, inmunocytochemical and biochemical cerebrospinal fluid Investigation in selected central nervous system disorders of dogs. *J. Vet. Med.*; 45:73-85.
- 2) Amude, A. M.; Alfieri, A. A.; Balarin, M. R.; dos Reis, A. C.; Altieri, A. F. (2006) Cerebrospinal fluid from a 7-month-old dog with seizure-like episodes. *Vet. Clin. Pathol.*; 35:119-122.
- 3) Ávila-Portillo, L. M.; Madero, J. I.; López, C.; León, M. F.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L. G.; Gómez, C.; Lozano, J. M.; Reguero, M. T. (2006) Fundamentos de criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*; 57.
- 4) Bailey, C. S.; Higgins, R. J. (1986) Characteristics of cisternal cerebrospinal fluid associated with primary brain tumors in the dog: a retrospective study. *J. A. V. M. A.*; 188:414-421.
- 5) Bailey, C. S.; Vernau, W. (1997) Cerebrospinal fluid. En: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical Biochemistry of domestic animals*. 5a. ed., San Diego, Academic; p. 786-822.
- 6) Baver, N. B.; Bassett, H.; O'Neill, E. J.; Acke, E. (2006) Cerebrospinal fluid from a 6-year-old dog with severe neck pain. *Vet. Clin. Pathol.*; 35:123-125.

- 7) Behr, S.; Trumel, C.; Braun, J.P. (2002) Analysis of proteins in the CSF of dogs: a review/ Exploration biologique des proteíns du liquid cephalorachidien chez le chien. *Prat. Med. Chirurg. Anim. Compag.*; 37:91-101.
- 8) Bienzle, D.; McDonnell, J.; Starton, J. (2000) Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *J. A. V. M. A.*; 216:1761-1764.
- 9) Chandler, W. F.; Zwetnow, N. N.; Löfgren, J. (1979) Hysteresis in the relationship between cerebrospinal fluid absorption minus formation and cerebrospinal fluid pressure in the dog. *Neurosurgery*; 5:349-353.
- 10) Chrisman, C. L. (1992) Cerebrospinal fluid analysis. *Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract.* 22:781-810.
- 11) Chrisman, C.L.; Platt, S.; Mariau, C.; Clemmons, R. (2003) Introducción. En: Chrisman, C.L.; Platt, S.; Mariau, C.; Clemmons, R. *Manual de neurología práctica*. Barcelona, Multimédica; p. 4
- 12) Coates, J. R.; O'Brien, D.P.; Kline, K.L.; Storts, R.W.; Johnson, G.C.; Shelton, G.D; Patterson, E.E.; Abbott, L.C. (2002) Neonatal cerebellar ataxia in Cotton de Tulear dogs. *J. Vet. Intern. Med.*; 16:680-689.
- 13) Coles, E. H. (1989) *Diagnóstico y patología en veterinaria*. 4a. ed., México D.F., Interamericana; 496 p.
- 14) D'Angelo, A. (2009) Effects of sample storage on the results of CSF analysis in calves. *Vet. Rec.*; 165:480.
- 15) Del Pozo-Reyes, D.; Loyo-Varela, M.; Estañol-Vidal, B.; Mateos-Gomez, J.H. (1978) Production and absorption of cerebrospinal fluid in the spinal subarachnoid space of the dog. *Ach. Invest. Med. (Mex)*; 9:511-518.
- 16) Di Terlizzi, R.; Platt, S. (2006) The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals. *Vet. J.*; 172:422-431.
- 17) Duncan, J. R.; Prasse, K. W. (1977) Cytology. En: Duncan, J. R.; Prasse, K. W. *Veterinary laboratory medicine clinical pathology*. Iowa, The Iowa State University Press; p. 157-183.
- 18) Elias, A.; Brown, C. (2008) Cerebellomedullary cerebrospinal fluid collection in the dog. *Lab. Anim. (NY)*; 37:457-458.
- 19) Flecher, T. F. (1993) Spinal cord and meninges. En: Evans, H. E. Miller's *Anatomy of the dog*. 3a. ed., Philadelphia, W. B. Saunders; p. 826.
- 20) Grevel, V. (1991) Experiences with a sedimentation technique for the enrichment of cerebrospinal fluid cells in the dog and cat – Part 1. *Tierarztl. Prax.*; 19:553-560.
- 21) Hafez, E. S. E. (2002) Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez, E. S. E.; Hafez, B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a. Ed., México D.F., Mc Graw-Gill Interamericana; p. 441-452.
- 22) Ide, K.; Matsuura, S.; Fujino, Y.; Ohno, K.; Tsujimoto, H. (2008) Investigation of various methods for the cryopreservation of canine bone marrow-derived CD34+ cells. *J. Vet. Med. Sci.*; 70:1211-1217.
- 23) Ivanova, M.; Mollova, M.; Ivanova-Kicheva, M. G.; Petrov, M.; Djarkova, T.; Somley, B. (1999) Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology*; 52: 163-170.
- 24) Jamison, E. N.; Lumsden, J. H. (1988) Cerebrospinal fluid analysis in the dog: methodology and interpretation. *Seminars Vet. Med. Surg*; 3:122-132.
- 25) Jennings, D. B.; Tobin, P. (1979) A chronic cannula for obtaining CSF from the cistern magna of awake dogs. *Am. J. Physiol.*; 236:2132-2134.

- 26) Johnson, G. C.; Fenner, W. R.; Krakowka, S. (1988) Production of immunoglobulin G and increased antiviral antibody in cerebrospinal fluid of dogs with delayed-onset canine distemper viral encephalitis. *J. Neuroimmunol.*; 17:237-251.
- 27) Lefbom, B.K.; Parker, G.A. (1995) Ataxia associated with lymphosarcoma in a dog. *J. A. V. M. A.*; 207:922-923.
- 28) Mayhew, I.; Beal, C. (1980) Techniques of analysis of cerebrospinal fluid. *Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract.*; 10:155-176.
- 29) Momeni, N.; Yoshimoto, T.; Ryberg, B.; Sandberg, M.; Grubb, A. (2003) Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*; 63:387-395.
- 30) Nečas, A.; Sedláková, D. (1999) Changes in the CK and LDH activities in cerebrospinal fluid of dogs with thoracolumbar disc disease. *Acta. Vet. Brno.*; 68:111-120.
- 31) Parent, J. (2004) Trastornos neurológicos. En: Willard, M. D.; Tvedten, H. *Diagnóstico clinicopatológico en los pequeños animales*. Buenos Aires, Intermédica; p. 323-332.
- 32) Platt, S.; Marlin, D.; Smith, N.; Adams, V. (2006) Increased cerebrospinal fluid uric acid concentration in dogs with intracranial meningioma. *Vet. Rec.*; 158:830.
- 33) Raymond, R. M.; Harkema, J. M.; Emerson, T. E. Jr. (1972) Cerebrospinal fluid composition during endotoxin shock in the dog. *Adv. Shock. Res.*; 2:249-256.
- 34) Richling, B.; Takacs, F. (1982) Problems of long-term cannulation of cistern magna and subarachnoid space in the conscious dog – Technical note – *Neurosurg. Rev.*; 5: 41-44.
- 35) Rosychuk, R. A.; Freshman, J. L.; Olson, P. N.; Olson, J. D.; Husted, P. W.; Crowder-Sousa, M. E. (1988) Serum concentration of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in dogs before and after administration of freshly reconstituted or previously frozen thyrotropin-releasing hormone. *Am. J. Vet. Res.*; 49:1722-1725.
- 36) Schoonenboom, N.S.; Mulder, C.; Vanderstichele, H.; Van Elk, E. J.; Kok, A.; Van Kamp, G.J.; Scheltens, P.; Blankenstein, M. A. (2005) Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentration in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin. Chem.*; 51:189-195.
- 37) Snyder, L. A.; Tarigo, J. L.; Neel, J. A. (2007) Cerebrospinal fluid from a dog with hind limb ataxia. *Vet. Clin. Pathol.*; 36:379-381.
- 38) Sorojonen, D.C.; Cox, N.R.; Swango, L.J. (1989) Electrophoretic determination of albumin and gamma globulin concentrations in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalomyelitis attributable to canine distemper virus infection: 13 cases (1980-1987). *J. A. V. M. A.*; 195:977-180.
- 39) Vaagenes, P.; Safar, P.; Diven, W.; Moossy, J.; Rao, G.; Cantadore, R.; Kelsey, S. (1988) Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dogs: markers of damage and predictors of outcome. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*; 8:262-275.
- 40) Waters, D. J.; Hayden, D. W. (1990) Intramedullary spinal cord metastasis in the dog. *J. Vet. Intern. Med.*; 4:207-215.

- 41) Wilsson-Rahmberg, M.; Olovson, S.G.; Forshult, E. (1998) Method for long-term cerebrospinal fluid collection in the conscious dog. *J. Invest. Surg.*; 11:207-214.
- 42) Yang, H.; Zhao, H.; Acker, J. P.; Liu, J. Z.; Akabutu, J.; McGann, L. E. (2005) Effect of dimethyl sulfoxide on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood. *Cryobiology*; 51:165-175.
- 43) Yin, W.; Tibbs, R.; Aoki, K.; Badr, A.; Zhang, J. (2001) Metabolic alternations in cerebrospinal fluid from double hemorrhage model of dogs. *Neurol. Res.*; 23:87-92.

11. ANEXOS

11.1. Cuadro 1: Resultados del análisis del LCR

C. F.= Características Físicas, Inc.= Incoloro, Turb.= Turbio, Sang.= Sanguinolento, Lig.= Ligeramente, Rto. Cel.= Recuento Celular, Prs.= Proteínas, Cong.= Congelado

Nº Ficha	C.F. fresco	C.F. cong	Rto cel. Fres. (céls/µl)	Rto cel. Cong. (céls/µl)	Prs. fresco (mg/dl)	Prs. Cong (mg/dl)
0030/09	Claro e Inc	Claro e Inc	50	27	112	89
0753/08	Turb e Inc	Claro e Inc	542	0	62	54
0963/08	Claro e Inc	Claro e Inc	32	6	35	60
0978/08	Claro e Inc	Claro e Inc	228	0	113	95
1398/08	Claro e Inc	Claro e Inc	86	0	342	98
1454/08	Claro e Inc	Claro e Inc	50	2	248	96
2259/08	Claro e Inc	Claro e Inc	68	50	120	126
14/03/09	Claro e Inc	Claro e Inc	54	28	313	180
0077/09	Claro e Inc	Claro e Inc	134	84	150	120
1067/07	Claro e Inc	Claro e Inc	21	2	145	24
1375/08	Lig.Turb e Inc	Lig.Turb e Inc	116	14	123	24
0112/06	Claro e Inc	Claro e Inc	42	6	276	66
1190/08	Claro e Inc	Claro e Inc	20	8	361	114
1554/08	Claro e Inc	Claro e Inc	46	12	1025	198
0128/02	Claro e Inc	Claro e Inc	32	15	392	295
1179/09	Claro e Inc	Claro e Inc	60	4	92	29
1189/09	Turb e Inc	Turb e Inc	67	32	47	17
1668/08	Claro e Inc	Claro e Inc	94	8	504	214
1672/08	Claro e Inc	Claro e Inc	8	6	26	99
1314/09	Claro e Inc	Claro e Inc	480	10	920	14
20/08/09	Claro e Inc	Claro e Inc	10	6	118	199
03/09/09	Claro e Inc	Claro e Inc	24	8	228	90
01/10/08	Turb y Sang	Claro e Inc	32	4	533	642
1144/08	Turb e Inc	x	106	x	59	x
0072/09	Claro e Inc	x	36	x	135	x
0631/05	Turb e Inc	x	82	x	49	x
1167/96	Claro e Inc	x	52	x	56	x
1174/08	Lig.Turb e Inc Turb y	x	192	x	107	x
13/08/08	Sang	x	26	x	62	x
1913/07	Claro e Inc	x	47	x	29	x
1473/08	Claro e Inc	x	34	x	433	x

N.A. = Nonne Apelt, Neg.= Negativo, Pos.= Positivo

Nº Ficha	N.A.		AST	AST	LDH	LDH	CPK	CPK
	fresco	cong	fresco (UI/l)	cong (UI/l)	fresco (UI/l)	cong (UI/l)	fresco (UI/l)	cong (UI/l)
0030/09	Neg	Neg	11	24	3,52	28,2	1,5	1,77
0753/08	Neg	Neg	12	7,1	16	18,2	2	0,8
0963/08	Neg	Neg	4	7	0	5,7	10	0
0978/08	Pos	Pos	10	15,4	58	40,8	5	2,8
1398/08	Neg	Neg	22	14,9	0	8,3	0	1,6
1454/08	Neg	Neg	28	13,6	12	7	0	2,8
2259/08	Neg	Neg	4	23	32,16	7,2	0,37	29,5
14/3/09	Neg	Neg	7,12	22,5	10,6	13,4	20,38	4,7
0077/09	Neg	Neg	44	60,8	13,24	69,5	3,67	20,21
1067/07	Neg	Neg	51	16,6	500	7,3	x	1,6
1375/08	Neg	Neg	14	25,3	423	20	x	0,1
0112/06	Neg	Neg	2	8,6	0	20,4	x	2,8
1190/08	Neg	Neg	x	26,5	x	6,4	x	15,4
1554/08	Neg	Neg	x	33,5	x	11,3	x	0,1
0128/02	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1179/09	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1189/09	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1668/08	Pos	Neg	x	x	x	x	x	x
1672/08	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1314/09	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
20/8/09	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
03/9/09	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1/10/08	Neg	Neg	x	x	x	x	x	x
1144/08	Neg	x	19	x	25	x	10	x
0072/09	Neg	x	36	x	12,23	x	67,32	x
0631/05	Pos	x	1	x	29	x	0	x
1167/96	Neg	x	8	x	0	x	5	x
1174/08	Neg	x	36	x	12	x	13	x
13/8/08	Neg	x	13	x	681	x	5	x
1913/07	Neg	x	36	x	16	x	x	x
1473/08	Neg	x	x	x	x	x	x	x

11.2. Cuadro 2: Resultados del análisis del LCR de animales sin patologías neurológicas

C. F.= Características Físicas, C= Claro, I= Incoloro, T= Turbio, S= Sanguinolento, LT= Ligeramente Turbio, Rto. Cel.= Recuento Celular, Prs.= Proteínas

N° ficha	C. F.	Rto. Cel (cels./ μ l)	Prots. Totales (mg/dl)
0072/09	C I	36	135
0112/06	C I	42	276
0128/02	C I	32	392
0753/08	T I	542	62
1167/06	C I	52	56
1179/09	C I	60	92
1189/09	T I	67	47
1375/08	LT I	116	123
1454/08	C I	50	248
1672/08	C I	8	261
1314/09	C I	480	920
14/03/09	C I	54	313
20/08/09	C I	10	118
03/09/09	C I	24	228
01/10/08	T S	32	533
13/08/08	T S	26	62

11.3. Cuadro 3: Resultados del análisis del LCR de animales con patologías neurológicas

C. F.= Características Físicas, C= Claro, I= Incoloro, T= Turbio, Rto. Cel.= Recuento Celular, Prs.= Proteínas

N° ficha	CF	Rto. Cel (cels./ μ l)	Prot. Total(mg/dl)
1144/08	T I	106	59
0077/09	C I	134	150
1473/08	C I	34	433
1174/08	LT I	192	107
1190/08	C I	20	361
1398/80	LT I	86	342
0978/08	T I	228	113
0963/08	C I	32	35
1554/08	C I	46	1025
1668/08	C I	94	504
0631/05	T I	82	49
1067/07	C I	52	56
1913/07	C I	47	291
2259/08	C I	68	120
0030/09	C I	50	59