U.PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

CARACTERIZAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DO ENVELHECIMENTO NOS CANÍDEOS

Carla Maria Teixeira e Lima

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

2008

Colaboradores:

centro hospitalar do Porto
Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
INRB, I.P. Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I.P
LNIV Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

CARLA MARIA TEIXEIRA E LIMA

CARACTERIZAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DO ENVELHECIMENTO NOS CANÍDEOS

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina-Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Maria de Fátima Rodrigues Moutinho Gartnër

Categoria – Professor catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Manuel Jorge Rocha Melo Pires

Categoria – Professor Auxiliar convidado

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Unidade de Neuropatologia do Centro Hospitalar do Porto, Hospital de Santo António.

À minha mãe e ao meu pai, porque são meus pais, e isso bastaria, mas porque sempre fizeram questão de fazer muito mais. O vosso apoio incondicional, carinho e paciência tornaram possível este trabalho.

Ao João, por todo o carinho, compreensão e ajuda. Ao teu lado tudo ficou mais fácil.

À minha filha Alice, pela compreensão e ternura sempre manifestadas apesar do 'débito' de atenção e pela excitação e orgulho com que sempre reagiu aos resultados da mãe. Espero que o entusiasmo, seriedade e empenho que ponho no trabalho lhe possa servir de estímulo.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado aqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada, um grupo de pessoas que sempre demonstrou apoio, paciência e amizade nos momentos mais necessários. A todos agradeço profundamente e dedico o resultado do trabalho.

À Professora Doutora Maria de Fátima Rodrigues Moutinho Gartnër, agradeço ter aceite ser minha orientadora, confiança depositada e ajuda na realização da dissertação.

Ao Professor Doutor Manuel Jorge Rocha Melo Pires, agradeço a forma como orientou o trabalho e a cordialidade com que sempre me recebeu. Agradeço o compromisso assumido e o empenho que colocou neste trabalho. Para agradecer a confiança, paciência e amizade, as palavras serão sempre poucas.

Ao Professor Doutor Manuel Joaquim de Azevedo Ramos, Chefe de Departamento do Serviço de Patologia do LNIV, agradeço as facilidades concedidas para que este trabalho fosse possível, todo o incentivo e palavras de apoio, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

À Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa, pelo apoio, interesse no trabalho e forma dinâmica como coordena o mestrado.

À Dr.ª Maria Eduarda Matos, pela simpatia e preciosa colaboração no tratamento estatístico dos dados.

À Dr.ª Isabel Calhim, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Geral de Santo António, pela simpatia com que me recebeu e meios concedidos que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao LNIV e seus dirigentes agradeço a autorização para a frequência deste mestrado e meios concedidos.

À Dr.ª Cristiana Ochôa, Chefe do Serviço de Histopatologia do LNIV, colega de trabalho, agradeço toda amizade e apoio demonstrado durante a realização desta dissertação.

À Dr.ª Margarida Geraldes, pelo incentivo e pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

Aos técnicos de Anatomia Patológica do Serviço de Anatomia Patológica, Unidade de Neuropatologia do Hospital de Santo António, D.ª Isabel Pires, D.ª Aurora Rodrigues e Carlos Gouveia, agradeço a forma como me receberam, toda a disponibilidade demonstrada e esclarecimentos prestados, bem como a preciosa colaboração na realização da parte prática deste trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Histopatologia e Anatomia Patológica do LNIV, Fátima Falcão, Cláudia Capela, Afonso Marques e Teresa Coelho, agradeço todo o apoio, amizade e fundamental colaboração na realização da parte prática do trabalho.

Ao Canil Municipal do Porto e à Dr.ª Adélia Alves Pereira, médica veterinária do canil, agradeço todo o apoio e colaboração prestadas na recolha de amostras.

Aos colegas do ICBAS, Dr.ª Patrícia Dias Pereira e Professor Doutor Augusto Faustino, agradeço todo o apoio e colaboração prestadas na recolha de amostras.

À Dr.ª Glória Nunes, pela sua grande ajuda na verificação ortográfica da dissertação.

Ao João Ricardo pela ajuda no tratamento digital das imagens.

A todos os meus familiares e colegas do LNIV o meu sincero agradecimento por todo o apoio e palavras de incentivo.

RESUMO

Os avanços da medicina e da nutrição proporcionaram um aumento de esperança de vida dos cães. As alterações neuropatológicas associadas ao envelhecimento estão descritas em várias espécies animais, incluindo o cão idoso que desenvolve défices cognitivos e alterações neuropatológicas semelhantes às observadas no normal envelhecimento dos humanos e na doença de Alzheimer, constituindo um bom modelo de estudo das fases iniciais desta patologia.

Neste estudo foram analisados 70 cérebros de cães de várias raças, com idades compreendidas entre os 1 e os 18 anos. Foi realizado o estudo histopatológico através de coloração de rotina H&E e imunohistoquímico para detecção de proteína β-amilóide, ubiquitina, reactividade astrocitária à GFAP e imunorreactividade à proteína *tau*. Os resultados foram sujeitos a análise comparativa de acordo com o escalão etário (1-7anos; 8 -12 aos e 13 ou mais anos), de acordo com a idade do cão correspondente à do homem, em função do peso (<65 e ≥65 anos) e de acordo com o porte (pequeno, médio, grande e gigante). Adicionalmente foi feito o estudo ultraestrutural de amostras de SNC de quatro cães e o estudo do nervo sural e músculo deltóide em seis cães.

As principais alterações neuropatológicas encontradas associadas ao processo de envelhecimento foram: a fibrose das meninges, a dilatação dos ventrículos laterais, a hialinização vascular, a astrocitose do córtex, a acumulação de lipofuscina, o aumento do número de inclusões e corpos ubiquitinados, a deposição de proteína β-amilóide vascular e a formação de placas de amilóide.

Apesar da maioria dos estudos neuropatológicos referirem que o cão não desenvolve a formação de tranças neurofibrilhares, o estudo ultraestrutural de quatro amostras de SNC de cães idosos identificou tranças neurofibrilhares no córtex temporal.

O estudo do nervo e do músculo não demonstrou, nas amostras seleccionadas, alterações significativas relacionadas com a idade.

Os resultados obtidos reforçam a teoria de que os cães idosos são um bom modelo de estudo da doença de Alzheimer e envelhecimento do humano.

SUMMARY

Advances in medicine and nutrition have provided an increase of dog's life span. The neuropathological changes associated with aging are described in various animal species, including the elderly dog which develops cognitive deficits and neuropathological changes similar to those seen in human aging and in patients suffering from Alzheimer disease, making these a good model to study the early stages of this condition.

In this study, brain tissue of 70 dogs of different breeds, aged between 1 and 18 years old, were analyzed. The neuropathological study involved macroscopic examination and routine hematoxilin and eosine staining tissues. Immunohistochemical detection of β-amyloid protein, ubiquitin, astrocytic reactivity to glial fibrillary acid protein and imunoreactivity to *tau* protein, was performed in the same cases. Results were subjected to comparative analysis in accordance with the age group (1-7 years; 8 -12 years and 13 or more years), in accordance with dog's age relating to man's, depending on dog's weight (<65 and ≥ 65 years) and size (small, medium, large and giant). Additionally, it was performed an ultrastructural study in four samples of nervous system. In other 6 cases was studied the sural nerve and deltoid muscle.

The main neuropathological age related-changes findings were: meningeal fibrosis, ventricular enlargement, vascular hyalinization, cortical astrocytosis, lipofuscin storage, increased number of inclusions and ubiquitinated bodies, vascular deposition of β-amyloid protein and amyloid plaques.

Although the majority of neuropathological studies in CNS aging dog's do not describe neurofibrilary tangles in neurons, the ultrastructural study of four elderly dogs identified neurofibrilary tangles in the temporal cortex.

The study of the nerve and the muscle did not show, in the selected samples, significant age related changes.

The obtained results reinforce the theory that elderly dogs are a useful study model for Alzheimer disease and human aging.

ÍNDICE

RESUMO……...V
SUMMARY……...VI
ÍNDICE DE FIGURAS……...IX
ÍNDICE DE QUADROS……..XI
ÍNDICE DE GRÁFICOS……XII
ABREVIATURAS E SIGLAS……..XIII
1-INTRODUÇÃO 1
2-OBJECTIVOS.....8
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....9
3.1-Amostras 9
3.2- Métodos.....9
3.2.1-Dados Clínicos e Avaliação das Funções Cognitivas 9
3.2.2- Recolha de sangue para análise bioquímica.....10
3.2.3- Necrópsia com colheita de encéfalo.....10
3.2.4- Estudo macroscópico do encéfalo.....11
3.2.4.1- Corte e selecção das áreas neuroanatómicas 11
3.2.4.2 - Métodos de avaliação de alterações macroscópicas 13
3.2.5- Estudo Histopatológico.....13
3.2.5.1- Características histológicas.....14
3.2.5.2 - Métodos de avaliação das características histológicas.....15
3.2.6- Estudo imunohistoquímico 15
3.2.6.1-Preparação dos cortes e procedimento.....15
3.2.6.2-Métodos de avaliação da imunorreactividade 16
3.2.7- Estudo de nervo e músculo 17
3.2.7.1- Colheita de nervo 17
3.2.7.2-Colheita de músculo.....18
3.2.8- Microscopia Electrónica.....18
3.3- Análise Estatística 19
4- RESULTADOS 20
4.1-Dados clínicos 20
4.2- Resultados das Análises Bioquímicas.....20
4.3-Dados de necrópsia.....21
4.4- Estudo macroscópico do encéfalo.....22
4.4.1-Peso do encéfalo.....22
4.4.2-Fibrose das meninges e atrofia do córtex 23
4.4.3-Dilatação ventricular 25
4.5- Estudo Histopatológico.....28
4.5.1- Fibrose e Calcificação das meninges.....28
4.5.2- Alterações vasculares 30
4.5.3-Inflamação.....36
4.5.4-Satelitose.....37
4.5.5- Pigmentos.....38
4.5.5.1-Lipofuscina 38
4.5.5.2-Neuromelanina 41
4.5.6-Inclusões 42
4.5.6.1- Corpora amilácea 42
4.5.6.2-Esferóides axonais 43
4.5.7- Malformações e Tumores.....44
4.5.7.1- Defeitos de migração de células da placa germinativa 44
4.5.7.2 - Tumores 45
4.6 -Estudo Imunohistoquímico 48
4.6.1- Imunorreactividade à Ubiquitina 48
4.6.2- Astrocitose.....51

4.6.3- Deposição de proteína β- Amilóide (Aβ) 53
4.6.3.1- Angiopatia Amilóide Cerebral (AAC) 53
4.6.3.2- Placas de Amilóide 56
4.6.4- Imunorreactividade à proteína tau 60
4.7- Estudo do Nervo 63
4.7.1- Coloração de Hematoxilina e Eosina 63
4.7.2- Coloração com Azul de Toluidina 63
4.8- Estudo do Músculo 64
4.8.1- Coloração de Hematoxilina e Eosina 64
4.8.2- Coloração de Tricrómio de Gomori 65
4.8.3 -Estudo histoquímico 65
4.8.3.1- Reacção às Hidrolases- ATPase 66
4.8.3.2- Reacção às Desidrogenases - NADH e SDH 67
4.8.3.2.1- Reacção à NADH 67
4.8.3.2.2- Reacção à SDH 67
4.8.3.3-Coloração com PAS 68
5-DISCUSSÃO 69
6- CONCLUSÃO 102
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 104
8-ANEXOS 124

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1- Principais áreas do encéfalo……..11
Figura 2- Principais áreas neuroanatómicas para exame histopatológico……..12
Figura 3- Principais áreas neuroanatómicas para exame histopatológico……..12
Figura 4- Fibrose meníngea e alargamento dos sulcos……..24
Figura 5- Dilatação ventricular em cães de raça Boxer……..26
Figura 6- Dilatação ventricular em cães de raça Caniche……..26
Figura 7- Imagens histológicas de fibrose das meninges……..28
Figura 8- Mineralização das meninges……..28
Figura 9- Mineralização das leptomeninges e do córtex……29
Figura 10- Hialinização dos vasos das leptomeninges e do córtex……..31
Figura 11- Atrofia perivascular……32
Figura 12- Hemorragias do córtex……..33
Figura 13- Enfarte lacunar……...34
Figura 14- Enfarte hemorrágico……..34
Figura 15- Enfarte lacunar……...35
Figura 16- Enfarte lacunar e hemorrágico……35
Figura 17- Imagens de inflamação……36
Figura 18- Satelitose……37
Figura 19- Lipofuscina……..39
Figura 20-Lipofuscina intra e extraneuronal em cortes semi-finos ……..39
Figura 21-Lipofuscina intraneuronal, imagem ultraestrutural……40
Figura 22-Lipofuscina com prováveis corpos curvilíneos, imagem ultraestrutural…….40
Figura 23- Neuromelanina nos neurónios da substância negra……..41
Figura 24- Corpora Amilácea na camada molecular do cerebelo……....43
Figura 25- Esferóides axonais……44
Figura 26- Migração de células não diferenciadas da placa germinativa……44
Figura 27- Meningioma Transicional……..45
Figura 28- Adenoma misto da hipófise……..46
Figura 29- Adenoma da hipófise……47
Figura 30- Metástase de carcinoma……...48
Figura 31- Reactividade à ubiquitina na substância branca……...49
Figura 32- Reactividade à ubiquitina……..49
Figura 33- Presença de ubiquitina na substância branca e intra-neuronal……50
Figura 34- Tipos de marcação astrocitária……51
Figura 35- Evolução da intensidade de marcação anti-GFAP com a idade……52

Figura 36- Astrocitose no hipocampo……53
Figura 37- Angiopatia Amilóide Cerebral vasos do córtex……55
Figura 38- Angiopatia Amilóide Cerebral vasos do córtex……55
Figura 39- Deposição de proteína Aβ na parede dos vasos leptomeníngeos……56
Figura 40- Placas de amilóide……58
Figura 41- Placas de amilóide e angiopatia amilóide cerebral……..59
Figura 42- Reactividade astrocitária ao redor de placa de amilóide……60
Figura 43-Imunorreactividade à proteína tau……61
Figura 44- Trança neurofibrilhar……61
Figura 45- Trança neurofibrilhar……62
Figura 46- Imagem de nervo sural corado com Azul de Toluidina……63
Figura 47- Imagens histológicas de músculo deltóide……64
Figura 48- Músculo corado com Tricrómio Gomori…… ……65
Figura 49-Tipos de fibras musculares identificados através da reacção com ATPase.66
Figura 50- Reacção do tecido muscular à NADH……67
Figura 51- Reacção do tecido muscular à SDH……...68
Figura 52- Reacção do tecido muscular à coloração com PAS……68

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I - Programação do processador de tecidos para SNC……13
Quadro II - Procedimento de coloração H&E……...14
Quadro III – Anticorpos primários utilizados……16
Quadro IV- Resultados de Análises Bioquímicas……21
Quadro V – Associação entre a Fibrose e o Porte do cão……25
Quadro VI – Associação entre a Dilatação ventricular e Idade……25
Quadro VII – Associação entre a Dilatação ventricular e o Sexo……27
Quadro VIII - Associação entre a Dilatação ventricular e o Porte do Cão……..27
Quadro IX – Associação entre a Calcificação meníngea e a Idade……29
Quadro X – Associação entre a Calcificação meníngea e o Porte do cão……30
Quadro XI- Associação entre a Hialinização vascular e a Idade……...30
Quadro XII – Associação entre a Hialinização vascular e a Aβ- Córtex……..31
Quadro XIII - Associação entre Hemorragias e Idade……32
Quadro XIV- Associação entre Hemorragias e Deposição Aβ vasos córtex……..33
Quadro XV- Associação entre a Lipofuscina e a Idade……38
Quadro XVI- Associação entre os Corpora Amilácea e a Idade……...42
Quadro XVII- Associação entre a Ubiquitina na Substância branca e a Idade……..49
Quadro XVIII - Associação entre Ubiquitina neuronal e a Idade……...50
Quadro XIX- Associação entre a Astrocitose no Córtex e a Idade……..51
Quadro XX- Associação entre a Astrocitose na Substância branca e a Idade…….51
Quadro XXI- Associação entre a Amilóide vascular e a Idade……54
Quadro XXII - Associação entre Placas de Amilóide e a Idade……56
Quadro XXIII- Associação entre Placas de Amilóide e a Idade do cão correspondente à humana……...57
Quadro XXIV- Distribuição de Placas de Amilóide camadas do córtex……...58
Quadro XXV- Associação entre proteína *Tau* e a idade……60
Quadro XXVI- Tipos de fibras musculares……...66

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Relação do peso corporal com o peso do encéfalo……22
Gráfico 2- Associação entre Fibrose meníngea e a Idade……23
Gráfico 3- Associação entre a Satelitose e a Idade……37
Gráfico 4 - Associação entre os Corpora Amilácea e a Idade do cão correspondente à humana……42
Gráfico 5- Associação entre Esferóides e a Idade……43
Gráfico 6- Associação entre Amiloidose Vascular e a Idade……54

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC - Angiopatia Amilóide Cerebral
Aβ - Proteína β-amilóide
ACTH- Hormona adrenocorticotrófica
ApoE - Apolipoproteína E
APP - Proteína Precursora Amilóide
ATPase - Adenosina Trifosfatase
AR - Astrócitos reactivos
C - Fosforilação normal da proteína *tau*
CA1 – Área 1 do *Corpus ammons*
CA2 - Área 2 do *Corpus ammons*
CA4 - Área 4 do *Corpus ammons*
CPG- Corpos de Poliglucosan
DAB- Tetrahidrocloreto de 3'3 diaminobenzidina.
DPX- Dibutil-phtalate-xylene.
EMA- Antigénio epitelial de membrana
GFAP- Proteína glial fibrilhar acídica
GH- Hormona de crescimento
H&E- Coloração de hematoxilina e eosina
HP- Forma hiperfosforilada solúvel da proteína *tau*
HRP- Peroxidase
ICBAS- Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
LNIV- Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
n- Número de observações
NADH- Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Redutase
PAS – Ácido Periódico de Schiff
PBS- Tampão fosfato salino
PHF's - Proteína *tau* hiperfosforilada polimerizada em filamentos de dupla hélice
PS1- Presenilina1
SDH- Desidrogenase Succínica
SNC- Sistema Nervoso Central
SNP- Sistema Nervoso Periférico
SRD- Sem raça determinada
SUP- Sistema ubiquitina –proteosoma
TGF-β- factor β de transformação de crescimento
TNF's- Tranças neurofibrilhares

1-INTRODUÇÃO

O aumento da esperança de vida verificada no último século, nos países industrializados, trouxe um aumento de incidência das doenças neurológicas humanas, incluindo as patologias neurodegenerativas (Tayebati, 2006;Head *et al.,* 2002). As doenças degenerativas são progressivas e a maioria delas estão associadas ao envelhecimento, embora algumas também se possam manifestar nos mais novos, podendo ser hereditárias (Knopman, 1998).

A maior parte das doenças neurodegenerativas causa demência, termo genérico que indica perda de capacidades mentais e não está associado a uma entidade nosológica particular. Nos humanos, a demência refere-se a uma diversidade de síndromas caracterizadas clinicamente por alterações de memória e deterioração de funções cognitivas, com distúrbios comportamentais e comprometimento do normal comportamento diário (Knopman, 1998; Selkoe, 2001).

Os modelos animais são muitas vezes aplicados na investigação das patologias neurodegenerativas, nomeadamente na doença de Alzheimer, de Parkinson, na demência vascular, na esclerose lateral amiotrófica, na doença de Huntington, nas doenças priónicas e na esquizofrenia (Tayebati *et al.,* 2006). Aqueles são fundamentais para os avanços das ciências médicas, pois permitem o estudo dos mecanismos patogénicos e dos princípios terapêuticos do tratamento dos sintomas na doença humana (Gerlach & Riederer, 1996). A reprodução parcial das alterações neuropatológicas e cognitivas características da doença de Alzheimer, da demência vascular e da demência observada nas doenças de Parkinson e Huntington, pode representar a base para o entendimento fisiopatológico e tratamento destas patologias (Tayebati *et al.,* 2006). Apesar dos vários estudos desenvolvidos, nenhum dos modelos utilizados reproduz com exactidão as alterações comportamentais, cognitivas e neuropatológicas observadas no humano (Head *et al.,* 2002; Tayebati *et al.,* 2006).

Os cães idosos são o segmento populacional em mais rápido crescimento na actual clínica de pequenos animais. Os avanços na medicina e na nutrição proporcionaram uma maior esperança de vida aos animais de companhia, (Rofina *et al.,* 2006) como o cão e o gato, o que permitiu a sua utilização como potenciais modelos de estudo das patologias neurodegenerativas do humano (Nakayama *et al.,* 2004). A esperança de vida dos cães não é a mesma para todos, varia de acordo com a raça e tamanho, sendo que as raças gigantes têm uma menor esperança de vida do que as raças de pequeno porte (Deeb & Wolf, 1994; Patronek *et al.,* 1997). De um modo geral, os canídeos com 8 ou mais anos são considerados, por vários autores, como de idade média a idosa (Adams *et al.,* 2000; Callahan *et al.,* 2000; Head *et al.,* 1998).

Na última década aumentou muito o interesse pela investigação do processo de envelhecimento dos canídeos (*Canis familiaris*). A maior atenção concentra-se nas alterações neuropatológicas e comportamentais associadas ao envelhecimento. Este interesse tem por base dois factores: primeiro o investimento no desenvolvimento de modelos mamíferos que permitam explorar os mecanismos do envelhecimento humano e doenças crónicas associadas; o segundo factor é o interesse clínico pelas alterações comportamentais associadas à idade observadas nos cães de companhia (Ingram *et al.,* 2002).

O uso do cão como modelo de estudo do envelhecimento humano oferece várias vantagens em comparação com outros animais: 1) têm uma esperança de vida maior, entre os 12 e os 20 anos, dependendo da raça; (Cummings *et al.,* 1996[1]) 2) como animal doméstico, o cão é de fácil convívio e existem muitos exemplares; 3) os cães estão bastante motivados a participarem em testes de funções cognitivas; 4) o cão convive próximo do homem, partilha o mesmo ambiente e, por vezes, o mesmo tipo de alimentação; 5) estudos recentes verificaram que ambos partilham o mesmo tipo de alterações neuropatológicas (Cummings *et al.,* 1996[1]; Adams *et al.,* 2000). Uma outra vantagem é que o cão desenvolve de forma espontânea a acumulação do mesmo tipo de proteína β-amilóide que os humanos (Shimada, *et al.,* 1991; Cummings *et al.,* 1996[3]; Head *et al.,* 1998; Head *et al.,* 2002; Olby, 2005; Studzinski *et al.,* 2005). O mais importante argumento a favor de se utilizar o cão como modelo de estudo da doença de Alzheimer é que a sequência de aminoácidos da proteína β-amilóide observada nos canídeos idosos e nos doentes de Alzheimer é idêntica (Wóznicka *et al.,* 2006).

A maioria dos veterinários de animais de estimação está familiarizada com cães que, de acordo com os donos, parecem ter ficado senis (Olby, 2005; Rofina *et al.,* 2006). Os sinais descritos incluem a desorientação em ambientes familiares, incontinência activa, alteração do padrão de sono, (Cummings *et al.,* 1996[1]; Siwak *et al.,* 2002; Frank, 2003; Rofina *et al.,* 2004) perda de comportamento doméstico aprendido, diminuição de interacção com os donos, vaguear constante, perda de audição e de visão, entre outros (Landsberb *&* Ruehl, 1997; Siwak *et al.,* 2002; Frank, 2003). Este amplo espectro de alterações comportamentais é um paralelo com o observado nos humanos com demência (Siwak *et al.,* 2002).

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência no Homem, atingindo aproximadamente 67% dos pacientes com demências (White *et al.,* 1996; Ritchie & Lovestone, 2002; Hirtz *et al.,* 2007;). A maioria dos casos é diagnosticada após os 65 anos. A dramática perda de autonomia causada pelos sintomas comportamentais e cognitivos representa um dos maiores desafios da medicina moderna (Head *et al.,* 2002; Tayebati *et al.,* 2006).

A apresentação clínica dos pacientes com Alzheimer é dominada por défices cognitivos e alterações emocionais que resultam da disfunção e degenerescência de neurónios do sistema límbico e outras zonas do córtex cerebral (Mattson, 2002). É caracterizada por uma progressiva perda de funções intelectuais, memória, habilidade linguística, orientação espacial e temporal, acompanhada por perda de capacidade para executar tarefas de rotina diárias, alterações de personalidade e humor, depressão, agitação, ansiedade ou alucinações, dificuldade em reconhecer familiares e amigos (Ingram *et al.,* 2002). O diagnóstico clínico é baseado na observação de um quadro clínico compatível e na exclusão de outras causas de demência por meio de exames laboratoriais e de neuroimagem estrutural (McKhann *et al.,* 1984). O diagnóstico definitivo é confirmado *pós-morten* por exame neuropatológico, (Cotman & Head, 2002; Ingelsson *et al.,* 2004) embora, os recentes avanços nas técnicas de neuroimagem e pesquisa de biomarcadores no líquido cefaloraquidiano, tais como a proteína *tau* e a proteína β- amilóide (Aβ), permitam realizar um diagnóstico presuntivo em vida (Akiyama *et al.,* 2000; Münch *et al.,* 2003;van der Flier *et al.,* 2005).

Macroscopicamente, o cérebro dos pacientes com Alzheimer apresenta uma redução do peso, com atrofia principalmente do cortéx fronto-temporal, um alargamento dos sulcos e dilatação ventricular (Glenner & Wong, 1984; Esiri *et al.,* 2002). O processo degenerativo afecta inicialmente o hipocampo, com posterior comprometimento de outras áreas corticais. Esta distribuição do processo neuropatológico faz com que o quadro clínico da doença seja caracterizado por alterações cognitivas e comportamentais, com preservação do funcionamento motor e sensorial até às fases mais avançadas da doença. As estruturas subcorticais são normalmente poupadas, com excepção da amígdala, que é severamente afectada (Esiri *et al.,* 2002). As principais características neuropatológicas são a presença de um grande número de placas senis, constituídas por agregados extracelulares de proteína β-amilóide, (Glenner & Wong, 1984; Mattson, 2002; Ingelsson *et al.,* 2004) rodeadas por neurites distróficas, tranças neurofibrilhares (TNF's) intracelulares, compostas por proteína *tau* hiperfosforilada (Grundke-Iqbal *et al.,* 1986; Goedert, 1993; Ingelsson *et al.,* 2004), perda neuronal (Mizutani *et al.,* 1990; Gomez-Isla *et al.,* 1996; Esiri *et al.,* 2002) e um aumento de astrócitos e da microglia (Esiri *et al.,* 2002). Cerca de 80% dos casos de Alzheimer também apresentam deposição vascular de proteína β-amilóide nos vasos cerebrais (Masters *et al.,* 1985).

No entanto, a presença de placas e tranças neurofibrilhares não é característica específica desta patologia. Também se observam no cérebro de adultos idosos sem sinais clínicos de demência e nos doentes afectados com síndroma de Down, (Esiri *et al.,* 2002) apesar das placas, observadas nestes casos, serem maioritariamente do tipo difuso em

contraste com o tipo neurítico que predomina na doença de Alzheimer (Braak & Braak, 1991;Giannakopoulos *et al.,* 2003).

Nos cães idosos é frequente observar uma alteração cognitiva semelhante à verificada nos doentes com Alzheimer (Cummings *et al.,* 1993;Ruehl *et al.,* 1997). Essa síndroma de envelhecimento foi designada de Síndroma de Disfunção Cognitiva, embora muitos neurologistas e etologistas não se sintam ainda familiarizados com a actual definição da doença e com o que ela inclui (Nielson *et al.,* 2001).

Em 1997, Landsberg e Ruehl (1997) descreveram, nos cães, uma Síndroma de Disfunção Cognitiva, tipicamente observada em animais com mais de 9 anos e caracterizada por sinais como a desorientação, diminuição de resposta a estímulos, diminuição de interacção com os donos, lentidão em responder a determinados comandos, alteração no ritmo de sono e irritabilidade (Dimakopoulos *et al.,* 2002; Landsberg & Araújo 2005). Estas alterações comportamentais são classificadas em quatro categorias designadas por: a) perda de capacidades cognitivas e de reconhecimento; b) perda de rotinas diárias; c) desorientação; d) alterações no ritmo de sono. (Frank, 2003) O declínio cognitivo manifesta-se durante um longo período de tempo, de 18 a 24 meses ou mais (Milgram *et al.,* 1994; Cummings *et al.,* 1996[1]). Geralmente, os proprietários detectam os primeiros sinais clínicos em cães com idade superior a 11 anos contudo, em ambiente laboratorial, já foram descritas alterações da performance cognitiva a partir dos 8 anos de idade, sendo esta característica variável com a raça (Cumming's *et al*., 1996[1]; Landsberg, 2002).

Durante o envelhecimento, os cães idosos evidenciam uma vasta sintomatologia indicativa de deterioração cognitiva, (Adams *et al.,* 2000[2]; Head *et al.,* 1995; Milgram *et al.,* 1994; Torp *et al.,* 2000[1]; Torp *et al.,* 2000[2]; Tapp *et al.,* 2004) mas nem todas as funções sofrem o mesmo grau de deterioração (Milgram *et al.,* 1994; Callahan *et al.,* 2000). À semelhança do que se verifica no envelhecimento dos humanos, também os cães envelhecem de forma individual, (Cummings *et al.,* 1996[1]; Adams *et al.,* 2000; Head *et al.,* 2002[3]) e as diferentes funções cognitivas diminuem em graus distintos (Adams *et al*., 2000). A aprendizagem de regras simples, o discernimento de conhecimentos elementares e os comportamentos adquiridos permanecem intactos (Milgram *et al.,* 1994) porém, as deficiências em funções executivas e visuoespaciais (a capacidade para localizar um objecto no espaço) ocorrem com grande incidência nos animais idosos e podem ser detectadas em animais com idades superiores a 6 anos (Adams *et al.,* 2000[2]). Baseado na variabilidade da performance, os cães idosos podem ser classificados em grupos cognitivamente intactos, moderada ou severamente debilitados (Cummings *et al.,* 1996[1]; Adams *et al.,* 2000[2]). Estas categorias são análogas à do humano:

envelhecimento bem sucedido; alterações cognitivas moderadas e demência, respectivamente (Adams *et al.,* 2000; Rofina *et al.,* 2007).

Outras condições neurológicas e médicas podem causar alterações semelhantes, de modo que deve ser realizado um cuidadoso diagnóstico diferencial, (Frank, 2003;Shull, 2002) através de exame clínico e caracterização das alterações comportamentais verificadas. Os canídeos com alterações metabólicas causadas por insuficiência renal ou hepática podem manifestar alterações de comportamento semelhantes às da síndroma de disfunção cognitiva (Parker, 1995). Doenças metabólicas, inflamatórias e infecciosas, neoplasias, alterações vasculares, tóxicos, disfunções do ouvido interno, factores ambientais, físicos e medicamentosos devem ser excluídos antes de classificar o tipo de alteração do comportamento (Landsberg & Ruehl, 1997; Olby, 2005; Shull, 2002;Rofina *et al.,* 2006).

Estudos realizados separadamente por dois grupos, Colle *et al.,* (2000) e Kiatipattanasakul *et al.,* (1996) desenvolveram questionários com o objectivo de classificar os comportamentos, de modo a estabelecer correlações entre as alterações de comportamento e uma patologia semelhante à verificada no envelhecimento e demência tipo Alzheimer (Siwak *et al.,* 2002; Rofina *et al.,* 2006). A correlação entre as alterações comportamentais verificadas no cão com uma patologia tipo Alzheimer, caracterizada por aspectos tais como a atrofia cerebral, deposição de proteína β-amilóide com placas senis ao nível do hipocampo e córtex frontal (Cummings *et al.,* 1996[3]; Head *et al.,* 1998; Colle *et al.,* 2000) e a acumulação de produtos resultantes de alterações oxidativas reforçam a importância deste tipo de questionários no diagnóstico de alterações tipo Alzheimer (Rofina *et al.,* 2006).

Os primeiros relatos referentes à neuropatologia canina associada ao envelhecimento surgiram em 1914, quando Lafora referiu que as dendrites das células CA1 piramidais do hipocampo sofriam alterações semelhantes às verificadas nos humanos. Quarenta anos mais tarde, em 1956, Braunmühl descreveu a primeira placa senil "tipo Alzheimer" em cães idosos, observada em colorações de prata (Cummings *et al.,* 1996[1]). À mesma conclusão chegaram dois outros investigadores nos anos 60, Osetowska e Dahme (Cummings *et al.,* 1996[1]). Nos anos seguintes, Wisniewski e colaboradores (1996) estudaram tecido nervoso de cão em microscopia óptica e electrónica e comprovaram a presença de fibrilhas β-amilóide em placas e a existência de depósitos positivos ao vermelho do Congo (Cummings *et al.,* 1996[1]). Colocou-se assim a hipótese de as alterações neuropatológicas que se desenvolvem nos canídeos seriam idênticas às verificadas nos humanos idosos e com demência (Head *et al.,* 2002; Studzinski *et al.,* 2005; Cumming's *et al.,* 1996[1]).

No cão, a principal alteração neuropatológica descrita, associada ao envelhecimento, é a deposição de proteína β-amilóide, principalmente na forma $A\beta_{1-42}$, nos neurónios e terminações sinápticas, numa fase inicial do processo. Estes depósitos dão depois lugar à formação de placas senis na forma difusa. Outras características acompanham o processo neurodegenerativo, entre elas a acumulação de lipofuscina, (Ferrer *et al.,* 1993) alterações no citoesqueleto, (Cummings *et al.,*. 1996[1]; Borras *et al*., 1999; Su *et al.,* 1998;Barsoum *et al.,* 2000) alterações vasculares, diminuição no volume do cérebro, (Su *et al.,* 1998; Su *et al.,* 2005; Tapp *et al.,* 2004,2006) com atrofia do córtex cerebral e dilatação ventricular, (Morys *et al.,* 1994;Su *et al.,* 1998) aumento da concentração de marcadores de stress oxidativo, (Papaioannou *et al.,* 2001;Head *et al.,* 2002; Rofina *et al.,* 2004; Skoumalova *et al.,* 2003) perda neuronal (Morys *et al.,* 1994;Su *et al.,* 1998; Siwak-Tapp *et al.,* 2006) e apoptose (Anderson *et al.,* 2000; Kiatipattanasakul *et al.,* 1996). O envolvimento da ubiquitina é discreto, mas consistente e provavelmente contribui para alguns aspectos críticos associados à neuropatologia. No cão, raramente se observam placas com núcleos de amilóide e tranças neurofibrilhares (TNF's), (Cummings *et al*.1996[1]; Nakayama *et al.,* 2004;Olby, 2005;Dimakopulos & Mayer, 2002; Rofina *et al.,* 2006) uma das principais características neuropatológicas da doença de Alzheimer (Frank, 2003).

O envelhecimento também provoca lesões selectivas no sistema nervoso periférico (SNP) à semelhança do que acontece em áreas centrais do sistema nervoso. Na periferia, os neurónios sensoriais mielinizados, seus axónios e respectivas conexões centrais são particularmente vulneráveis ao envelhecimento. O efeito da idade na estrutura destes neurónios, em particular, está correlacionado com alguns dos principais sinais do envelhecimento, que inclui amplos défices funcionais, nomeadamente do sistema mecanoreceptivo. As alterações associadas ao envelhecimento são mais proeminentes nos axónios mielinizados do que nos não mielinizados, o que está de acordo com a severidade de lesões dos nervos sensitivos e défices sensoriais funcionais. Os receptores mais susceptíveis são os mecanoreceptores da pele e músculos cujos axónios são mielinizados (Cowen *et al.,* 2005).

A patologia muscular associada ao envelhecimento humano está relacionada com o desuso ou com a existência de atrofia neurogénica, enquanto que as miopatias inflamatórias são mais comuns nos adultos (Cowen *et al.,* 2005).

Nos canídeos as miopatias não são frequentes, mas quando se manifestam são de difícil diagnóstico. Para o seu diagnóstico torna-se necessário recorrer a métodos complementares como o doseamento de enzimas séricas de origem muscular, ao electromiograma, à ecografia e principalmente à biópsia muscular, uma vez que a maioria das lesões musculares só podem ser detectadas por microscopia. Só conhecendo a

estrutura normal do músculo é possível interpretar as lesões e relacioná-las com as manifestações clínicas (Mercado *et al.,* 2003).

O cão aparece cada vez mais como um modelo de estudo do envelhecimento e doença de Alzheimer devido à semelhança das alterações neuropatológicas e cognitivas. Estudos, que abranjam a caracterização cognitiva e o estudo neuropatológico, poderão ser mais um contributo na teoria de correlação entre a extensão dos depósitos de proteína β-amilóide e a performance cognitiva (Cummings *et al.,* 1996[3]; Head *et al.,* 1998;Colle *et al.,* 2000). O estabelecimento desta correlação nos canídeos é um forte suporte do papel deste tipo de neuropatologia na etiologia da demência (Ingram & Wiliams, 2002). O conhecimento dos mecanismos associados ao desenvolvimento destas doenças poderá contribuir para o desenvolvimento de fármacos que retardam a evolução da neurodegenerescência, melhoram a qualidade de vida e aumentam a longevidade dos doentes.

No âmbito do curso de Mestrado em Medicina-Legal sugerimos, como tema de tese, um trabalho que pretende contribuir para a caracterização neuropatológica do envelhecimento nos canídeos e reforçar a importância do cão como modelo de estudo do envelhecimento humano e da doença de Alzheimer.

2-OBJECTIVOS

Este trabalho pretende contribuir para a caracterização das alterações neurodegenerativas do Sistema Nervoso do cão associadas ao envelhecimento e verificar as suas semelhanças com o envelhecimento humano e a doença de Alzheimer.

Desta forma, as principais etapas do trabalho consistiram em:

- Aprender as técnicas de rotina neuropatológica, incluindo o corte do encéfalo;

- Reconhecer macroscopicamente as áreas neuroanatómicas mais importantes para o diagnóstico das principais patologias em particular as associadas ao processo de envelhecimento;

- Descrever lesões neurodegenerativas e outras, identificar as relacionadas com a idade, comparando-as com as alterações neuropatológicas encontradas na doença de Alzheimer e no envelhecimento humano;

- Estudar a estrutura normal do músculo deltóide e nervo sural e tentar encontrar alterações neuromusculares relacionadas com o envelhecimento.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Amostras

Neste trabalho foram estudados setenta (70) encéfalos de canídeos de várias raças, com idades compreendidas entre os 1 e 18 anos de idade, 45 machos e 25 fêmeas, distribuídos em 3 classes de acordo com a idade: 16 canídeos com idades entre 1 e 7 anos (classe I); 24 com idades entre os 8 e os 12 anos (classe II); e 30 com idade igual ou superior a 13 anos (classe III). Neste grupo de amostras foram criados, adicionalmente, outros dois escalões etários (<65 anos, n=33; ≥65 anos, n=37) de acordo com a Tabela I dos Anexos que estabelece a relação entre a idade de um cão e a de um ser humano, tendo em conta o parâmetro peso.

Os canídeos foram também agrupados segundo a classificação proposta por Goldston & Hoskins (1999) para o porte, tendo em consideração o seu peso em Kg, independentemente da raça ou idade em: porte pequeno (peso≤9 Kg;n=34); porte médio (peso entre 9,5kg e 23kg;n=18); porte grande (peso entre 23,5kg e 40kg;n=15); e porte gigante (peso ≥40,5kg;n=3).

Os animais incluídos no estudo eram na maioria de raça indeterminada (n=30), estando também representadas as raças Caniche (n=14), Boxer (n=6), Pastor Alemão (n=6), Pequinês (n=5), Pincher (n=3), Rotweiller (n=3), Perdigueiro (n=2) e Malamute (n=1).

Os animais foram provenientes de vários locais: do Canil Municipal do Porto (n=34), recolhidos na rua ou entregues para eutanásia pelos proprietários; do Serviço de Anatomia Patológica do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária em Vairão (n=29); das aulas práticas de Patologia e Anatomia Patológica do curso de Medicina Veterinária do Instituto de Biomédicas Abel Salazar (n=7).

3.2- Métodos

3.2.1-Dados Clínicos e Avaliação das Funções Cognitivas

Os dados clínicos recolhidos, como a idade, a raça e o género foram os registados pelos clínicos, nas folhas de requisição para exame anatomopatológico e os dados preenchidos pelo proprietário ou clínico, na folha de recepção do canil. No caso de existirem dúvidas sobre a idade do animal, esta era confirmada através da dentição. A causa provável de morte ou eutanásia foi determinada de acordo com os dados observados na necrópsia.

Com base em modelos desenvolvidos por estudos anteriores, (Colle *et al*., 2000; Kiatipattanasakul *et al.,* 1996) foi elaborado um inquérito cujo objectivo era avaliar a performance cognitiva dos cães e correlacionar as alterações de comportamento e défices cognitivos existentes com as alterações neuropatológicas observadas no cérebro, nomeadamente com os depósitos de proteína β-amilóide (Tabela II dos Anexos).

Os inquéritos foram entregues no Canil Municipal do Porto e foi realizada uma sensibilização dos funcionários, responsáveis pela eutanásia dos animais, para tentarem obter a informação necessária ao preenchimento completo dos inquéritos.

3.2.2- Recolha de sangue para análise bioquímica

Neste estudo foram realizadas análises bioquímicas a 26 soros de animais provenientes do canil, para avaliar possíveis alterações metabólicas. A determinação bioquímica compreendeu o doseamento dos níveis de glucose, creatinina, ureia e transaminase (ALT/GPT).

Os níveis de glucose foram avaliados através de um glucómetro; a creatinina, ureia e transaminases foram medidas por bioquímica seca em laboratório de análise clínicas humano (Radelfe - Laboratório de Análises Clínicas, Dr. Adriano Silva Lopes).

3.2.3- Necrópsia com colheita de encéfalo

O processo de extracção do SNC consistiu em separar a cabeça do animal pela articulação atlanto-occipital, remover a pele e as maiores massas musculares, fazendo depois um corte transversal no crânio sobre o osso frontal, caudal ao processo zigomático. Em seguida realizavam-se dois cortes sagitais, medialmente aos côndilos occipitais e um último corte, transversal, no osso occipital, acima do *foramen magnum.* Retirava-se a tenda do cerebelo e o revestimento pela dura mater. Por fim, com a cabeça invertida, o cérebro era removido fazendo uma suave tracção, cortando a parte superior da medula espinal, as artérias carótidas internas e os nervos cranianos.

O encéfalo era imediatamente submerso em formol a 10% e identificado com um "C" referente a canídeo, seguido por numeração sequencial de 1 a 70. Exemplo: C1 (Canídeo número 1).

Foram registadas todas as lesões observadas na necrópsia e colhidos fragmentos dos diferentes órgãos para formol a 10%.

3.2.4- Estudo macroscópico do encéfalo

Após a remoção do encéfalo foi realizado um exame macroscópico para detectar eventuais alterações. O exame macroscópico compreendeu uma minuciosa observação quanto aos seguintes aspectos: peso (gramas), cor, consistência, assimetrias, aspecto das circunvoluções, existência de opacidade e exsudados das meninges.

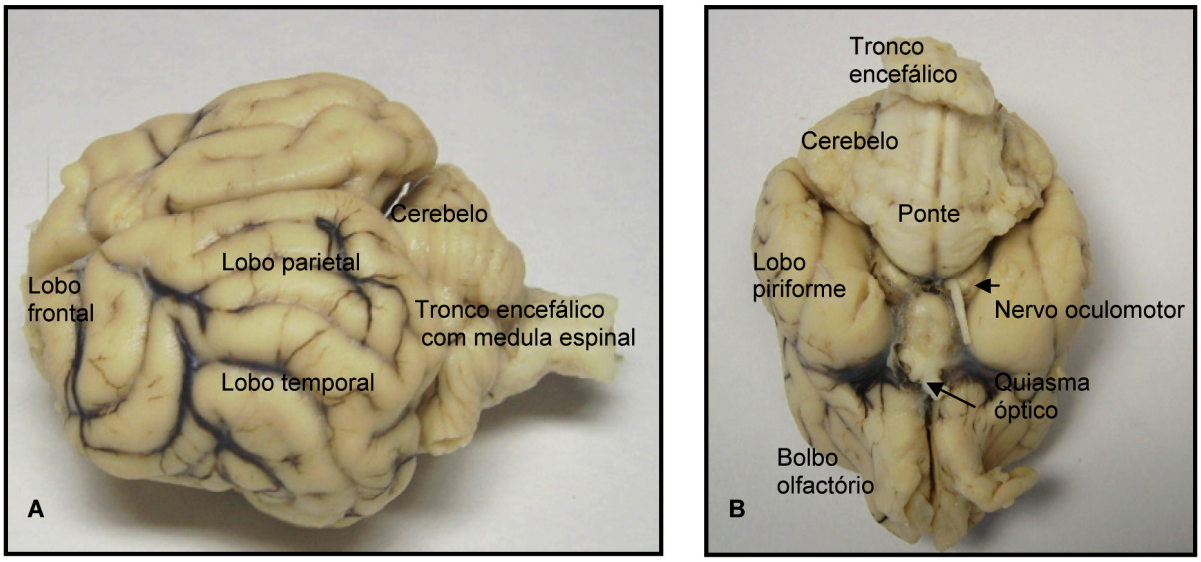


Fig.1 - Principais áreas do encéfalo. **A**: Vista dorso-lateral, C23**; B:** Vista ventral, C27.

3.2.4.1- Corte e selecção das áreas neuroanatómicas

O encéfalo foi cortado depois de bem fixado, cerca de 1 mês após o início da fixação, com o cuidado de mudar o formol com frequência. Foram realizados cortes coronais, com cerca de 2-4 mm de espessura, no sentido do lobo frontal até à medula espinal. Os cortes foram dispostos por ordem, para o exame macroscópico e selecção das áreas para exame histológico, de forma a reconstruir o cérebro em caso de ser necessário um novo exame. O exame macroscópico dos cortes compreendeu uma cuidadosa observação dos seguintes aspectos: assimetria dos hemisférios cerebrais, tamanho ventricular, presença de malformações, edema, hemorragia, enfarte ou lesões tumorais.

As áreas para o exame histológico foram seleccionadas de acordo com a localização anatómica das lesões observadas, mas incluindo sempre as 10 áreas bilaterais assinalas nas figuras seguintes (Fig.2 e Fig.3):

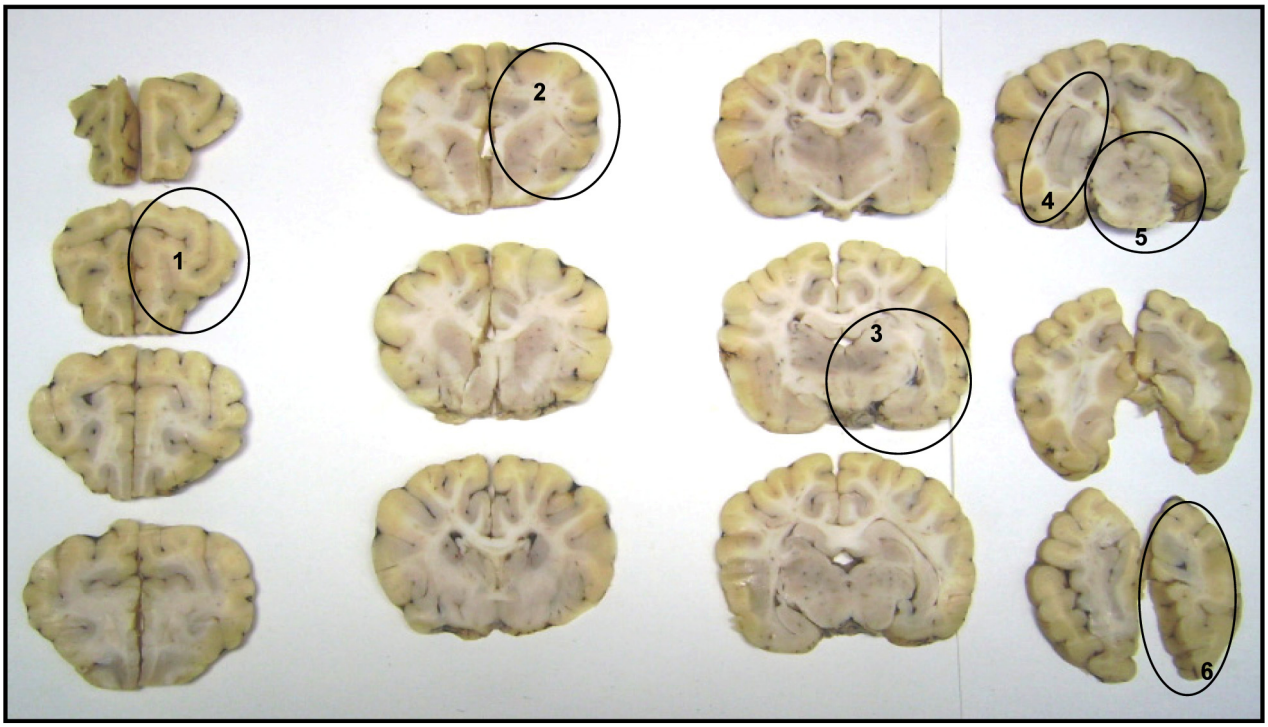


Fig. 2 - Principais áreas neuroanatómicas para exame histopatológico.**1:** lobo frontal**. 2:** gânglios da base**. 3:** tálamo**. 4:** hipocampo**. 5:** mesencéfalo**. 6:** lobo occipital.

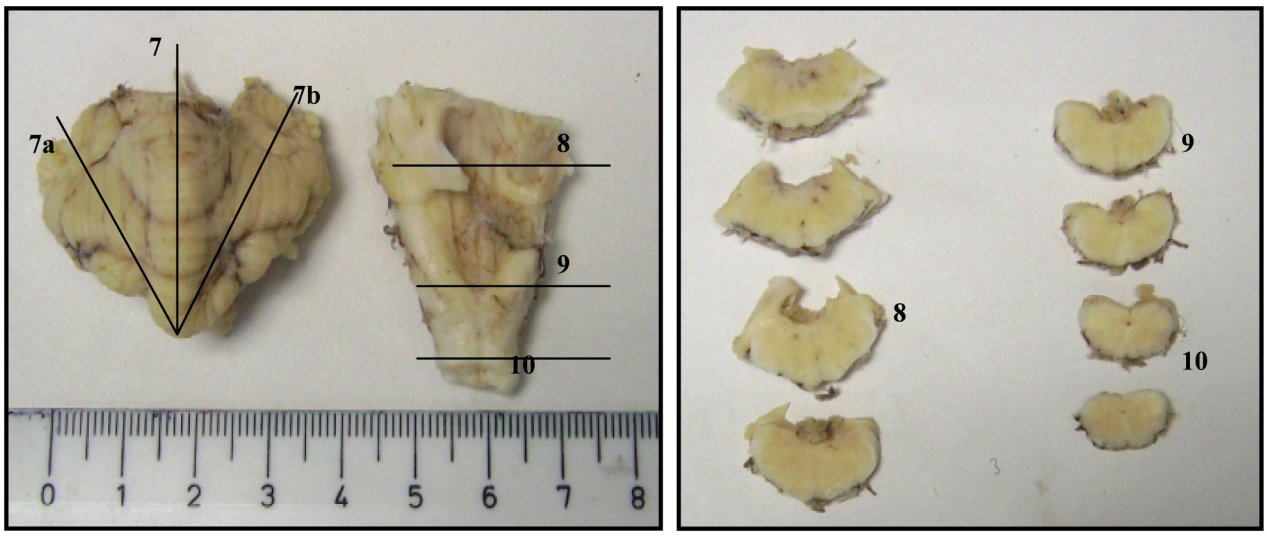


Fig.3-Principais áreas neuroanatómicas para exame histopatológico.**7**: Vermis do cerebelo. **7a e 7b**: Hemisférios cerebelosos. **8**: protuberância. **9**: bolbo raquidiano. **10**: medula espinal.

3.2.4.2 – Método de avaliação de alterações macroscópicas

A avaliação das alterações macroscópicas (fibrose meníngea e dilatação dos ventrículos laterais) foi feita do seguinte modo:

a) Qualitativa, de acordo com a presença ou não das lesões em: (Ausente/Presente);

b) Semi-quantitativa, de acordo com a extensão e intensidade de fibrose e de dilatação dos ventrículos, por comparação de amostras de cães idosos com outros mais jovens em: Ausente (-); Pouco evidente (+); Evidente (++); Muito evidente (+++).

3.2.5- Estudo Histopatológico

Os cortes coronais, incluindo córtex e substância branca de lobo frontal e temporo--parietal, tálamo, hipocampo, cerebelo, mesencéfalo, protuberância e bolbo raquidiano foram processados de acordo com o procedimento descrito no Quadro I.

Quadro I - Programação do processador de tecidos para SNC

Reagente	***Tempo***
1º Formol tamponado	3 horas
2º Formol tamponado	2 horas e 30 minutos
3º Formol tamponado	1 hora 15 minutos
1º Álcool 90º ⟶ 2º Álcool 90º	1 hora cada
1º Álcool 100º ⟶ 2º Álcool 100º	1 hora cada
Xilol (3 vezes)	1 hora cada
Parafina (2 vezes)	2 horas cada

Depois de incluídos em parafina e seccionados a 3 µm foram corados pela coloração de H&E utilizando o seguinte protocolo:

Quadro II - Procedimento de coloração H&E

Reagente	***Tempo (minutos)***
Xilol (2 passagens)	5 cada
Álcool absoluto **(**2 passagens)	5 cada
Álcool 96º	2
Álcool 70º	2
Água corrente	2
Hematoxilina Mayer's (Ref. S3309-Dako)	5
Água corrente	5
Álcool 96º	1
Eosina Alcoólica (Ref. 6766007, Shandon-Garal,)	1
Álcool 96º	Passagem de esguicho
Álcool absoluto	Passagem rápida
Xilol (2 passagens**)**	2

As lâminas foram montadas em Entellan e observadas ao microscópio óptico.

3.2.5.1- Características histológicas

Foram avaliadas as seguintes características histológicas, com a coloração H&E:

- Reacções inespecíficas e reactivas do SNC;
- Alterações vasculares (edema, hemorragias, enfartes, hialinização vascular);
- Inflamação;
- Presença de inclusões (corpos de Lafora, corpora amilácea), esferóides axonais, acumulação de lipofuscina e neuromelanina;
- Presença de tumores e malformações.

3.2.5.2 – Métodos de avaliação das características histológicas

A avaliação das lesões identificadas histologicamente foi feita do seguinte modo:

a) Qualitativa (Ausente/ Presente);

b) Semi-quantitativa, de acordo com a extensão do tecido afectado (calcificação, hemorragias) ou frequência verificada nas várias áreas estudadas, por comparação das amostras, em: Ausente (-); Pouco frequente (+); Frequente (++); Muito frequente (+++).

3.2.6- Estudo imunohistoquímico

Neste trabalho foi estudada a imunoreactividade de duas áreas neuroanatómicas, córtex e substância branca de lobo frontal e hipocampo, a quatro anticorpos: a imunoreactividade astrocitária (anti-GFAP); a extensão e localização da acumulação de proteína β-amilóide (clone 6F/ 3D); a presença de proteínas de degradação proteolítica e inclusões positivas à ubiquitina; existência de alterações no citoesqueleto das células nervosas imunorreactivas à proteína *tau.* Os anticorpos foram inicialmente testados em tecido nervoso normal de cão para confirmar a sua aplicação na espécie, optimizar a diluição e averiguar a necessidade de realizar tratamento térmico ou proteolítico para aumentar a expressão dos epítopos e incrementar a imunoexpressão.

3.2.6.1-Preparação dos cortes e procedimento

Para a realização de exames imunohistoquímicos foram efectuados cortes de parafina de 3 µm de espessura, colados em lâminas adesivadas.

Após desparafinação e hidratação, os cortes histológicos foram submetidos a tratamento térmico em tampão citrato 0.01M (pH6) no microondas (750W) durante 20 minutos, no caso do anticorpo anti-GFAP e anticorpo anti-*tau.* O anticorpo anti-Aβ sofreu um pré-tratamento com ácido fórmico durante 2 minutos. O anticorpo anti-ubiquitina não foi sujeito a qualquer tipo de pré-tratamento. Posteriormente as preparações foram incubadas durante 10 minutos numa solução de Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) a 3% para bloquear a actividade da peroxidase endógena. A imunorreactividade inespecífica foi eliminada através da incubação durante 5 minutos em soro normal (*Ultra-V-Block*-Universal). A seguir as preparações foram a incubar com o soro primário, de acordo com o descrito no seguinte Quadro III.

Quadro III – Anticorpos primários utilizados

Anticorpo	*Tipo*	*Referência*	*Diluição*	*Procedimento*
GFAP	Policlonal	Dako, ZO334	1:2500	Pré-tratamento em microondas com tampão citrato; incubação 30 minutos
β- Amilóide (clone 6F/3D)	Monoclonal	Dako, M0872	1:50	Pré-tratamento com ácido fórmico; incubação 30 minutos
Ubiquitina	Policlonal	Dako, ZO458	1:150	Incubação 30 minutos
Tau	Policlonal	Dako, AOO24	1:1150	Pré-tratamento em microondas com tampão citrato durante 20 minutos; incubação 30 minutos

Após exposição ao anticorpo primário, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente, com soro de ligação secundário biotinilado anti-carneiro (*Labvision).* Para amplificar o reconhecimento dos epítopos foi utilizado o complexo Streptavidina-Biotina HRP durante 20 minutos (*Labvision)*. A reacção da peroxidase foi visualizada usando como cromogénio o tetrahidrocloreto de 3'3 diaminobenzidina-DAB (*Sigma*) durante cerca de 8 minutos. A reacção foi interrompida com PBS e seguidamente as preparações foram contrastadas com hematoxilina de Harris durante 2 minutos, diferenciadas em água amoniacal, diafanizadas e montadas com DPX (Dibutil-phtalate-xylene).

3.2.6.2-Métodos de avaliação da imunorreactividade

A avaliação da imunorreactividade foi baseada nos seguintes critérios:

6.2.1- Qualitativa: Presente/ Ausente

6.2.2- A avaliação semi-quantitativa dos resultados foi efectuada de acordo com a seguinte escala, em objectiva de 10x:

(-) - Marcação ausente

(+) - Marcação moderadamente positiva

(++) - Marcação positiva

(+++) - Marcação muito positiva

Foi considerada imunorreactividade positiva à proteína Aβ quando a marcação ocorria nos vasos das leptomeninges e do córtex, ou no neurópilo sob a forma de placas.

A imunorreactividade astrocitária à proteína GFAP foi avaliada pela intensidade de coloração dos astrócitos do córtex e da substância branca.

A presença de proteínas de degradação proteolítica e inclusões imunorreactivas à ubiquitina foi avaliada através do número de inclusões de corpos ubiquitários existentes no córtex e na substância branca.

Foi considerada imunorreactividade positiva à proteína *tau* a marcação no citoplasma das células neuronais, independentemente do grau de intensidade de marcação.

3.2.7- Estudo de nervo e músculo

Com o objectivo de estudar a existência de alterações neuromusculares, foram realizadas colheitas de músculo deltóide e nervo sural em seis cães, cinco idosos e um jovem controlo.

3.2.7.1- Colheita de nervo

A colheita de nervo sural consistiu na incisão da pele com remoção de um pequeno fragmento de nervo, com cerca de 4 a 5cm, posterior ao maléolo lateral, entre o tendão de Aquiles e o maléolo. As veias safenas menores eram observadas abaixo da pele incisada e o nervo sural ficava localizado medialmente em relação às veias safenas. Após remoção do fragmento de nervo, ambas as extremidades foram amarradas a um fio de sutura. Uma das extremidades foi, posteriormente fixada, com a ajuda do fio de sutura, a um parafuso com peso aproximado de 2 gramas, para fazer o estiramento.

O fragmento foi colocado em recipiente com glutaraldeído a 1.25%, introduzindo primeiro a extremidade com o parafuso e prendendo o fio da outra extremidade na abertura do recipiente, usando para esse fim a rolha do mesmo. O fragmento de nervo ficou suspenso pelo peso do parafuso e totalmente submerso, de modo a obter um bom estiramento.

Já no laboratório, o fragmento de nervo foi manuseado com muito cuidado para não ser danificado e as extremidades cortadas com lâmina de barbear e ajuda de uma pinça. Com a lâmina cortou-se um fragmento transversal de nervo com cerca de 3mm, que se conservou em glutaraldeído. Ao restante nervo retirou-se o perinervo e tecido de sustentação. Por fim, dissociaram-se alguns fascículos nervosos para a realização de cortes semi-finos que foram corados com Azul de Toluidina.

3.2.7.2-Colheita de músculo

Com o auxílio de uma pinça e lâmina de bisturi, retirou-se um pequeno fragmento cilíndrico de músculo deltóide que se colocou em recipiente estéril e foi mantido refrigerado até ser entregue no Laboratório de Neuropatologia do Hospital Geral de Santo António.

As fibras musculares esqueléticas contêm enzimas que permitem diferenciar as fibras em tipos fisiológicos e dão informações de grande importância para o diagnóstico. Para aproveitar este potencial, o fragmento de músculo não foi fixado por agentes químicos, pois estes inactivam a actividade enzimática. Por esse motivo, o músculo foi congelado após a colheita, enquanto as células ainda estavam preservadas e a actividade enzimática e ultraestrutura intactas. Os fragmentos de músculo destinados à técnica de histoenzimologia foram congelados em Isopentano, arrefecido à temperatura do azoto líquido, para evitar a formação de cristais. Antes de congelar a amostra, esta foi observada à lupa de forma a orientarem-se os fragmentos para se obterem cortes transversais das fibras musculares.

Para cada exame de músculo executou-se um protocolo que englobou as seguintes colorações no material congelado: H&E; Tricrómio de Gomori; PAS (Periodic Acid-Schiff reaction); reacção da Adenosina Trifosfatase (ATPase) com pré-incubações a pH 4.35 (10 minutos) e pH 9,4 (10 minutos); reacção às desidrogenases, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo redutase (NADH) como marcador da capacidade oxidativa das fibras musculares e a Desidrogenase Succínica (SDH), enzima mitocondrial que indica a capacidade de uma fibra individual para o metabolismo aeróbio.

3.2.8- Microscopia Electrónica

Em quatro canídeos idosos foram realizados estudos ultraestruturais de fragmentos de lobo frontal e temporal.

Os fragmentos foram fixados em glutaraldeído 4% seguido duma fixação em glutaraldeído a 2,5%. Este último reagente interage com as proteínas estabilizando-as o que causa modificações mínimas na ultraestrutura celular. Como a fixação primária com o glutaraldeído, apesar da rápida estabilização da estrutura celular, não fixa os lipídeos foi realizada uma fixação com tetróxido de ósmio a 1%. Este fixador reage com as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, sendo um bom fixador de carácter geral que pode ser utilizado isoladamente, mas possui uma baixa penetração nos tecidos e causa uma reacção escura.

Os fragmentos obtidos fixaram-se, em forma de pedaços rectangulares, com cerca de 2 a 3 mm, obtidos por corte com lâmina de barbear e o auxílio de uma lupa. As amostras foram depois incluídas numa resina sintética (Epon), cortadas a uma espessura de 1µ e coradas, a quente, em Azul de Toluidina a 1% com Bórax, durante cerca de um minuto (até sairem vapores), lavadas em água corrente e novamente colocadas na placa quente a secar. Por último foram montadas em DPX. Os cortes obtidos denominam-se de semi-finos.

A partir dos cortes semi-finos, seleccionaram-se as áreas de maior interesse para a realização de ultrafinos. Os cortes ultrafinos foram recolhidos sobre grelhas de cobre/ ruténio de 200 Mês e observados ao microscópio electrónico após a coloração executada com sais de metais pesados, como o acetato de uranilo saturado e o citrato de chumbo a 1%, que permitiram um contraste adequado do tecido submetido ao feixe de electrões.

3.3- Análise Estatística

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e percentagens. Na análise da relação entre os diferentes parâmetros biológicos estudados, dicotomizados em presente/ausente, e a idade, (categorizada em 3 grupos: 0-7; 8-12 e ≥13 anos), foi utilizado o teste de χ^2 de independência de Pearson. Nos casos de tabelas de contingência de *2x2,* com mais de 20% de células com valores esperados inferiores a 5, foi utilizado um método probabilístico exacto: Teste exacto de Fisher (Cochran, 1954). As associações encontradas foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

O mesmo procedimento estatístico foi utilizado no estudo da relação entre o porte do cão, (porte pequeno, médio, grande e gigante) e os parâmetros biológicos, bem como entre a idade do cão correspondente à do homem, em função do peso (< 65 e ≥ 65 anos) e os mesmos parâmetros.

4- RESULTADOS

4.1-Dados clínicos

No nosso estudo abrangeu setenta canídeos, 45 (64,3%) machos e 25 (35,7%) fêmeas, com idades compreendidas entre 1 e 18 anos, distribuídos em 3 classes de acordo com a idade: 16 (22,8%) canídeos com idades entre 1 e 7 anos; 24 (34,3%) canídeos com idades entre os 8 e os 12 anos; e 30 (42,9%) canídeos entre os 13 e os 18 anos. A maioria dos animais em estudo era de raça indeterminada (n=30), estando também representadas as raças Caniche (n=14), Boxer (n=6), Pastor Alemão (n=6), Pequinês (n=5), Pincher (n=3), Rotweiller (n=3), Perdigueiro (n=2) e Malamute (n=1).

Os cães do estudo, provenientes do Canil Municipal do Porto (n=34), na maioria dos casos não tinham história clínica, tendo sido eutanasiados porque capturados na rua (n=3), devido a doenças não identificadas pelos proprietários (n=19), por falta de condições para manter o animal (n=3), devido a atropelamento (n=1), por agressividade (n=1), tumores (n=2), cegueira (n=2), ou devido à idade avançada do animal (n=3). Dos restantes casos, do LNIV (n=29) e do ICBAS (n=7), seis não tinham história pregressa, um morreu por velhice, nove morreram de forma súbita e vinte apresentavam histórias clínicas diversas desde traumatismos por mordedura (n=2), atropelamentos (n=1), presença de tumores (n=5), hemoparasitas (n=2), peritonite (n=2), pneumonias (n=1), esgana (n=1), tetraplegia (n=1), rotura gástrica (n=1), diarreia crónica (n=1), rinite (n=1), insuficiência renal (n=1) e epilepsia (n=1) (Tabela III dos Anexos).

Apesar do esforço por parte do técnico veterinário e funcionários do Canil do Porto, não foi possível, junto dos donos dos animais entregues para eutanásia, obter dados suficientes e credíveis de modo a permitir correlacionar os resultados do inquérito de avaliação cognitiva com as lesões neuropatológicas. As respostas eram evasivas e sempre no sentido de realçar os supostos problemas de saúde do animal para, dessa forma, justificar a sua eutanásia. Assim, os resultados não foram considerados para o estudo.

4.2- Resultados das Análises Bioquímicas

Dos 26 soros avaliados, três (C3, C11 e C28) apresentavam valores de glucose superiores aos normais. Oito cães, todos com mais de 9 anos de idade (C3, C4, C9, C11, C13, C19, C21 e C23) evidenciavam um significativo aumento dos valores da transaminase ALT indicativo de disfunção hepática. Dois cães (C4,C11) apresentavam

níveis de creatinina no sangue muito superiores ao normal, 4,4 e 9,5 mg/dl respectivamente, tendo sido possível constatar lesões renais na necrópsia.

Quadro IV- Resultados de Análises Bioquímicas

	Glucose	***Creatinina***	***Ureia***	***GPT-ALT***	***ALPK***
	60-115mg/dl	*0.5-1.3mg/dl*	*10-26mg/dl*	*6-70 UI/L*	*8-76UI/L*
C1	55	0,4	18	54	89
C2	91	0,6	25	42	148
C3	211	0,6	135	238	368
C4	87	4,4	235	24	655
C6	na	0,8	30	23	na
C7	na	1	36	56	na
C8	109	0,6	33	58	na
C9	112	0,5	31	87	na
C10	127	0,4	26	39	na
C11	246	9,5	308	972	na
C12	124	0,5	20	59	na
C13	99	1,1	31	210	na
C14	111	0,6	23	79	na
C15	113	0,9	23	70	na
C16	107	0,7	23	33	na
C17	89	0,7	18	79	na
C18	90	1,3	68	67	na
C19	80	0,8	35	384	na
C20	82	0,7	23	52	na
C21	99	0,9	29	175	na
C23	101	0,6	14	244	na
C24	99	0,5	33	60	na
C26	83	na	na	na	na
C28	132	1	40	17	na
C29	112	0,9	15	78	na
C30	118	0,9	18	37	na

na – não avaliado

4.3-Dados de necrópsia

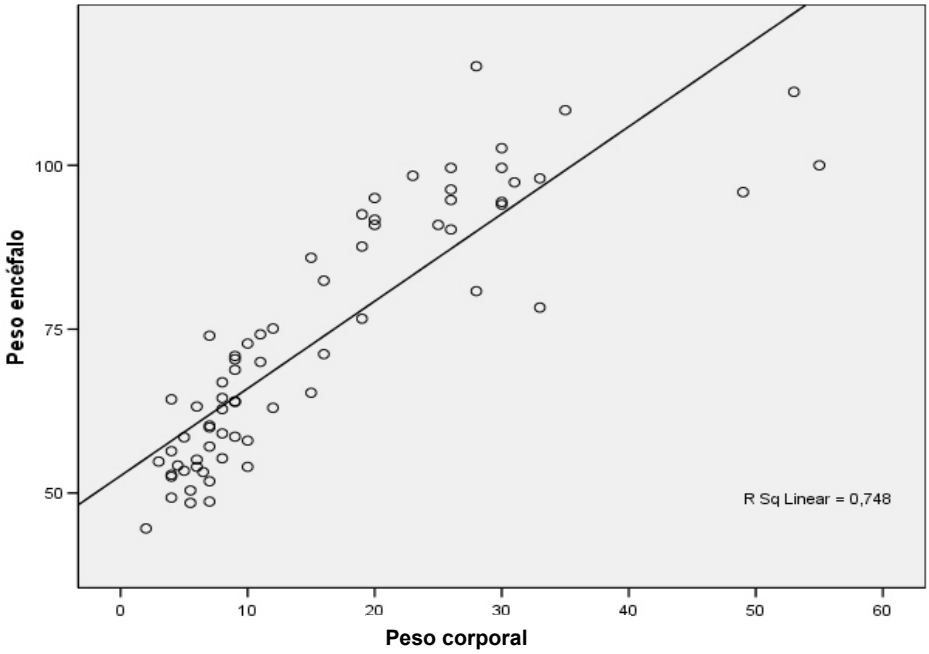
Na necrópsia foram registadas todas as lesões observadas, sendo que as mais frequentes foram as do aparelho urinário (n=22), do aparelho cardiovascular (n=22), do tracto gastrointestinal (n=19), as neoplasias (n=19) e as patologias hepato-biliares (n=10) (Tabela III dos Anexos).

4.4- Estudo macroscópico do encéfalo

4.4.1-Peso do encéfalo

O volume total do cérebro, que inclui o tecido cerebral e o líquido cefalorraquidiano, aparece associado ao peso corporal. O peso do encéfalo do cão apresentou uma correlação positiva de 0,86 com o peso corporal (p <0,001). Para cada Kg de aumento de peso corporal, o peso do encéfalo aumentava 1,331g.
(Peso encéfalo= 52,642+1,331Peso)

Gráfico 1 – Relação do peso corporal com o peso do encéfalo



Não se observou uma diminuição significativa do peso do encéfalo com a idade, ao contrário do que se verifica nos humanos (p=0,23). No entanto, nos cães de raça Caniche verificamos que existe uma correlação negativa significativa, com coeficiente de correlação (r = - 0.625) p=0,02.

De uma maneira geral, para um mesmo peso corporal e idade semelhante, os machos apresentaram um maior peso do encéfalo.

4.4.2-Fibrose das meninges e atrofia do córtex

A fibrose difusa das leptomeninges, caracterizada macroscopicamente por uma opacidade e coloração esbranquiçada dos sulcos cerebrais, foi observada em 57 animais, 81% do total, verificando-se um aumento com a idade, (0-7 anos:10,5%; 8-12 anos:38,6%; ≥13 anos:50,9%) ($p<0.001$) (Gráfico 2). Todos os cães com mais de 14 anos apresentavam fibrose. A fibrose leptomeníngea aparecia de forma focal ou difusa, mais visível nos hemisférios cerebrais, em particular nos sulcos e raramente na fossa posterior. A atrofia cortical com o afundamento dos sulcos era também evidente nos cães idosos. (Fig.4).

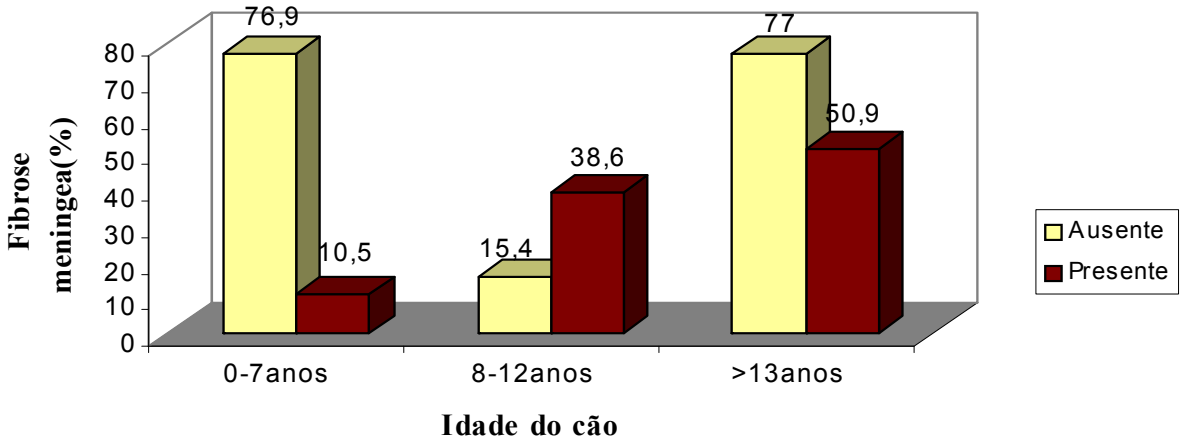


Gráfico 2- Associação entre Fibrose meníngea e a Idade

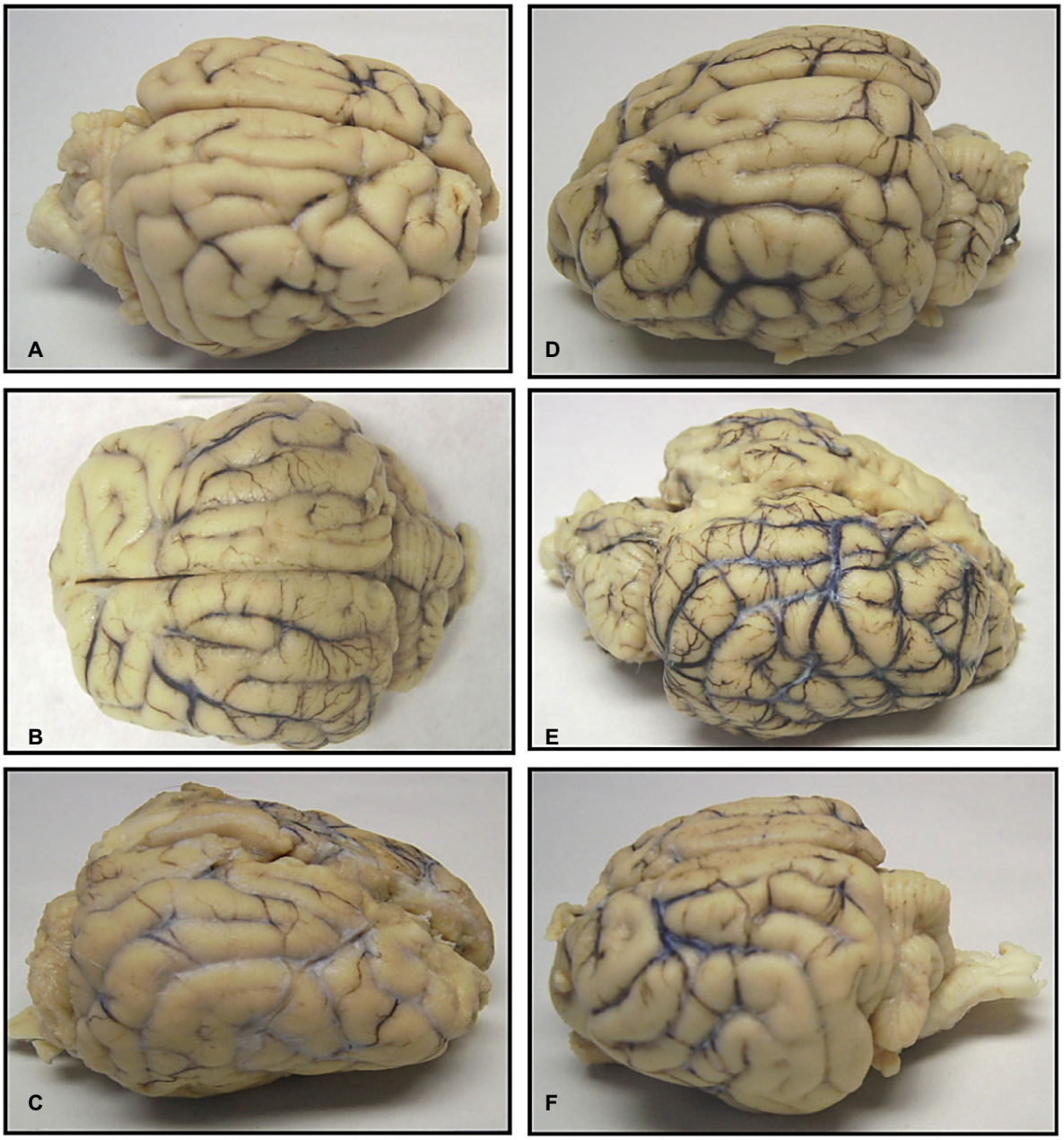


Fig. 4- Fibrose meníngea e alargamento dos sulcos. **Lado esquerdo**: Evolução da fibrose em canídeos de raça indeterminada. **A:** C22, macho, 5 anos; **B:** C18, macho, 13 anos. **C:** C43, macho 17anos. **Lado direito**: Evolução da fibrose em canídeos de raça Caniche. **D:** C64, macho, 5 anos. **E:** C34, macho, 12 anos. **F**: C30, fêmea, 16 anos.

Verificámos que nos cães de grande porte, a fibrose meníngea era já evidente nos jovens, exemplo disso foi a amostra C62, um Rotweiller com apenas 2 anos de idade. Ao compararmos um cão de porte grande, raça Pastor Alemão, com um de porte pequeno da mesma idade, Pequinês, verificámos uma diferença na intensidade de deposição de fibrina nos sulcos. No entanto, o reduzido número de exemplares de cada raça não nos permitiu estabelecer uma associação entre as duas variáveis, raça e fibrose meníngea.

Dos que apresentavam fibrose, 54,4% tinham mais de 9,5 kg, no entanto a diferença não foi significativa (p=0.30).

Quadro V – Associação entre a Fibrose e o Porte do cão

	Porte cão	Pequeno ≤9.5Kg	Médio, Grande, Gigante > 9,5kg	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Fibrose	**Ausente**	8 (61,5)	5 (38,5)	13 (100)
	Presente	26 (45,6)	31 (54,4)	57 (100)

χ^2= 1,075; g.l = 1; p=0,30

4.4.3-Dilatação ventricular

Na amostra em estudo, 49% dos animais (n=34) demonstravam sinais macroscópicos de dilatação dos ventrículos laterais, sendo que os cães com mais de 13 anos apresentavam dilatação em 47.1% dos casos. Dentro do grupo de jovens, apenas três (8,8%) demonstraram dilatação ventricular, dois machos de raça grande com 5 e 7 anos e um outro de raça pequena também com 5 anos. De acordo com os resultados encontrados, podemos concluir que as variáveis idade e dilatação ventricular estão relacionadas (p=0.03).

Quadro VI – Associação entre a Dilatação ventricular e Idade

	Idade	0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Dilatação ventricular	Ausente	12 (34.3)	9 (25.7)	14 (40.0)	35 (100)
	Presente	3 (8.8)	15 (44.1)	16 (47.1)	34 (100)

χ^2=7,02; g.l = 2; p=0,03

Entre o ventrículo direito e o esquerdo as diferenças macroscópicas eram por vezes evidentes, causando assimetria entre os dois hemisférios. As alterações do terceiro ventrículo com a idade, sob o ponto de vista macroscópico, não foram relevantes.

Ao estudarmos a dilatação ventricular em raças diferentes, verificamos que 4 dos 5 Boxer apresentavam dilatação dos ventrículos laterais (Fig.5). Contudo, o número de exemplares de cada raça não permitiu estabelecer associação estatística.

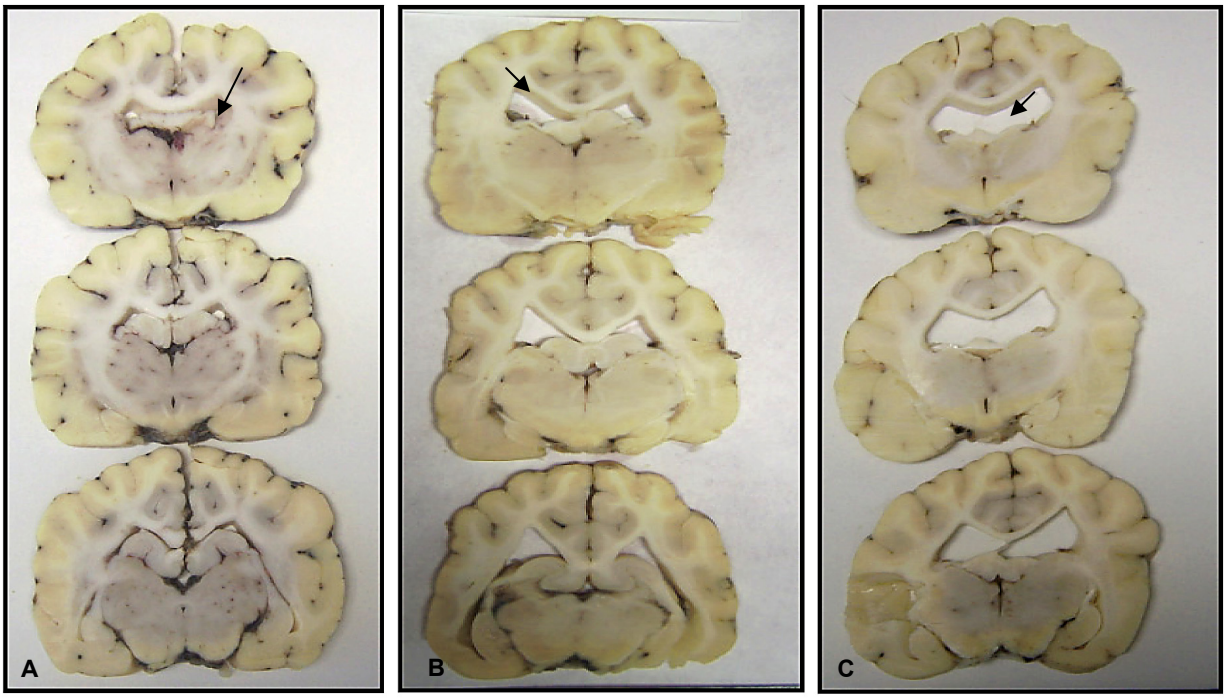


Fig. 5- Dilatação ventricular em cães de raça Boxer (➔).**A**: C63, 5 anos. **B:** C13, 10 anos. **C:** C54, 13 anos.

Também nos Caniches, a dilatação ventricular aumentava com o envelhecimento (Fig.6).

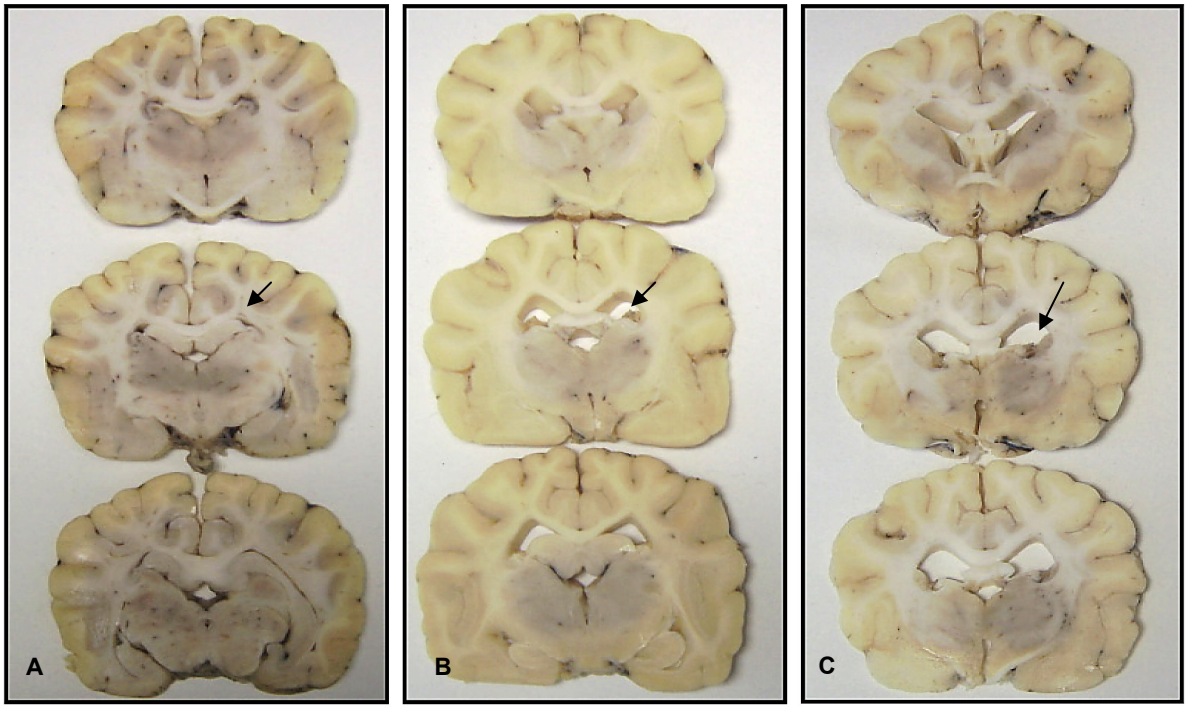


Fig.6- Dilatação ventricular em cães de raça Caniche(➔).**A:** C64, 5 anos**. B:** C48, 10 anos. **C: C**57,12 anos.

Não foi observada influência do sexo na dilatação ventricular, uma vez que as diferenças encontradas entre machos e fêmeas não foram estatisticamente significativas (p=0.36).

Quadro VII – Associação entre a Dilatação ventricular e o Sexo

		Fêmea	Macho	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Dilatação ventricular	**Ausente**	14 (40,0)	21 (60,0)	35 (100)
	Presente	11 (32,3)	23 (67,7)	34 (100)

χ^2=0,85; g.l = 1; p=0,36

O porte do animal não apresentou associação estatisticamente significativa com a dilatação dos ventrículos laterais (p=0.18). De acordo com os resultados obtidos, o tamanho do cão não será factor importante na determinação do aumento do tamanho ventricular.

Quadro VIII - Associação entre a Dilatação ventricular e o Porte do Cão

	Porte cão	Pequeno ≤9.5Kg	Médio, Grande, Gigante > 9,5kg	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Dilatação ventricular	**Ausente**	20 (57,1)	15 (42,9)	35 (100)
	Presente	14 (41,2)	20 (58,8)	34 (100)

χ^2=1,76; g.l = 1; p=0,18

4.5- Estudo Histopatológico

4.5.1- Fibrose e Calcificação das meninges

No exame histológico, a principal alteração observada nas meninges foi a fibrose e a calcificação irregular das mesmas.

A fibrose caracterizava-se pela proliferação de fibras de colagénio e escassos fibroblastos (Fig.7).

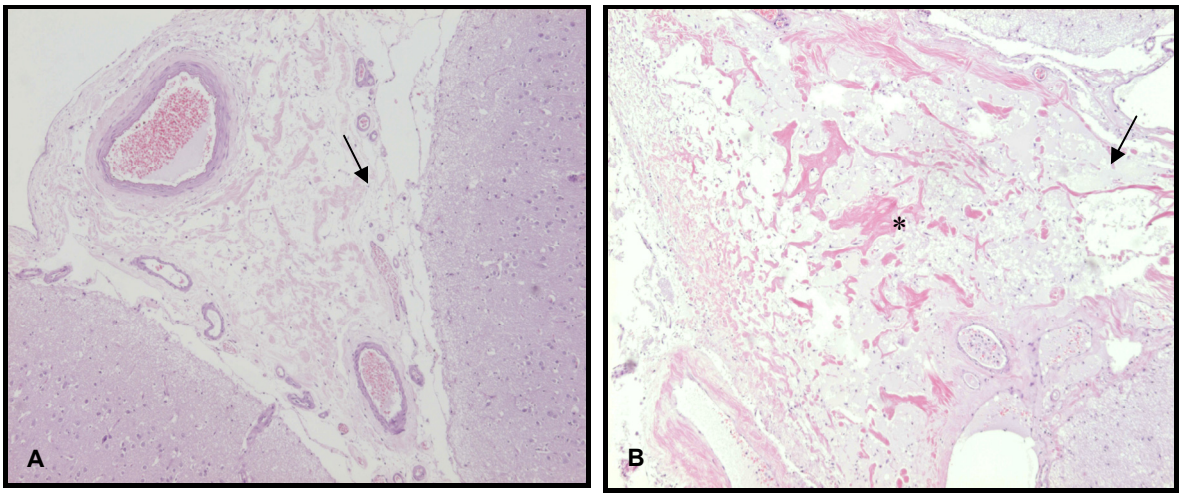


Fig.7 - Imagens histológicas de fibrose das meninges (⟶). **A**: lobo frontal, C8, H&E, 40 x. **B**: lobo frontal, fibrose **(*)** e hialinização meníngea, C11, H&E, 40x.

A calcificação das meninges, foi observada em cerca de 27 (38.5%) dos animais (Quadro IX). Aparecia sob a forma de estruturas basófilas concêntricas semelhantes a corpos psamomatosos e depósitos irregulares nas leptomeninges dos hemisférios, por vezes associados a metaplasia condróide ou óssea e focos de mineralização no córtex (n=6) (Fig.8 e 9).

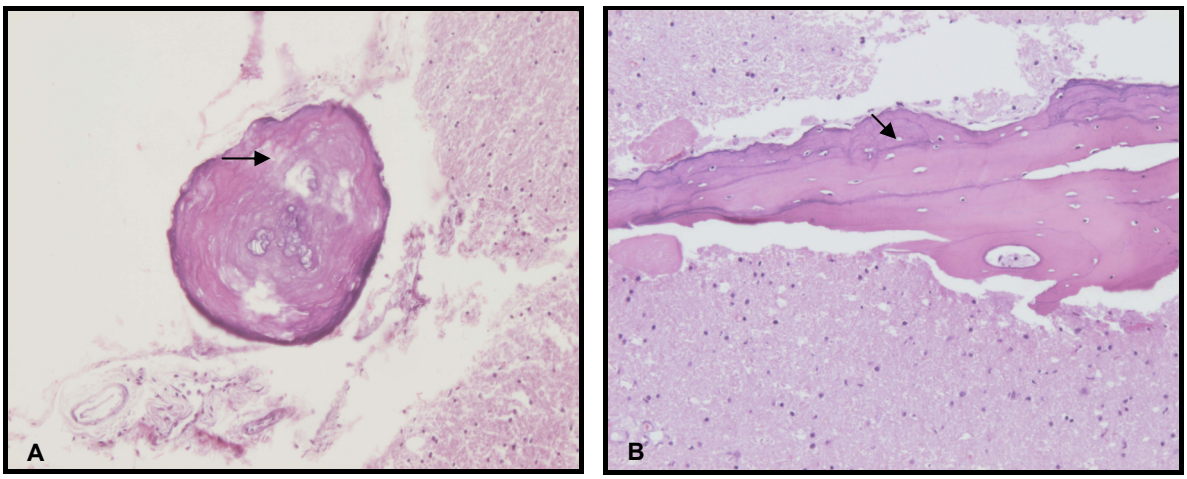


Fig.8- A: calcificação da meninge com estrutura basófila concêntrica tipo corpo psamomatoso (⟶), lobo temporal, C4, H&E 40x. **B:** metaplasia condróide da meninge (⟶) córtex frontal, C17, H&E, 100x.

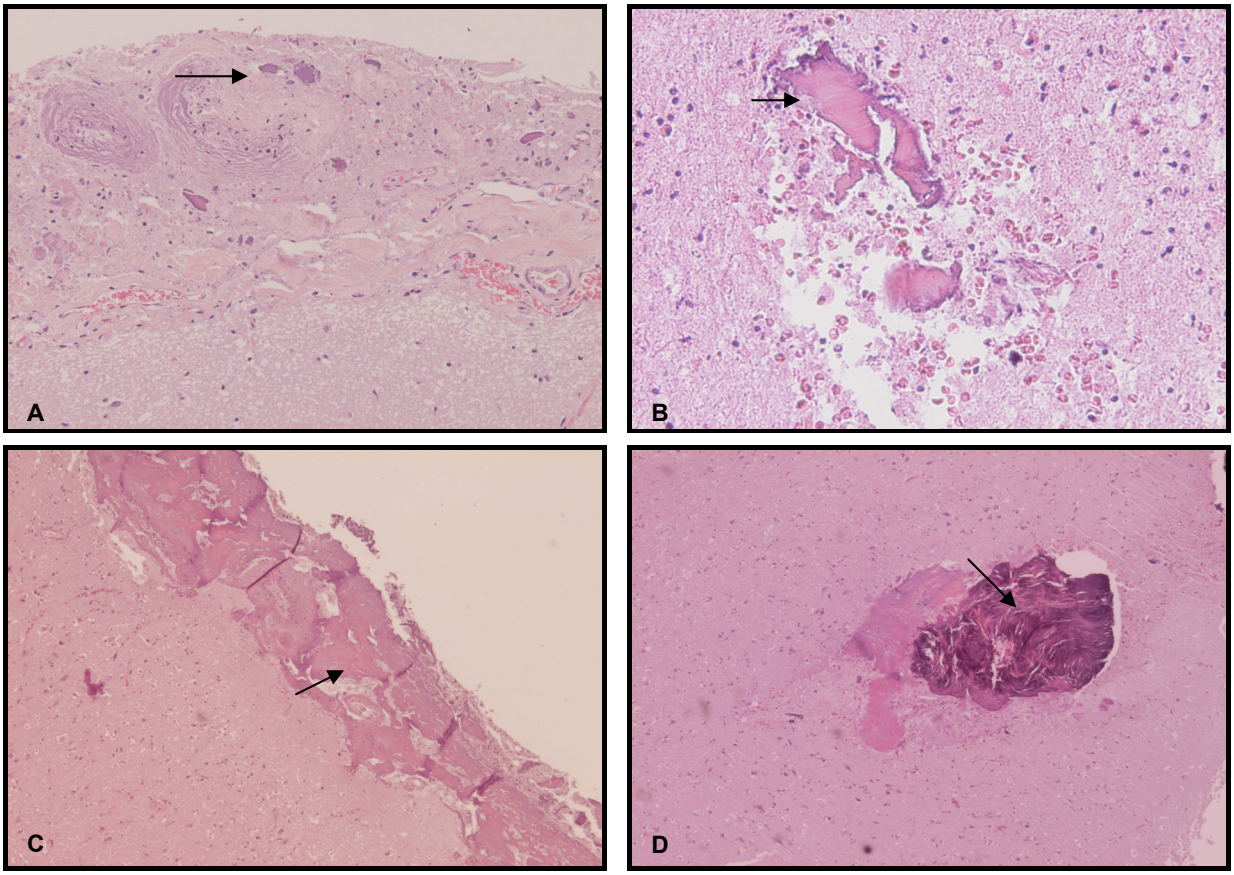


Fig.9 - Mineralização das leptomeninges e córtex cerebral (⟶) **A:** calcificação focal da meninge, lobo frontal C9, H&E, 100x. **B**: foco de calcificação do córtex associado a hemorragia, mesencéfalo, C51,H&E, 200x. **C:** C10, mineralização da leptomeninges, córtex frontal, H&E, 40x. **D:** calcificação do córtex, lobo frontal, C10,H&E 40x.

A calcificação das leptomeninges e córtex não demonstrou associação significativa com a idade (p=0.08) ou porte do animal (p=0.58).(Quadro IX e X). Em nenhum dos casos foi observada calcificação da parede dos vasos sanguíneos.

Quadro IX – Associação entre a Calcificação meníngea e a Idade

		0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Calcificação	Ausente	13 (30.2)	11 (25.6)	19 (44.2)	43 (100)
	Presente	3 (11.1)	13 (48.1)	11 (40.7)	27 (100)

χ^2=5,16; g.l = 2; p=0,08

Quadro X – Associação entre a Calcificação meníngea e o Porte do cão

	Porte cão	Pequeno ≤ 9.5Kg	Médio 9.6-23.5 Kg	Grande/Gigante ≥ 23,5Kg	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Calcificação	Ausente	23 (67.6)	10 (55.6)	10 (55.6)	43 (100)
	Presente	11 (32.4)	8 (44.4)	8 (44.4)	27 (100)

χ^2=1,08; g.l = 2; p=0,58

4.5.2- Alterações vasculares

As alterações vasculares cerebrais compreendem todas as condições que resultam em isquémia, enfarte ou hemorragia. No presente estudo, as alterações vasculares e perivasculares foram detectadas com frequência elevada.

O espessamento e hialinização da parede dos vasos, atingindo os vasos leptomeníngeos, do córtex e da substância branca era evidente em 62 cães (88,6%), aparecendo primeiro nos vasos leptomeníngeos, atingindo depois os do córtex, nomeadamente as artérias de pequeno diâmetro. A avaliação dos resultados obtidos, comparando os canídeos com mais e menos de 8 anos de idade, revelou que a hialinização dos vasos apresentava associação altamente significativa com o envelhecimento (p<0.001). A intensidade era variável, mas visível em todos os animais com 8 ou mais anos de idade (Quadro XI).

Quadro XI- Associação entre a Hialinização vascular e a Idade

		0-7anos	≥8 anos	
		n (%)	n (%)	P*
Hialinização vascular	**Ausente**	8 (100)	0 (0)	<0,001
	Presente	8 (13)	54 (87)	

***Teste exacto de Fisher**

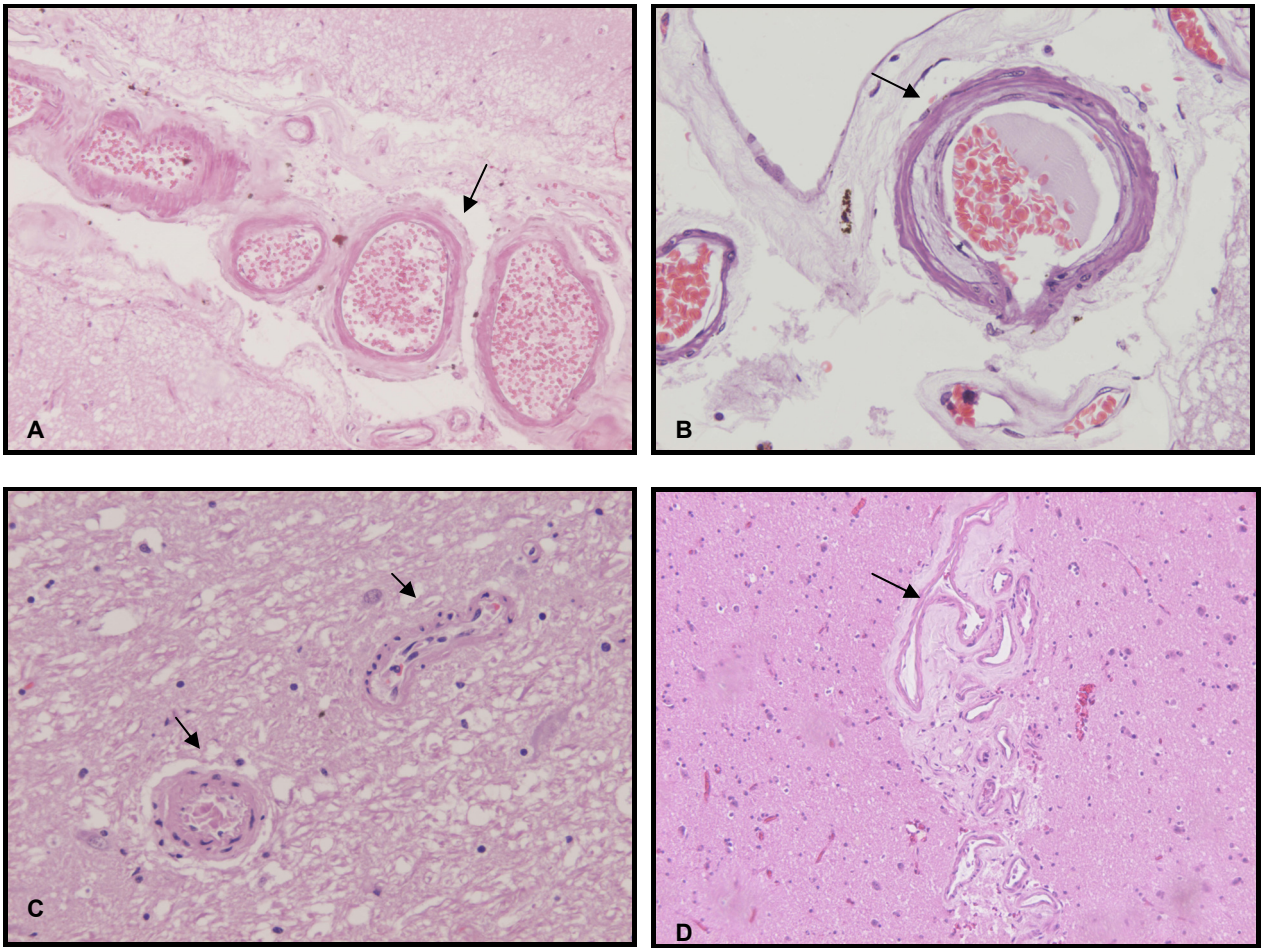


Fig. 10- Hialinização dos vasos das leptomeninges e do córtex (⟶). **A:** hialinização de vasos leptomeníngeos, lobo frontal, C34, H&E, 100x. **B:** hialinização de vasos leptomeníngeos, lobo frontal, C6, H&E, 200x. **C**: hialinização vasos, mesencéfalo, C1, H&E, 200x. **D**: hialinização e proliferação de vasos, córtex frontal, C44, H&E, 100x.

A hialinização vascular demonstrou associação estatística significativa com a deposição de proteína β-amilóide nos vasos do córtex, sendo que 51.6% dos cães com hialinização vascular evidenciavam deposição de proteína β -amilóide (p=0.006). A deposição de proteína β-amilóide na parede dos vasos poderá ser uma das causas da hialinização e espessamento vascular.

Quadro XII – Associação entre a Hialinização vascular e a Aβ- Córtex

		Aβ- Córtex		
		Ausente	**Presente**	
		n (%)	**n (%)**	P*
Hialinização vascular	**Ausente**	8 (100)	0 (0)	0.006
	Presente	30 (48,4)	32 (51,6)	

* Teste exacto de Fisher

A atrofia perivascular, caracterizada por vacuolização com perda celular à volta de vasos espessados e hialinizados, causada provavelmente por hipertensão ou anóxia foi observada em 9 animais.

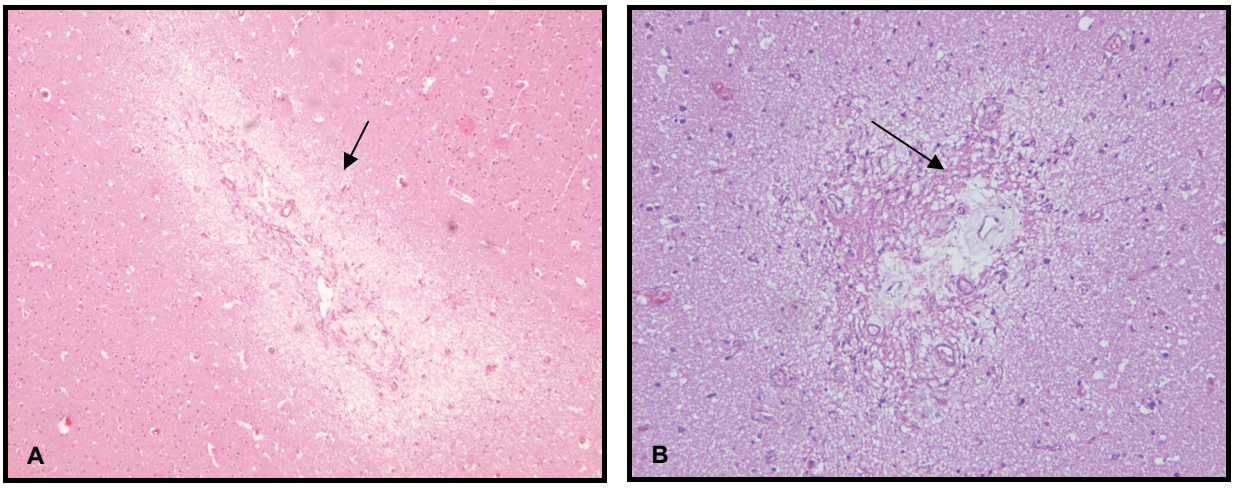


Fig. 11- Atrofia perivascular**. A:** atrofia perivascular, lobo occipital, C23, H&E, 40x**. B**: hialinização com atrofia perivascular, (⟶) C53, H&E, 100x

Foi também observado um elevado número de canídeos com microhemorragias subaracnoideias (n=12) e do córtex (n=43), atingindo um total de 52 animais (74.4%). As microhemorragias foram mais comuns no lobo frontal, núcleos da base, mesencéfalo e lobo occipital, mais extensas nos animais com idade superior a 13 anos. No entanto, não foi possível estabelecer uma associação com a idade (p= 0.08).

Quadro XIII - Associação entre Hemorragias e Idade

		0-7anos	8-12anos	≥ 13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Hemorragias	Ausente	7 (38.9)	3 (16.7)	8 (44.4)	18 (100)
	Presente	9 (17.3)	21 (40.4)	22 (42.3)	52 (100)

χ^2=4,93; g.l = 2; p=0,08

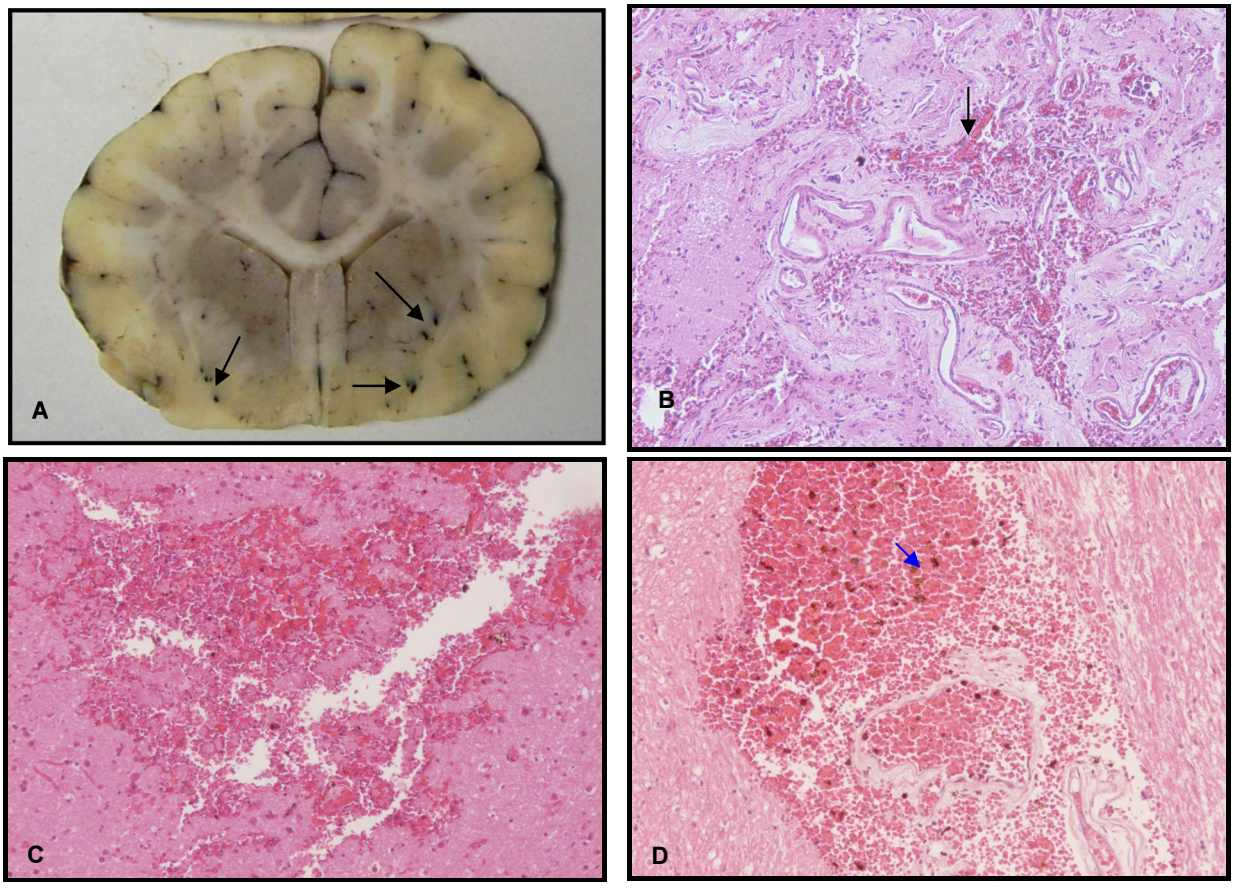


Fig.12- Hemorragias do córtex. **A:** corte coronal ao nível dos núcleos da base com hemorragias punctiformes (⟶), C45. **B:** hemorragias e hialinização dos vasos, núcleos da base, C45, H&E, 100x**. C:** córtex occipital, C37,H&E, 100x. **D:** núcleos da base, núcleo caudado: hemorragia com presença de hemossiderófagos (↘), C54,H&E, 100x.

Uma das possíveis causas de hemorragia cerebral é a deposição de proteína β-amilóide ao redor da parede dos vasos do córtex, no entanto os nossos resultados não permitiram estabelecer uma associação significativa entre ambas as variáveis (p=0,50).

Quadro XIV- Associação entre Hemorragias e Deposição Aβ vasos córtex

		Hemorragias		
		Ausente	Presente	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Aβ-Córtex	**Ausente**	11 (28,9)	27 (71,1)	38 (100)
	Presente	7 (21,9)	25 (78,1)	32 (100)

χ^2=0,45; g.l = 1; p=0,50

Foram observadas imagens de enfarte em sete canídeos (C2, C4, C7, C10, C12, C16, C52). Uma fêmea de raça indeterminada com 10 anos, uma fêmea e um macho de raça Pastor Alemão com 9 e 10 anos, respectivamente, uma fêmea cruzada de Perdigueiro com 14 anos, dois machos de raça indeterminada com 15 e 16 anos e um macho de raça Pequinês com 18 anos. As amostras C2, C12, C16 e C52 apresentavam imagens histológicas compatíveis com enfartes hemorrágicos, enquanto nas restantes amostras (C4, C7, C10) os enfartes eram do tipo lacunar.

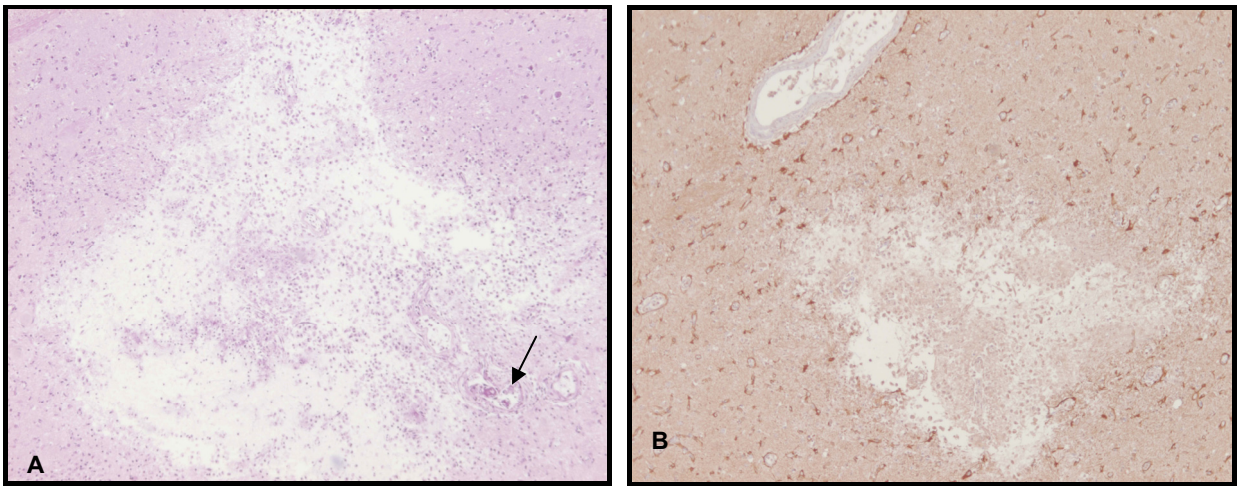


Fig. 13- Enfarte lacunar. **A:** Córtex frontal, enfarte com alguns dias a uma semana, caracterizado por área hipocelular com infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos, com recanalização de um vaso (↙) C4, Pastor Alemão de 9 anos H&E, 40x**. B:** Os astrócitos marginais apresentam imunorreactividade aumentada à GFAP, anti-GFAP, 40 x

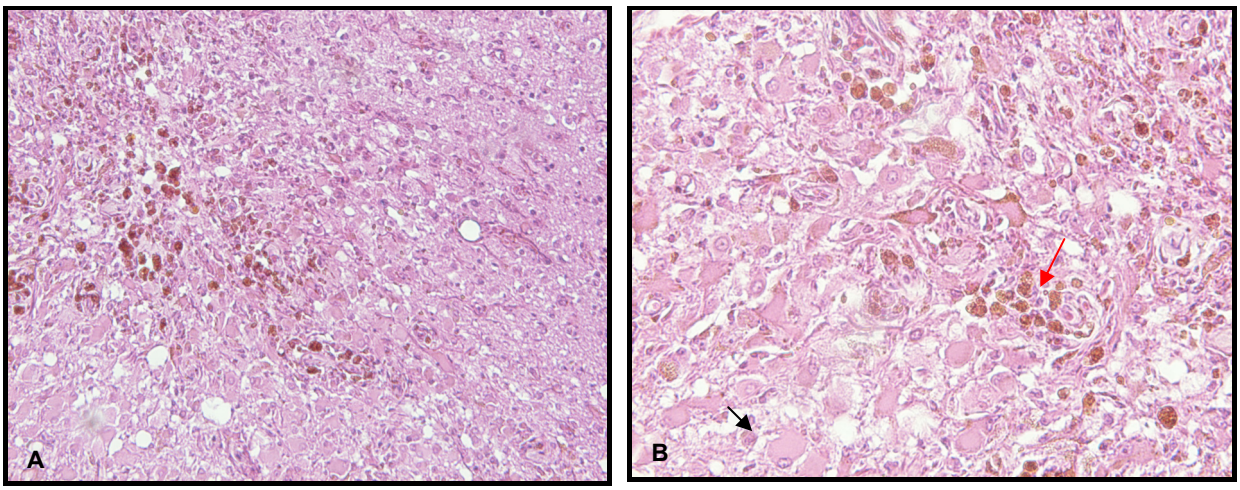


Fig.14- Enfarte hemorrágico, com semanas de evolução, caracterizado pela presença de hemossiderófagos (↙) e astrócitos reactivos na margem (↘),C52,Pequinês com 18 anos **A:** H&E, 100X; **B:** H&E, 200X

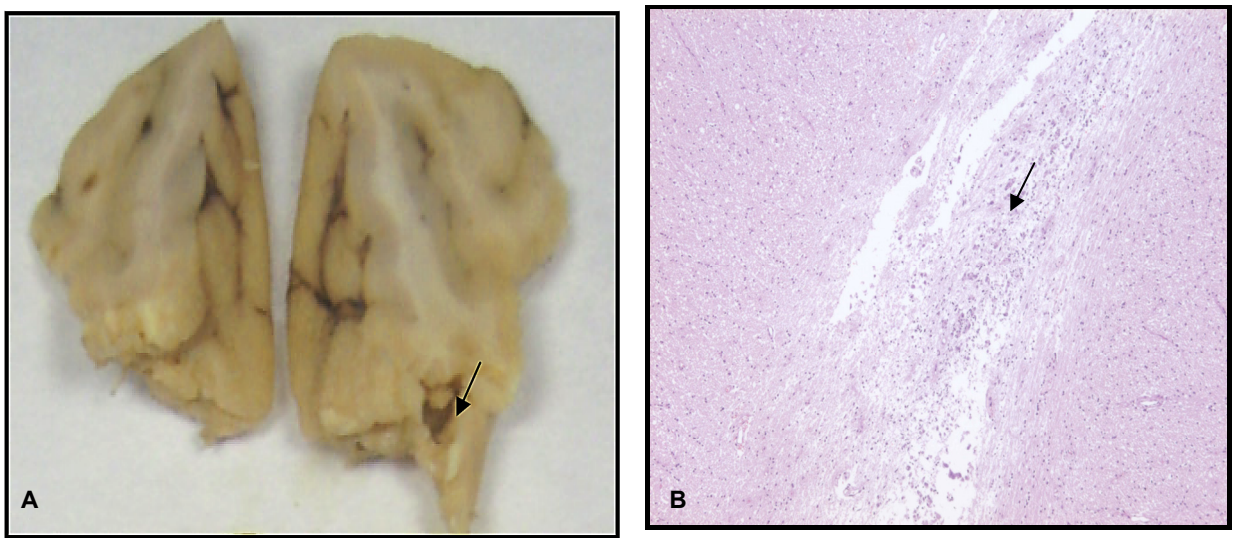


Fig.15- Enfarte lacunar, C7,Pastor Alemão, 10 anos, animal apático, lentificado ao estímulo de estranhos**. A**: zona cavitária no lobo frontal correspondente a enfarte (⟶), **B:** aspecto microscópico de A, enfarte lacunar com infiltrado macrofágico, H&E, 100x.

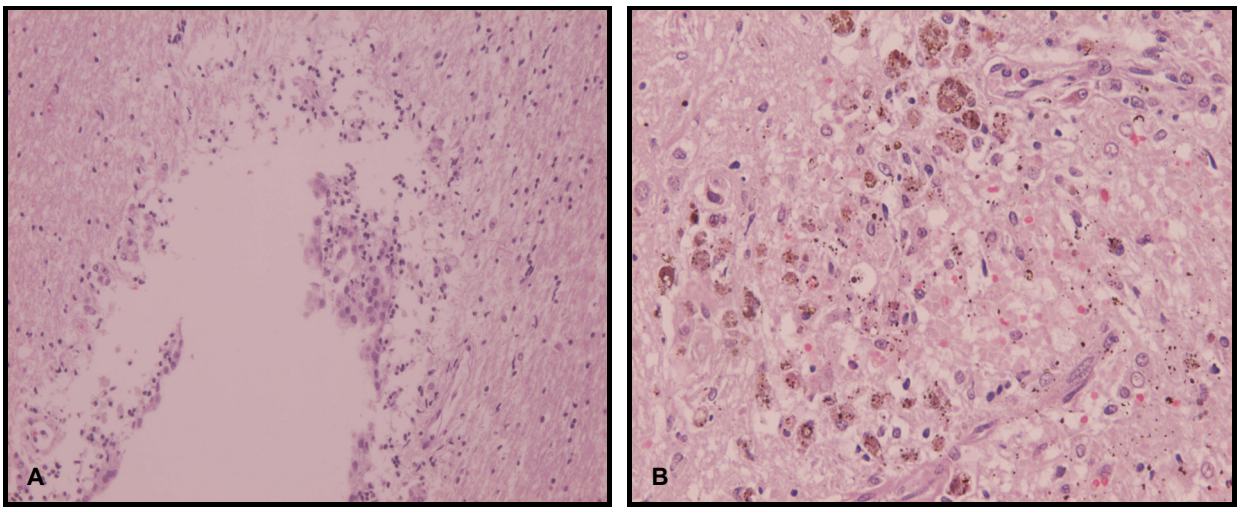


Fig.16- Enfarte lacunar e hemorrágico. **A**: enfarte lacunar caracterizado por zona cavitária associada a infiltrado inflamatório, C10, H&E, 100x. **B**: enfarte hemorrágico recente com presença de hemossiderófagos, C16, H&E, 200x.

4.5.3-Inflamação

No presente estudo foram observadas imagens indicadoras de inflamação em 8 animais, caracterizadas pela presença de infiltrados inflamatórios mononucleados perivasculares, microabcessos ou inflamação das meninges. Apenas dois destes animais manifestavam um quadro clínico que levaria a suspeitar de lesões cerebrais e ambos apresentavam enfartes. O primeiro, um Pastor Alemão com 9 anos, encontrava-se em choque pós-traumático devido a atropelamento em posição de Schiff-Sherrington provocada por lesão toraco-lombar. O segundo, também um Pastor Alemão com 10 anos, apresentava-se apático com resposta não dirigida a estímulos externos.

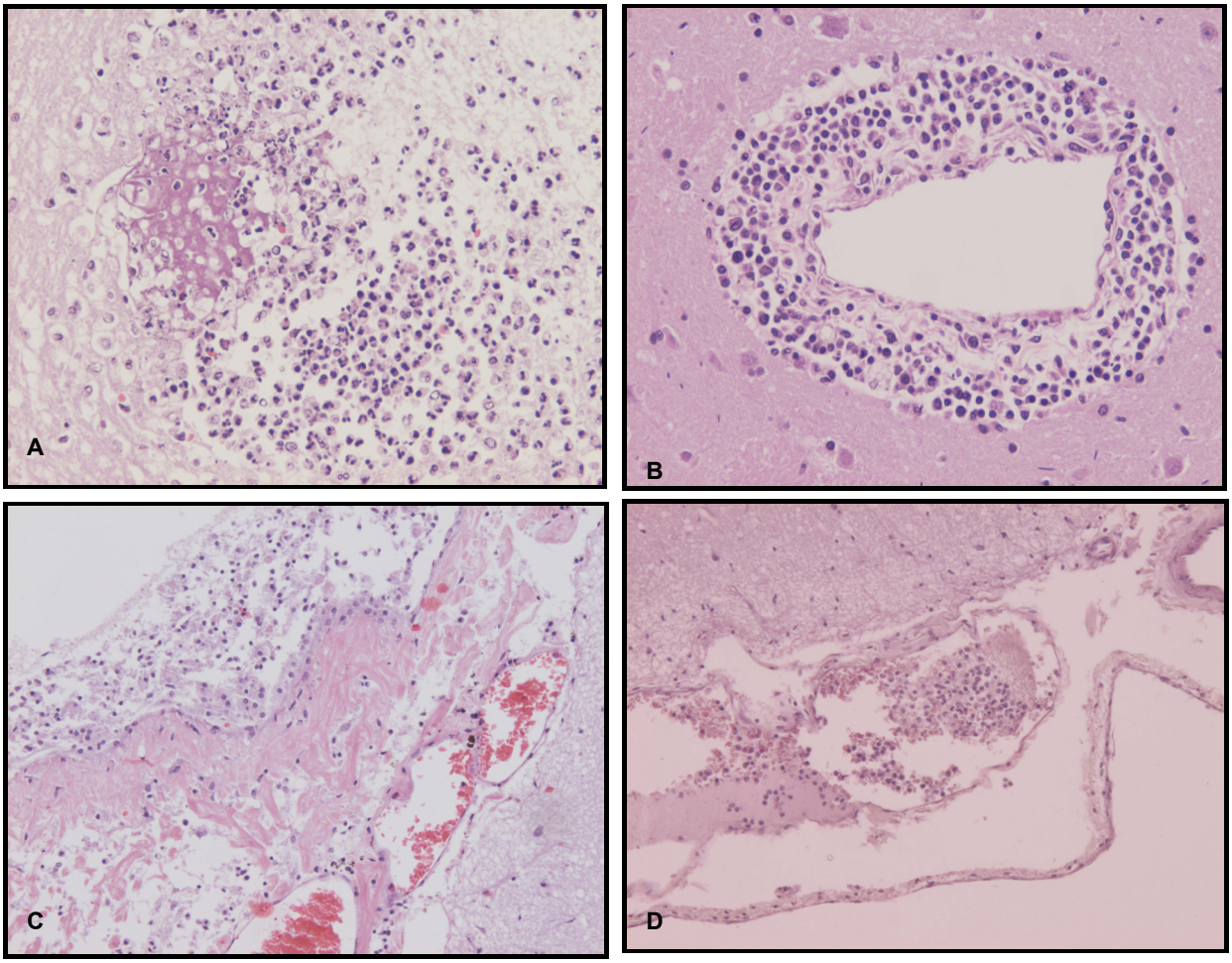


Fig.17 – Imagens de inflamação. **A:** microabcesso, hipocampo, C4, H&E, 200x; **B:** cuff's perivasculares, córtex frontal, C9,H&E, 200x. **C**: infiltrado de células mononucleadas nas meninges, meningite, lobo frontal, C16, 100x. **D**: edema e células inflamatórias mono e polimorfonucleadas nos vasos leptomeníngeos, lobo frontal, C26, 200x.

4.5.4-Satelitose

A satelitose, caracterizada por acumulação de células gliais perineuronais, condição associada a patologia inflamatória ou degenerativa do SNC, foi evidente em 74% dos cães (n=52), em particular no córtex frontal e tálamo, embora também se tenha observado ao nível do córtex occipital, mesencéfalo e ponte, apresentando uma associação significativa com a idade (p=0.001). Verificámos que dos cães que apresentaram satelitose, 50% tinham mais de 13 anos. Não foram observadas imagens de neuronofagia.

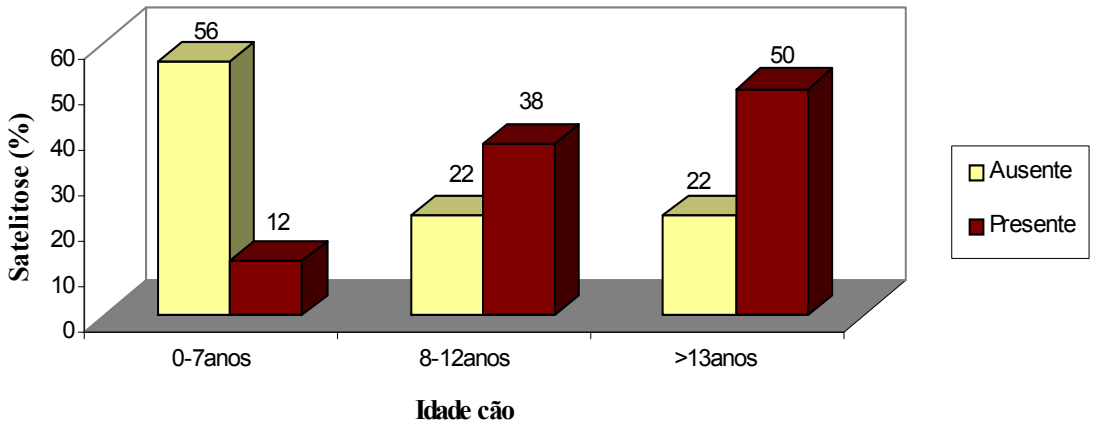


Gráfico 3- Associação entre a Satelitose e a Idade

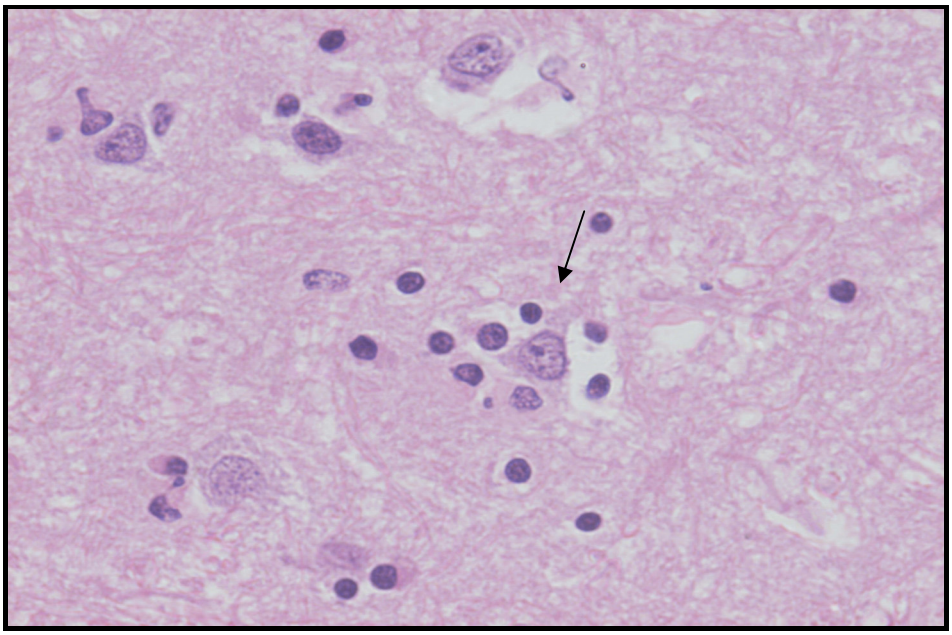


Fig.18 –Satelitose. Acumulação de células gliais ao redor de neurónios (→), córtex frontal, C15, H&E, 400x.

4.5.5- Pigmentos

4.5.5.1-Lipofuscina

A acumulação de lipofuscina, foi observada em cerca de 86% dos animais (n=60), em todos os cães com idade igual ou superior a 5 anos.

A acumulação era polar, envolvendo o pericário entre o núcleo e o axónio, ou difusa no citoplasma. Dependendo do plano de corte, alguns neurónios pareciam não ser afectados, dada a acumulação polar. Enquanto nos jovens a lipofuscina apresentava uma localização perinuclear na forma de depósitos granulares, nos cães mais velhos os depósitos granulares eram mais difusos afectando o pericário e dendrites proximais. Nos animais jovens os depósitos de lipofuscina eram visíveis nos neurónios de maior dimensão, tais como as células motoras de Betz e alguns neurónios dos núcleos vestibulares. A quantidade de lipofuscina aumentava significativamente com a idade ($p < 0.001$), sendo que 90% dos canídeos com lipofuscina tinham mais de 8 anos, com ampla distribuição pelo córtex cerebral, núcleos da base, tálamo, neurónios piramidais do hipocampo, núcleo dentado do cerebelo, núcleos pônticos, alguns núcleos do mesencéfalo, núcleo *gracilis* e cuneato.

Quadro XV- Associação entre a Lipofuscina e a Idade

		0-7anos	≥8 anos	
		n (%)	n (%)	P*
Lipofuscina	**Ausente**	10 (100)	0 (0)	<0,001
	Presente	6 (10)	54 (90.0)	

* Teste exacto de Fisher

Também quando avaliámos a relação da lipofuscina com a idade do cão correspondente à humana, em função do peso, obtivemos associação estatisticamente significativa ($p<0.001$). O porte do animal não influenciou a deposição deste pigmento ($p=0.74$).

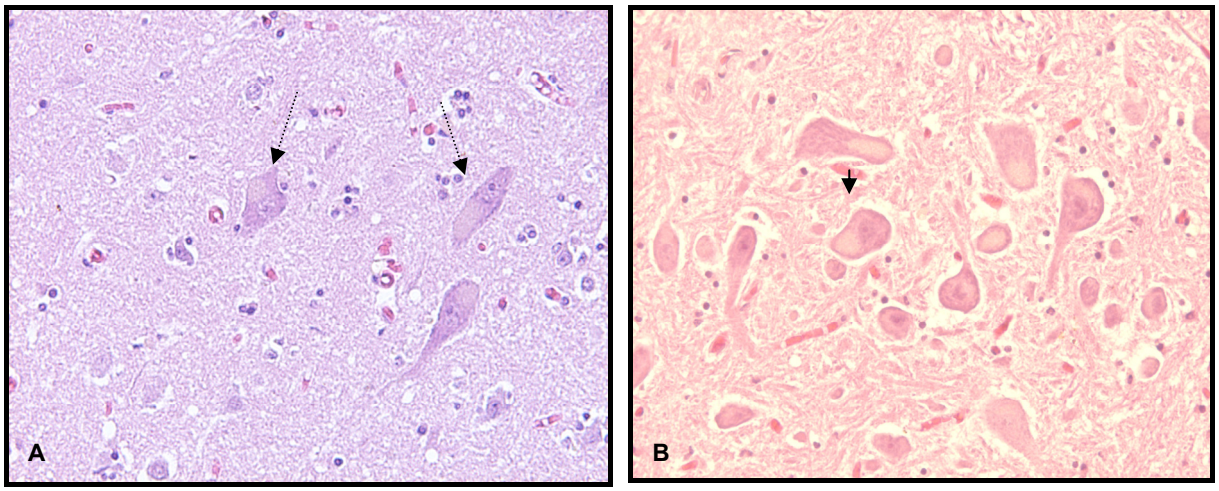


Fig.19- Lipofuscina. **A:** acumulação de lipofuscina nas células de Betz do córtex frontal (⋯▶), C58, H&E, 200x; **B:** lipofuscina nos neurónios do núcleo vestibular protuberância (↓),C30, H&E, 200x.

Os cortes semi-finos de lobo frontal e temporal, corados com Azul de Toluidina, efectuados em quatro cães evidenciaram que a acumulação de lipofuscina aparecia intra e extraneuronal (Fig.20).

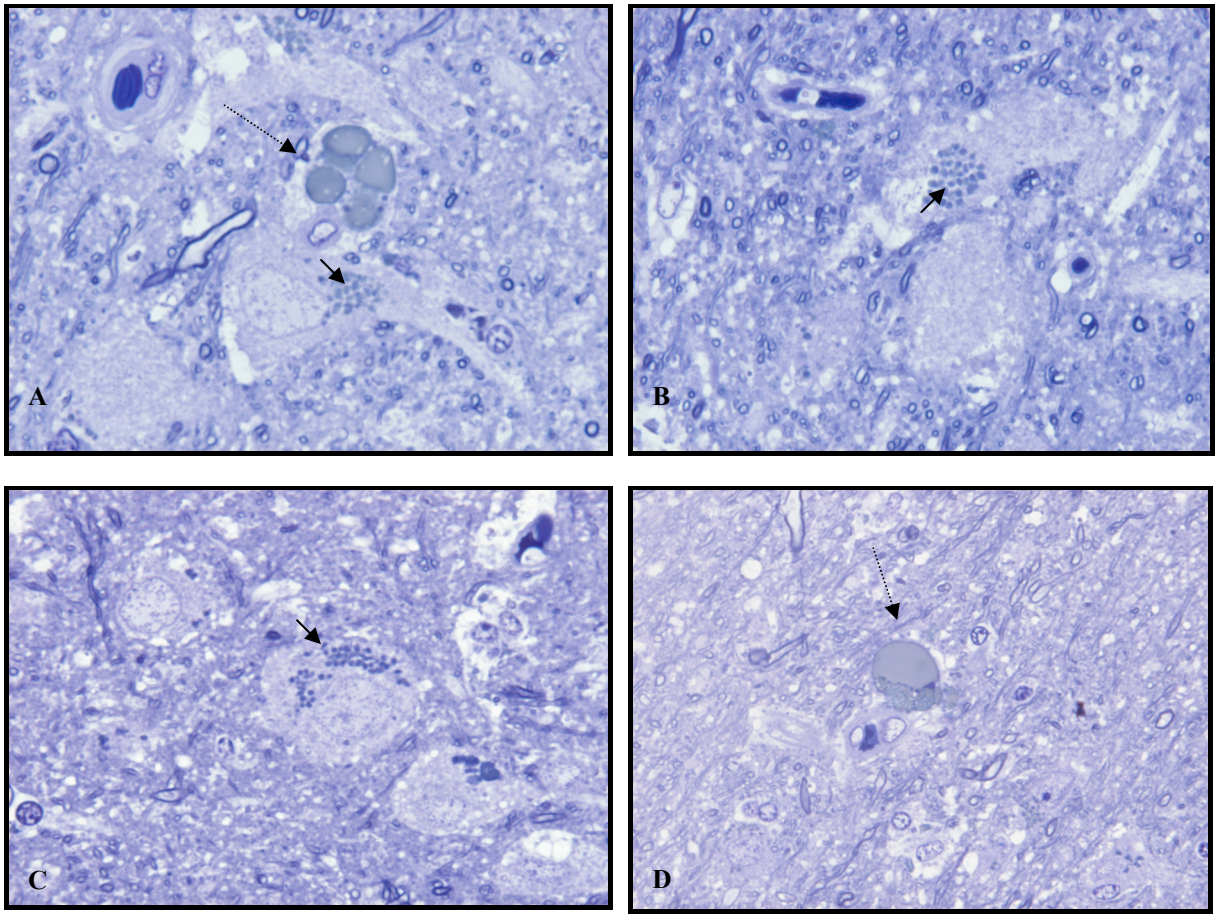


Fig.20- Lipofuscina intra(⟶) e extraneuronal(⋯▶)em cortes semi-finos corados com Azul de Toluidina **A e B:** acumulação de lipofuscina intra e extraneuronal , C54, 600x. **C**: lipofuscina intraneuronal, C56, 600x. **D**: lipofuscina extracelular, C57, 400x.

Ultra-estruturalmente, a lipofuscina afigurava-se na forma de partículas ligadas à membrana, constituídas por um material homogéneo electro-denso de aparência granular (Fig.21).

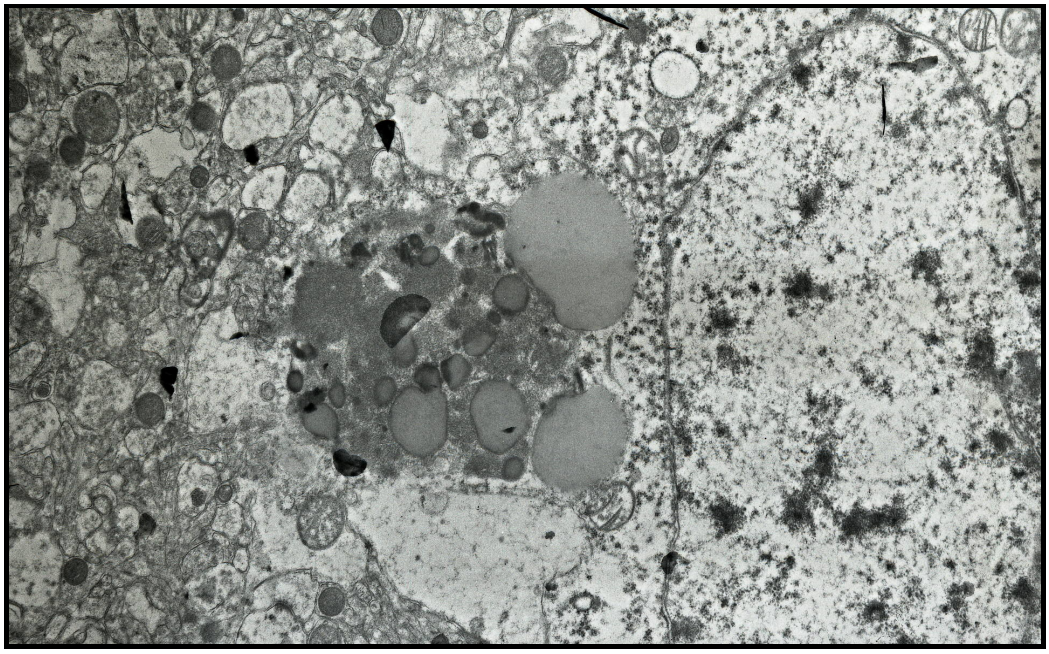


Fig.21- Lipofuscina intraneuronal, C57, ME, 5300x

O canídeo C56, macho de raça Caniche com 13 anos de idade, apresentava imagens de lipofuscina com prováveis corpos curvilíneos, semelhantes aos descritos em Ceroidolipofuscinoses (Fig.22).

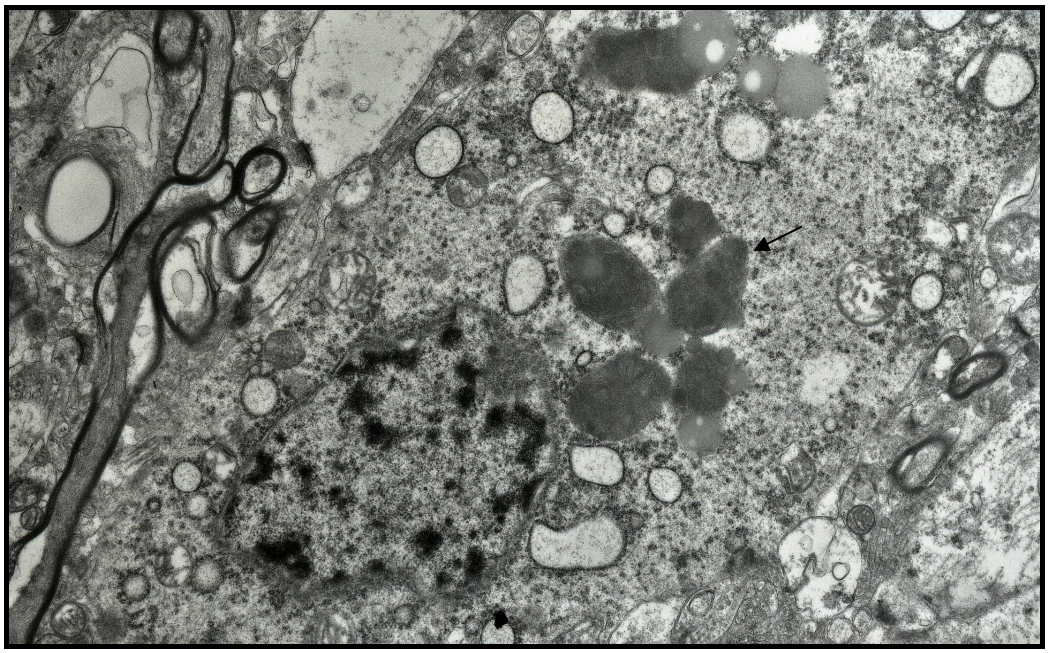


Fig.22 - Acumulação de lipofuscina com presença de prováveis corpos curvilíneos (⟶), C56, ME, 5300x.

4.5.5.2-Neuromelanina

A presença de neurónios pigmentados com melanina, foi observada em 17 canídeos, com idades compreendidas entre os 5 e os 18 anos, ao nível dos neurónios da substância negra, mas não se observou nos neurónios do *locus coeruleus*, localização típica nos humanos. A quantidade de neuromelanina não diminuía nos animais mais idosos, pois foi evidente mesmo no animal mais velho com 18 anos. Não foram observados grânulos de pigmento extraneuronal, o que aconteceria no caso de morte neuronal com libertação da neuromelanina e fagocitose, nem inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas compatíveis com corpúsculos de Lewy, observadas em doentes parkinsónicos.

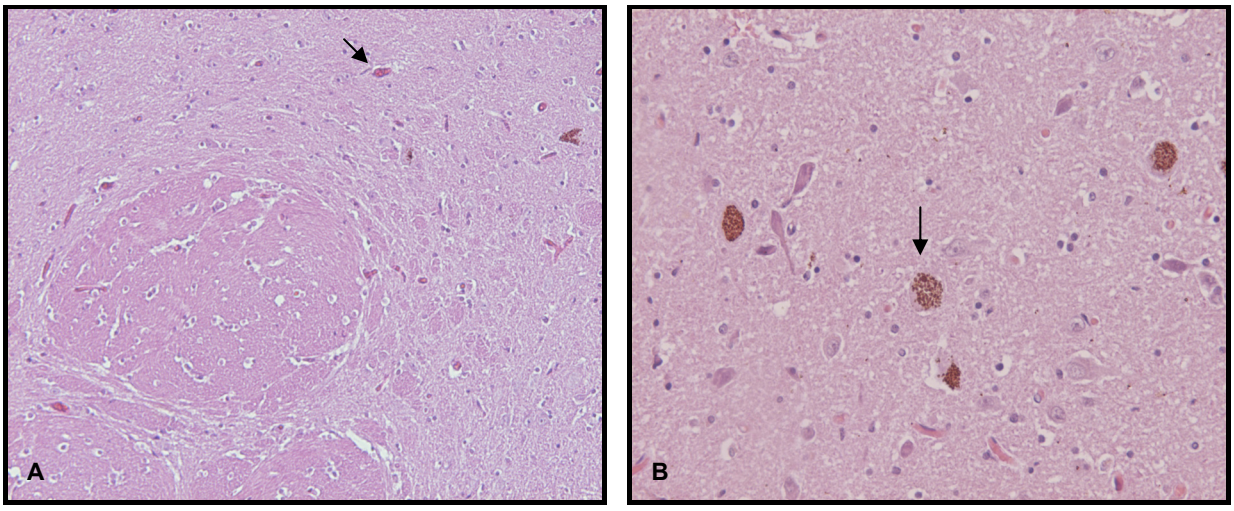


Fig. 23- Presença de neuromelanina nos neurónios ao redor do feixe corticoespinal (⟶). **A**: C22, macho, SRD, 5 anos**; B**: C28, Pastor Alemão 16 anos, 200x.

4.5.6-Inclusões

4.5.6.1- Corpora amilácea

Os “corpora amilácea”, Corpos de Poliglucosan (CPG) constituídos por polímeros de glucose e uma pequena quantidade de proteínas, foram encontrados em 21 canídeos, todos com mais de 10 anos, apresentando associação estatística significativa com a idade (p=0.002), (Quadro XVI).

Quadro XVI- Associação entre os Corpora Amilácea e a Idade

		0-7anos	≥8 anos	
		n (%)	n (%)	p*
Corpora Amilácea	**Ausente**	16 (32.7)	33 (67.3)	0,002
	Presente	0 (0)	21 (100.0)	

*Teste exacto de Fisher

A associação manteve-se significativa quando estudámos a associação destas inclusões com a idade dos cães correspondente à humana, em função do peso (p=0.042). Cerca de 82% dos animais com idade correspondente a menos de 65 anos não apresentavam inclusões de “corpora amilácea” (Gráfico 4).

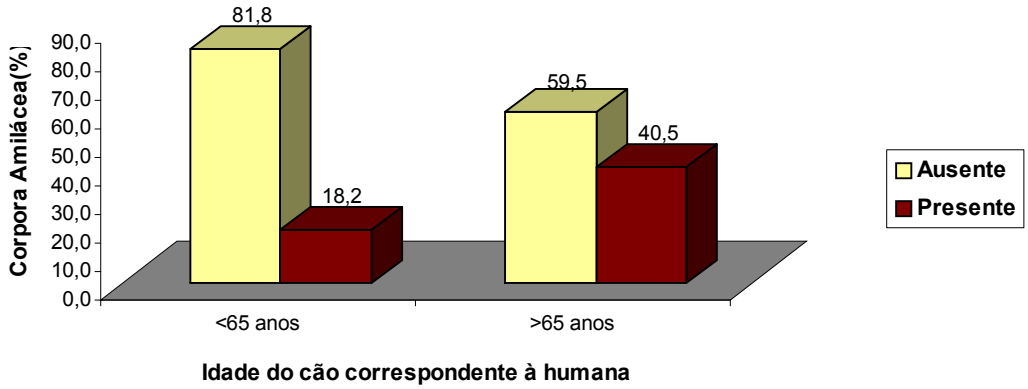


Gráfico 4 - Associação entre os Corpora Amilácea e a Idade do cão correspondente à humana

A localização mais frequente foi a camada molecular do cerebelo, embora também tenham sido visualizados em zonas peri-ventriculares ao nível do mesencéfalo. Os "corpora amilácea" adoptavam a forma de corpos esféricos lamelados, com material amorfo basófilo, por vezes com um core central de coloração mais intensa.

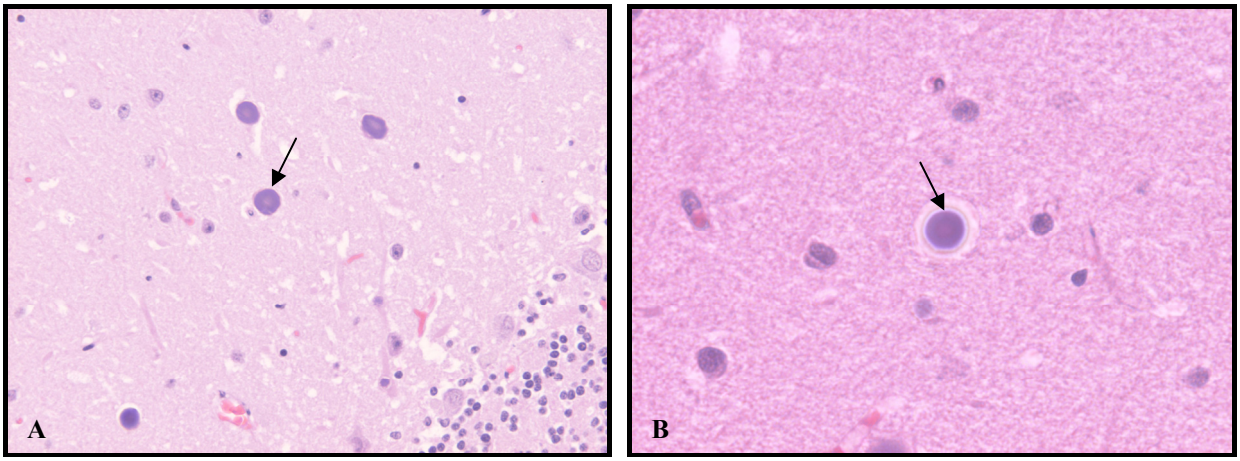


Fig.24- Presença de corpora amilácea na camada molecular do cerebelo, estruturas esféricas com core central basófilo rodeado por halo pálido radiado (⟶). **A**: C16, macho, 16 anos, SRD, H&E, 200x. **B**: C12, macho, 15 anos, SRD, H&E 400x.

4.5.6.2-Esferóides axonais

Na presente amostra, foram identificados esferóides axonais em quinze animais, o mais novo dos quais com 9 anos de idade, mas não foi encontrada associação estatística com o envelhecimento (p=0.054). A substância branca e tronco cerebral foram os locais onde se observaram com mais frequência.

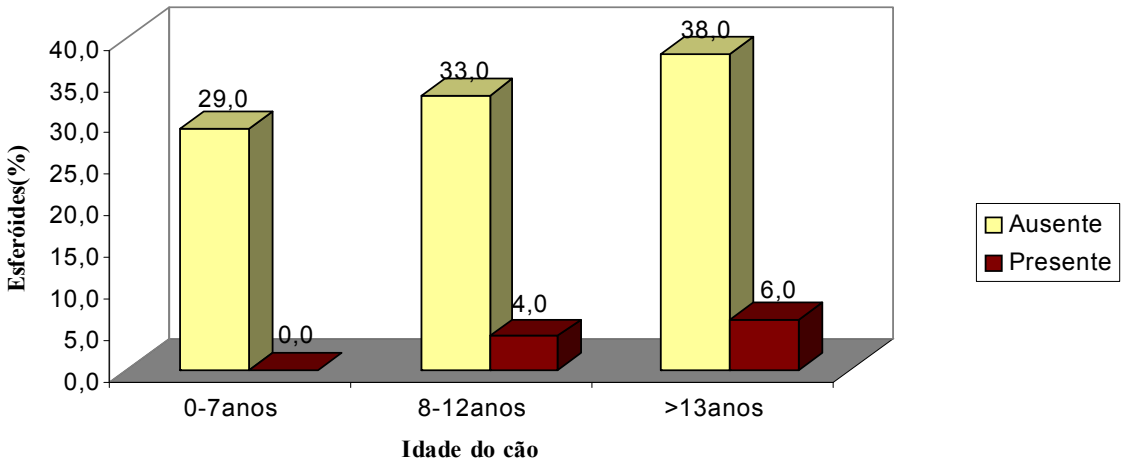


Gráfico 5- Associação entre Esferóides e a Idade

Os esferóides apresentavam-se como estruturas acidófilas, redondas, ovais ou elipsóides, por vezes de aspecto granular (Fig. 25).

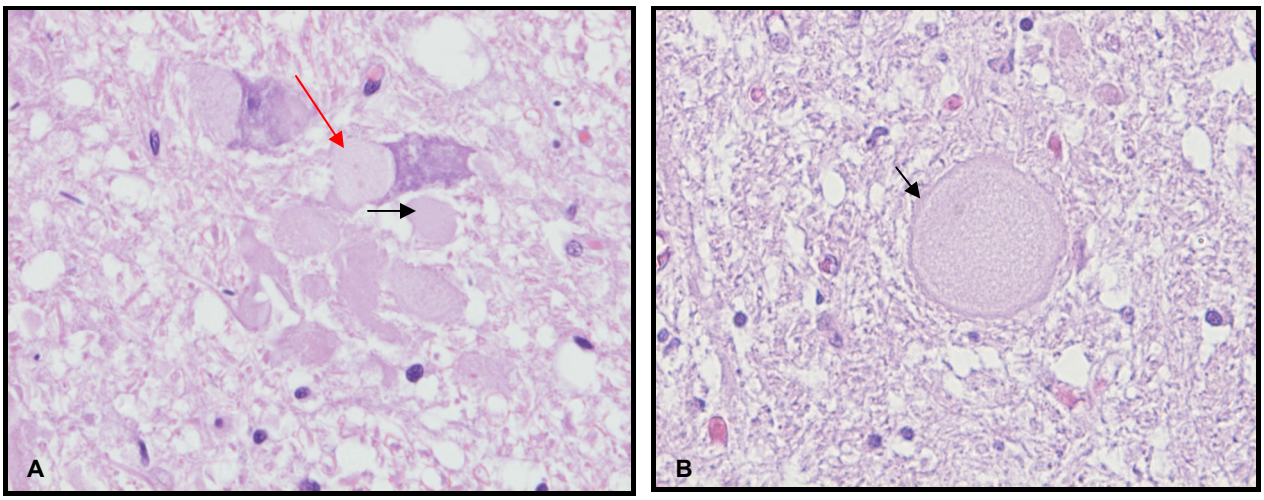


Fig. 25 - Esferóides axonais (⟶) . **A**: núcleo gracilis com esferóides e lipofuscina (→), C14, H&E, 400x. **B:** núcleo gracillis, esferóide de aspecto granular, C58, H&E, 400x.

4.5.7- Malformações e Tumores

4.5.7.1- Defeitos de migração de células da placa germinativa

A presença de células não diferenciadas no parênquima cerebral foi observada em 10 (14%) animais, visualizada na maioria das vezes em cortes ao nível dos núcleos da base, em zonas periventriculares ou na substância branca. As células da placa germinativa não diferenciadas apresentavam um núcleo redondo a fusiforme, intensamente basófilo e formavam agregados (Fig.26).

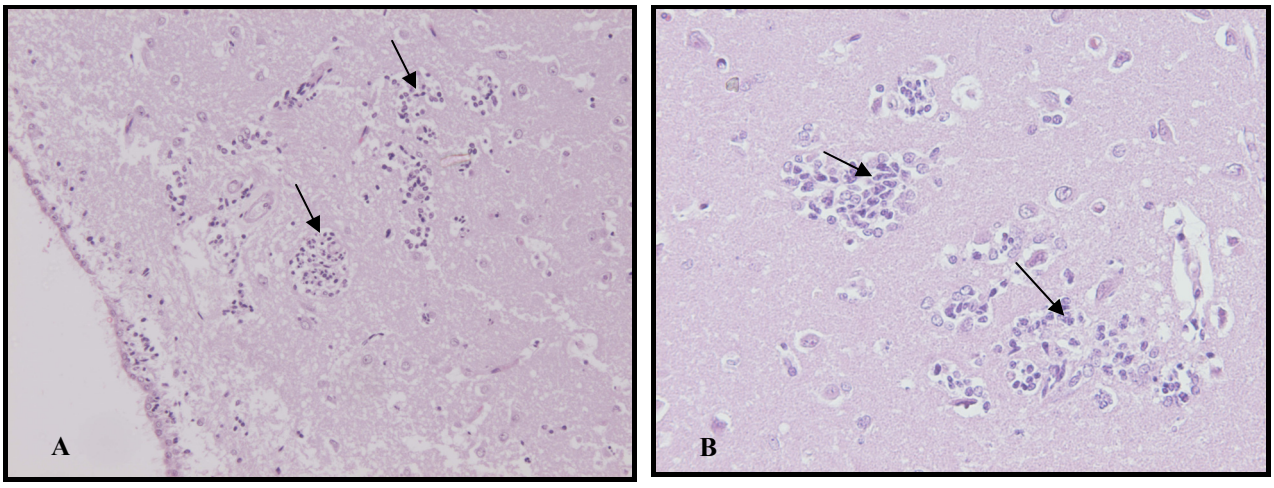


Fig. 26- Migração de células não diferenciadas da placa germinativa. **A**: ninhos de células germinativas não diferenciadas (↘), núcleos da base, C16, H&E, 100x. **B:** núcleos da base, C33, H&E, 200x.

4.5.7.2 - Tumores

No nosso estudo foram observadas imagens de 4 tumores intracranianos (5,7%), num Caniche, dois Boxer e um Pequinês.

O Cão C20, um macho de raça Caniche com 13 anos, apresentava sinais neurológicos caracterizados por uma marcha anormal e tremor intencional. O exame macroscópico do SNC evidenciou a presença de uma neoformação delimitada comprimindo o tecido cerebral, de consistência friável tipo couve-flor que aparecia em cortes desde o tálamo até ao lobo occipital e hemisférios cerebelosos. O exame histopatológico demonstrou a presença de uma neoplasia composta por células meningoteliais, de citoplasma acidófilo com bordos indistintos e núcleo redondo a oval, formando turbilhões e pérolas concêntricas separadas por feixes de células fusiformes, por vezes com presença de corpos psamomatosos. No exame imunohistoquímico, as células exibiram imunorreactividade positiva anti-vimentina, EMA negativo, (marcação inespecífica com citoqueratina 20 e citoqueratina7). As imagens histológicas e positividade ao marcador mesenquimatoso (vimentina) permitiram classificar esta neoplasia como um Meningioma Transicional (Fig.27).

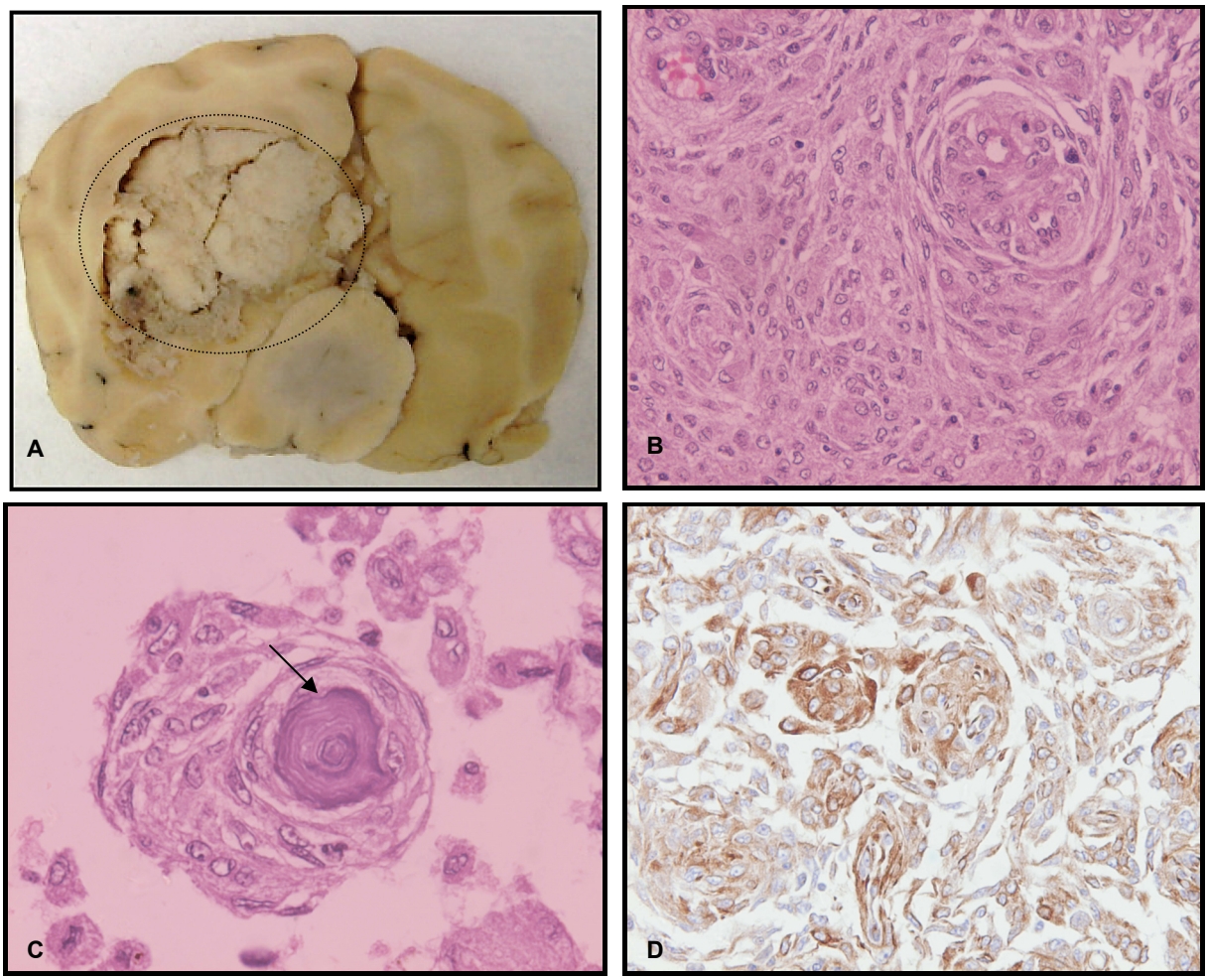


Fig.27 –Meningioma Transicional,C20,Caniche 13 anos. **A:** Aspecto macroscópico caracterizado por formação de aspecto papilar tipo couve-flor e consistência friável por vezes arenosa, ocupando o ventrículo lateral. **B:** células meningoteliais dispostas de forma concêntrica formando turbilhões; **C:** formação de corpos psamomatosos (↘).**D:** positividade das células à vimentina, 200x.

O C32, um macho de raça Boxer com 7 anos, não manifestava sinais neurológicos. O exame de cortes coronais dos hemisférios revelou a presença de uma massa na região supra-selar, com cerca de 2cm de diâmetro, de coloração cinza enegrecido e consistência friável com áreas arenosas (Fig.31A). O exame histopatológico demonstrou uma neoplasia constituída por células poligonais de núcleo redondo basófilo, dispostas em padrão sólido a sinusoidal. O exame imunohistoquímico revelou positividade anti-ACTH, anti-GH e negatividade à prolactina. Pelas características histopatológicas e imunohistoquímicas este tumor foi classificado como um tumor secretor da hipófise, Adenoma misto da Hipófise (Fig.28).

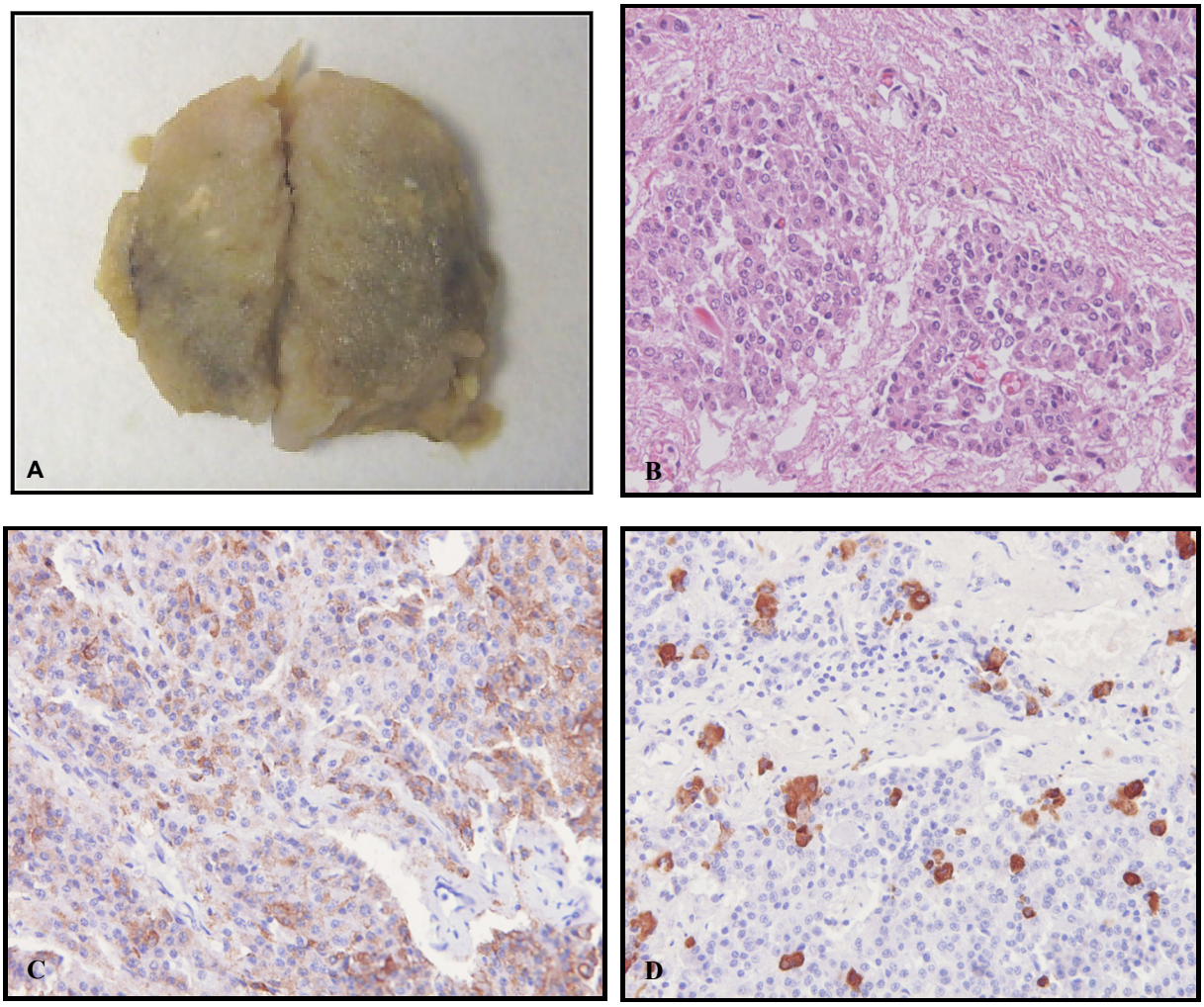


Fig.28- Adenoma misto da hipófise, C32, macho Boxer. **A**: neoplasia de cor cinza-enegrecida com áreas de necrose e mineralização. **B**: o exame histológico evidenciou proliferação de células redondas a poliédricas, formando ninhos, que invadem o tecido cerebral. **C**: imunorreactividade das células neoplásicas anti-ACTH, 200x. **D**: imunorreactividade células neoplásicas anti-GH, 200x.

O C38, macho de raça Boxer com 12 anos e meio, apresentava um quadro de síncopes, com duração de 1 ano, acabando o animal por não resistir a uma crise convulsiva. Exibia uma neoformação com cerca de 1,5 cm de diâmetro, aparentemente delimitada, de coloração bege com áreas enegrecidas localizada na região supra-selar, de consistência mole ao corte (Fig.32A). O exame histopatológico evidenciou imagens de uma neoplasia constituída por células redondas a poligonais, de citoplasma acidófilo dispostas em cordões e em rosetas, com presença de fendas de colesterol e áreas angiomatosas, não invadindo o tecido nervoso. O exame imunohistoquímico revelou positividade anti-ACTH, negativo ao soro anti-GH e negativo à prolactina. Pelas características histopatológicas e imunohistoquímicas este tumor foi também classificado como um tumor secretor da hipófise, Adenoma da Hipófise secretor de ACTH (Fig. 29).

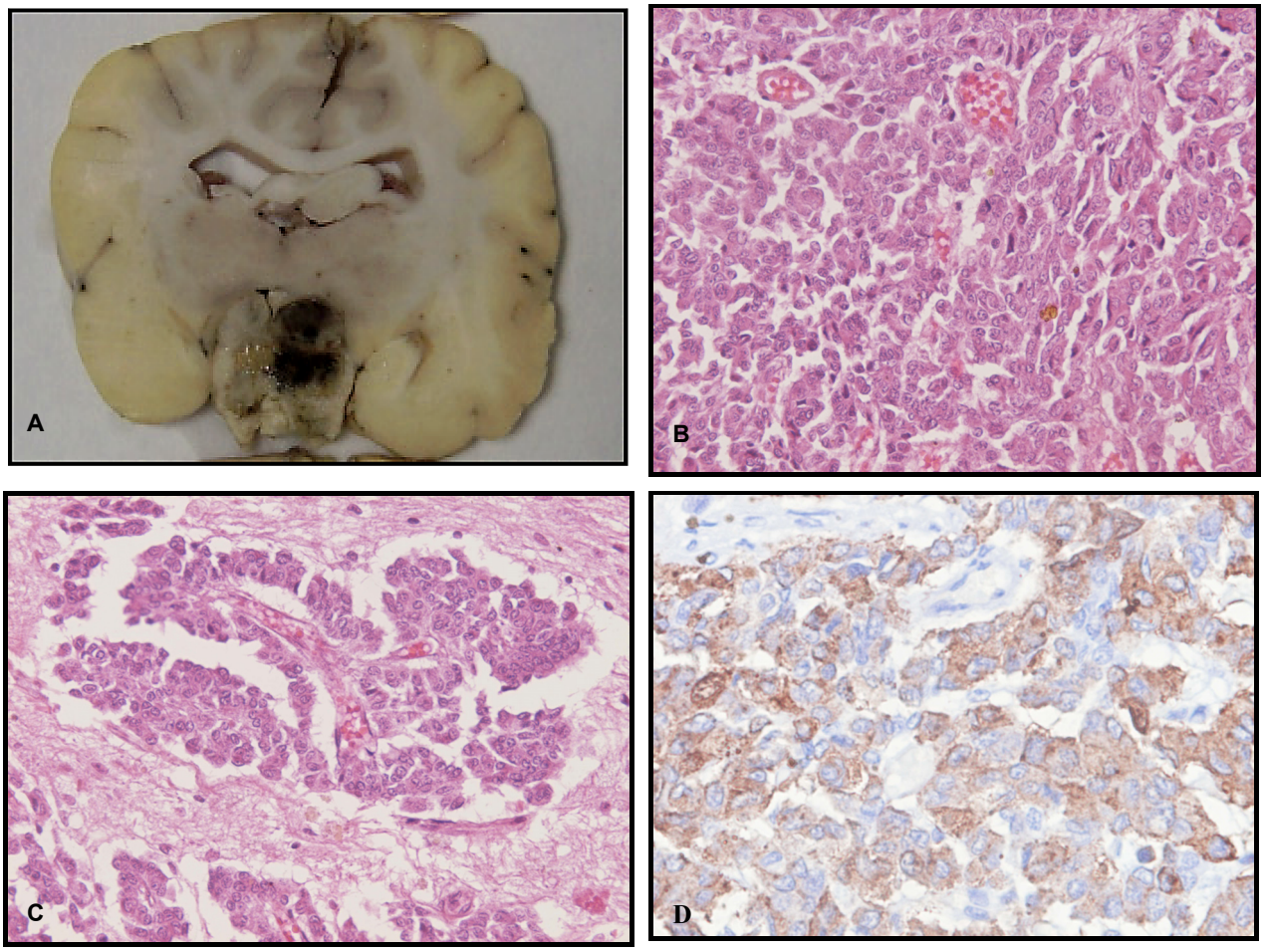


Fig.29- Adenoma da hipófise, C38, Boxer. **A**: Neoformação de coloração acinzentada com áreas enegrecidas localizada na região supra-selar comprimindo as áreas adjacentes. B: células poligonais dispostas em tapete de núcleo redondo a ovóide com citoplasma acidófilo, H&E, 100x. **C**: células neoplásicas invadindo o tecido cerebral, H&E, 200x. **D:** positividade anti-ACTH das células neoplásicas, 400x.

O exame histopatológico do canídeo C53, uma fêmea de raça Pequinês com 12 anos, apresentava imagens compatíveis com metástases de um carcinoma, ao nível do córtex frontal e camada molecular do cerebelo, caracterizada por ninhos de células epiteliais, algumas em anel de sinete com citoplasma vacuolizado, exibindo figuras de mitose (Fig.30). O animal apresentava história clínica de exérese de tumor mamário, cuja classificação histológica não era conhecida.

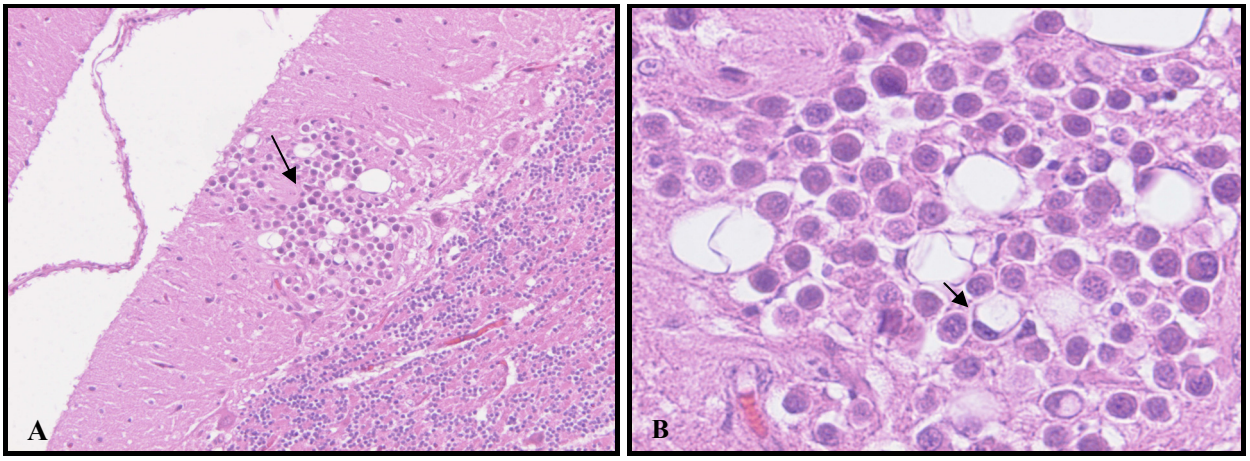


Fig.30- Metástase de carcinoma, C53 Pequinês, fêmea com 12 anos. **A:** ninho de células neoplásicas na camada molecular do cerebelo, C53, H&E, 200x. **B:** as células neoplásicas apresentam anisocitose, com presença de células em anel de sinete de citoplasma vacuolizado (→),H&E, 400x.

4.6 -Estudo Imunohistoquímico

4.6.1- Imunorreactividade à Ubiquitina

No presente estudo, foram observados grânulos ubiquitina positivos em cerca de 86 % de animais (n=59) verificando-se uma marcação constante no grupo de canídeos com mais de 8 anos. A reactividade à ubiquitina na substância branca aumentava marcadamente com a idade, sendo que 88,1% dos cães com ubiquitina tinham mais de 8 anos, o que permite concluir que existe uma associação estatística significativa entre as variáveis idade e presença de estruturas ubiquitinadas na substância branca ($p<0.001$)(Quadro XVII).

Quadro XVII- Associação entre a Ubiquitina na Substância branca e a Idade

		0-7anos	≥8 anos	
		n (%)	n (%)	p*
Ubiquitina Sub. branca	**Ausente**	9 (90.0)	1 (10)	<0,001
	Presente	7 (11.9)	52 (88,1)	

* Teste exacto de Fisher

As seguintes imagens permitem comparar a deposição de ubiquitina na substância branca em quatro cães de raça indeterminada, de acordo com a idade (Fig.31 e 32).

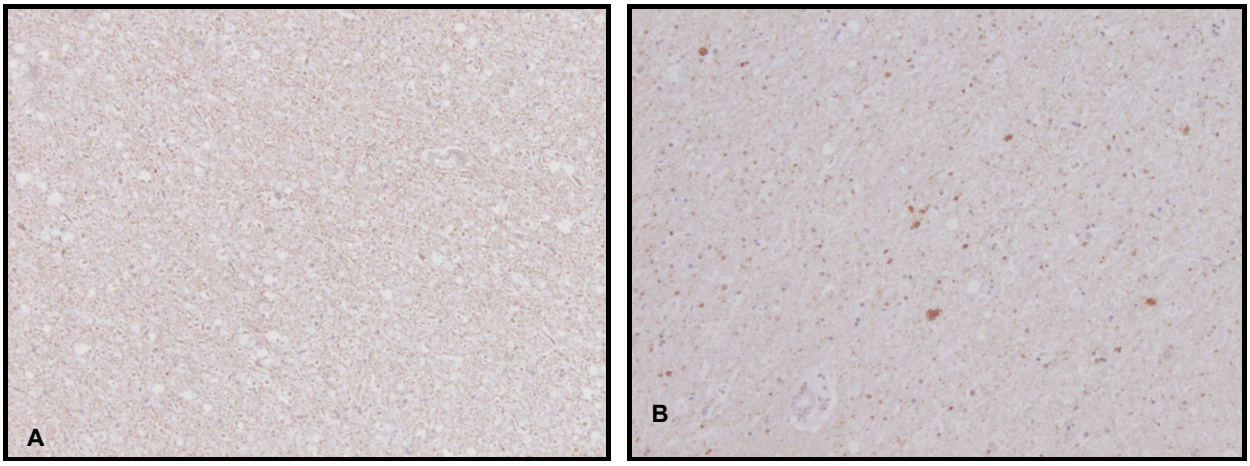


Fig.31- Reactividade à ubiquitina na substância branca. **A:** baixa reactividade à ubiquitina na substância branca, C68, macho, SRD, 1 ano, anti -ubiquitina, 100x. **B**: moderada reactividade à ubiquitina, C15, macho, SRD, 14 anos, anti - ubiquitina, 100x.

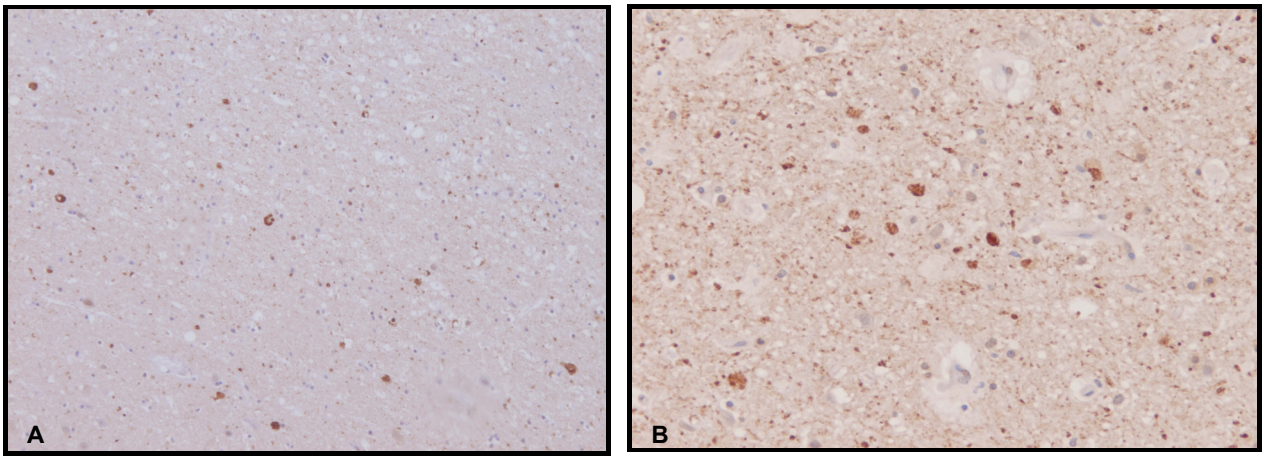


Fig.32- Reactividade à ubiquitina na substância branca. **A:** elevada imunorreactividade à ubiquitina na substância branca do lobo frontal, C26, macho SRD, 12 anos anti-ubiquitina, 100x. **B:** elevada imunorreactividade à ubiquitina, lobo frontal, C51 macho, SRD, 15 anos 200x.

A imunorreactividade positiva à ubiquitina no citoplasma neuronal foi detectada em poucos casos (n=9). Sete canídeos com idades compreendidas entre os 8 e os 13 anos, um Pastor Alemão com 15 anos e um cão de raça indeterminada com apenas 5 anos de idade. A avaliação dos resultados obtidos não permitiu estabelecer associação com o processo degenerativo associado ao envelhecimento (p=0.09), (Quadro XVIII).

Quadro XVIII - Associação entre Ubiquitina neuronal e a Idade

	Idade	**0-7anos**	**8-12anos**	**≥13anos**	**Total**
		n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n(%)**
Ubiquitina neuronal	Ausente	15 (24.6)	18 (29.5)	28 (45.9)	61(100)
	Presente	1 (11.1)	6 (66.7)	2 (22.2)	9 (100)

χ^2=4,8; g.l = 2; p=0,09

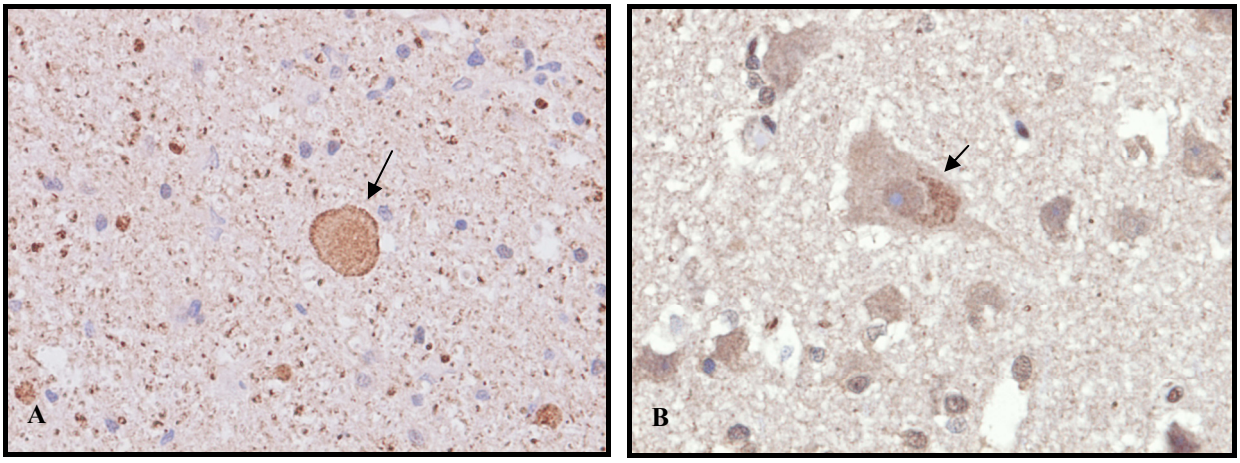


Fig.33- Presença de ubiquitina. **A**: estrutura granular na substância branca (→), C44,Caniche, 13 anos, anti-ubiquitina, 400x. **B**: ubiquitina neuronal intracitoplasmática (↘) ,córtex frontal, C54,Boxer, 13 anos, anti-ubiquitina 400x.

4.6.2- Astrocitose

O estudo da reactividade astrocitária à GFAP demonstrou intensa marcação na zona subpial e nas camadas V e VI do córtex frontal. Na substância branca a marcação era mais evidente em zonas perivasculares (Fig.34).

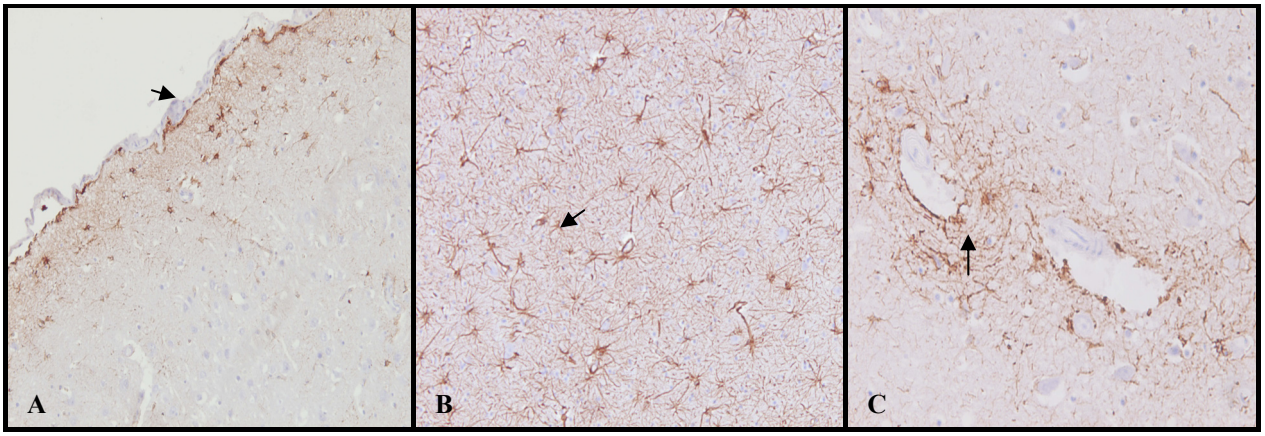


Fig. 34 - Tipos de marcação astrocitária (➔). **A**: marcação subpial, C27, anti-GFAP, 100x. **B**: marcação no córtex, C64, anti-GFAP, 100x; **C:** marcação perivascular na substância branca, C35, anti-GFAP, 200x

Verificámos um aumento de reactividade da GFAP no córtex, associada ao envelhecimento (p=0.045). A reactividade astrocitária da substância branca não apresentou associação estatística com a idade, quando comparados canídeos com idades inferiores e superiores a 8 anos (p=1.00).

Quadro XIX- Associação entre a Astrocitose no Córtex e a Idade

		0-7anos	≥8 anos	
		n (%)	n (%)	p*
Astrocitose Córtex	**Ausente**	2 (100)	0 (0)	0,045
	Presente	13 (19.4)	54 (80,6)	

*Teste exacto de Fisher

Quadro XX- Associação entre a Astrocitose na Substância branca e a Idade

		0-7anos	≥ 8 anos	
		n (%)	n (%)	p*
Astrocitose Subst. Branca	**Ausente**	0 (0)	1 (100)	1
	Presente	16 (23.2)	53 (76.8)	

* Teste exacto de Fisher

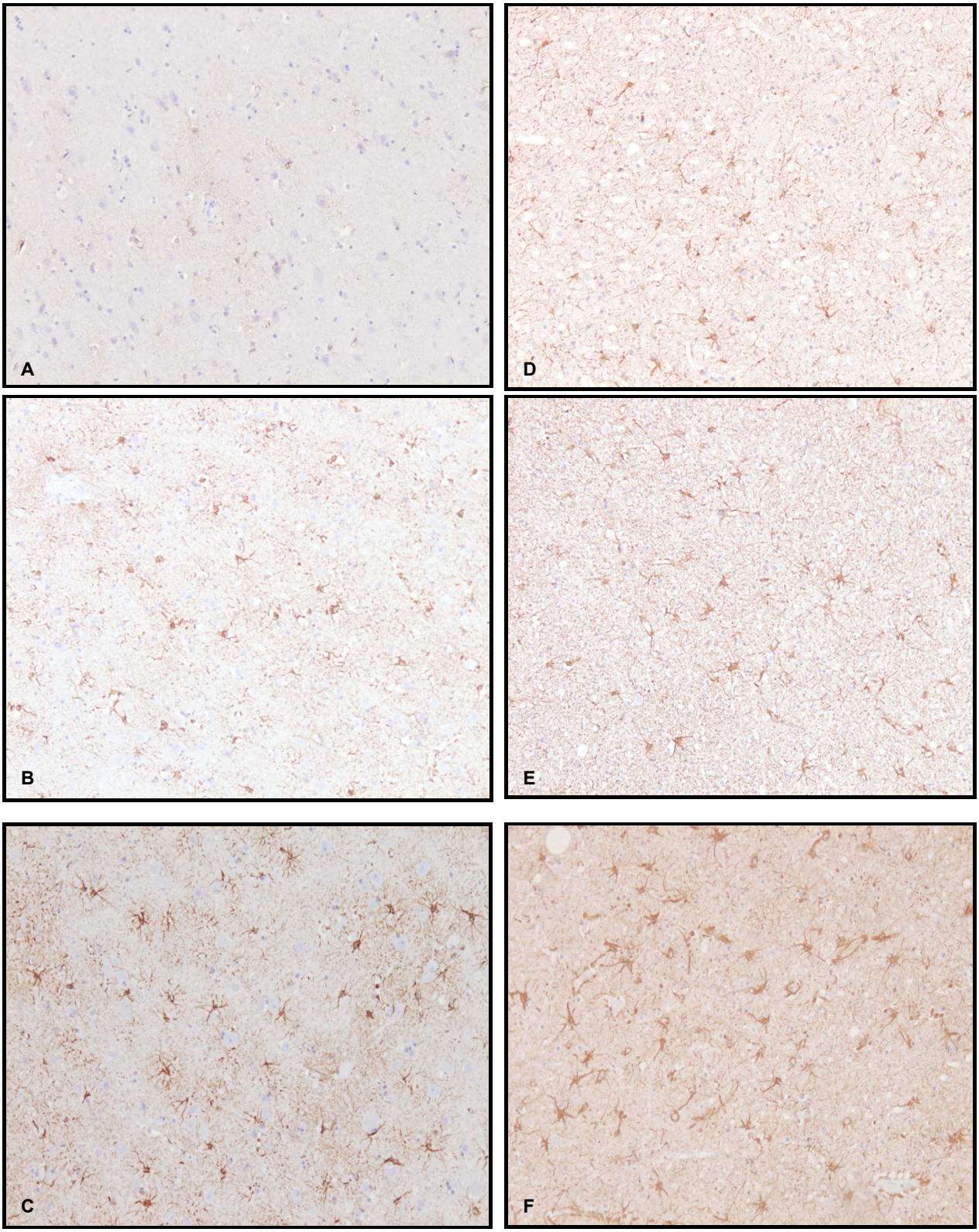


Fig.35- Evolução da intensidade de marcação anti-GFAP com a idade. **No córtex. A:** C61, SRD, macho 2 anos, 100X. **B:** C25, SRD, macho 10 anos, 100X. **C:** C15, SRD, macho 14 anos, 100x. **Na substância branca: D:** C61, 100x. **E**: C25, lobo frontal, 100x. **F:** C15, SRD, macho 14 anos, 100x.

O hipocampo apresentava normalmente uma intensidade de marcação anti-GFAP superior à do córtex frontal, em padrão perivascular, existente também no grupo de animais não geriátricos. De uma maneira geral sempre que havia astrocitose nos animais com menos de 8 anos, esta registava-se no hipocampo, uma área mais sensível ao stress oxidativo e hipoxia.

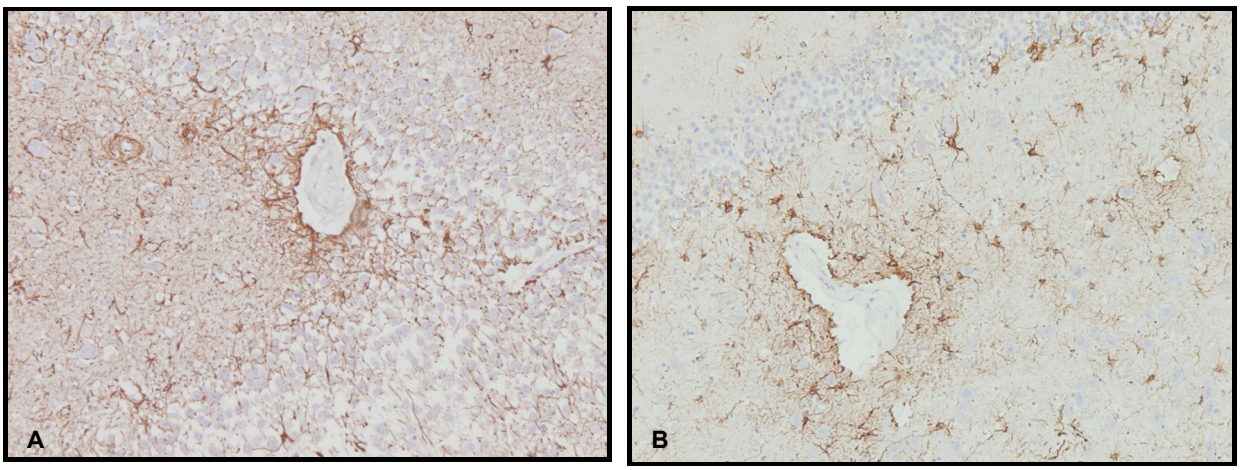


Fig.36- Astrocitose no hipocampo. **A**: reactividade perivascular no "endfolium", C17, anti-GFAP, 100x. **B:** reactividade astrocitária no hipocampo em cão jovem, C65, anti-GFAP, 100x

4.6.3- Deposição de proteína β- Amilóide (Aβ)

4.6.3.1- Angiopatia Amilóide Cerebral (AAC)

O exame imunohistoquímico revelou que a deposição de Aβ a nível vascular (AAC) é um processo associado ao envelhecimento, com início cerca dos 8 anos de idade. Foi reconhecida a deposição de Aβ na parede dos vasos leptomeníngeos em 57% dos cães (n=40) e nos vasos do córtex em 46% dos casos (n=32). A deposição de Aβ atingia os vasos leptomeníngeos, capilares e arteríolas de pequeno e médio calibre do córtex. Em seis casos (8,6%) foi também observada a deposição de amilóide em vasos da substância branca.

A maioria dos cães exibia depósitos leptomeníngeos e no neurópilo mas, nove evidenciavam deposição de Aβ exclusivamente nos vasos leptomeníngeos. A deposição de Aβ nos vasos do neuroparênquima sem concomitante envolvimento das meninges foi observada em dois canídeos (C26 e C53). A deposição de amilóide vascular no hipocampo apareceu em dezasseis animais dos que apresentavam AAC (34%).

O estudo revelou que existe uma associação altamente significativa entre a idade e angiopatia amilóide cerebral, tanto para a deposição de proteína amilóide nos vasos das leptomeninges como nos do córtex ($p < 0.001$) (Quadro XXI).

Quadro XXI- Associação entre a Amilóide vascular e a Idade

		0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aβ- Leptomeninges	Ausente	16 (53,3)	9 (30,0)	5 (16,7)	30 (100)
	Presente	0 (0)	15 (37,5)	25 (62,5)	40 (100)

χ 2= 30,02; gl= 2; p<0,001

		0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Aβ-Córtex	Ausente	16 (42.1)	11 (28.9)	11 (28.9)	38 (100)
	Presente	0 (0)	13 (40.6)	19 (59.4)	32 (100)

χ2= 17,90; gl= 2; p<0,001

Não foi observada angiopatia amilóide cerebral em canídeos com idade inferior a 8 anos. No grupo com idades entre os 8 e os 12 anos, nove cães não apresentavam qualquer tipo de deposição vascular de proteína amilóide, e no grupo dos cães mais idosos, com 13 ou mais anos, cinco deles (C21, C35, C41,C44 e C14) cujas idades variavam entre os 13 e os 15 anos, também não evidenciaram marcação anti- Aβ nos vasos leptomeníngeos e do córtex.

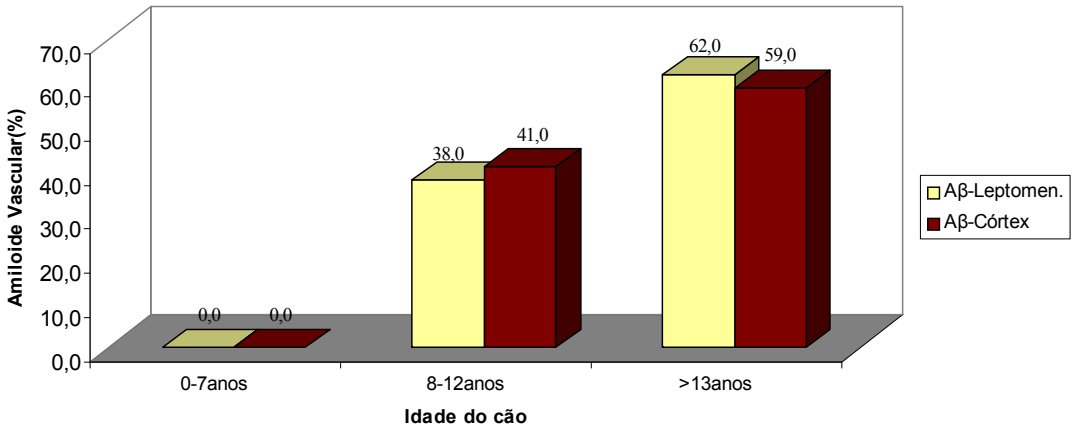


Gráfico 6- Associação entre Amiloidose Vascular e a Idade

Apesar da deposição de Aβ estar relacionada com a idade, uma vez que nos animais jovens não foi encontrada, parece existir uma predisposição individual pois não foi um achado constante em todos os animais idosos (Quadro XXI).

A deposição de proteína amilóide na parede dos vasos apresentava uma distribuição contínua em anel ao redor do vaso ou sob a forma de depósitos descontínuos, verificando-se, por vezes, os dois tipos de marcação no mesmo animal.

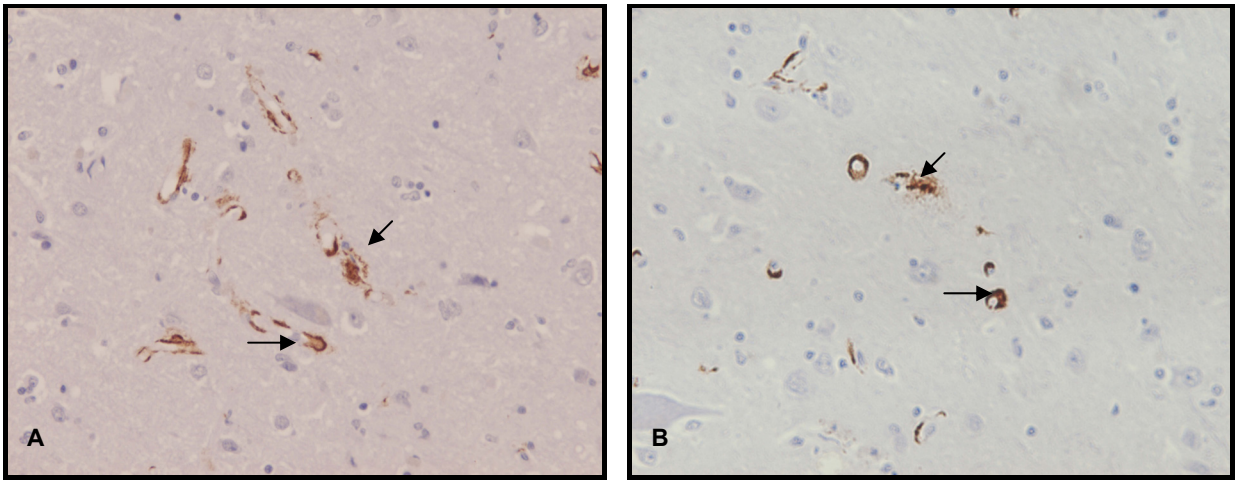


Fig.37- Angiopatia Cerebral Amilóide vasos do córtex (➔). **A**: deposição de Aβ na parede de vasos de pequeno calibre, córtex frontal, C2, anti-Aβ, 200x. **B:** amilóide vascular em capilares; núcleos da base, C20, anti-Aβ, 200x.

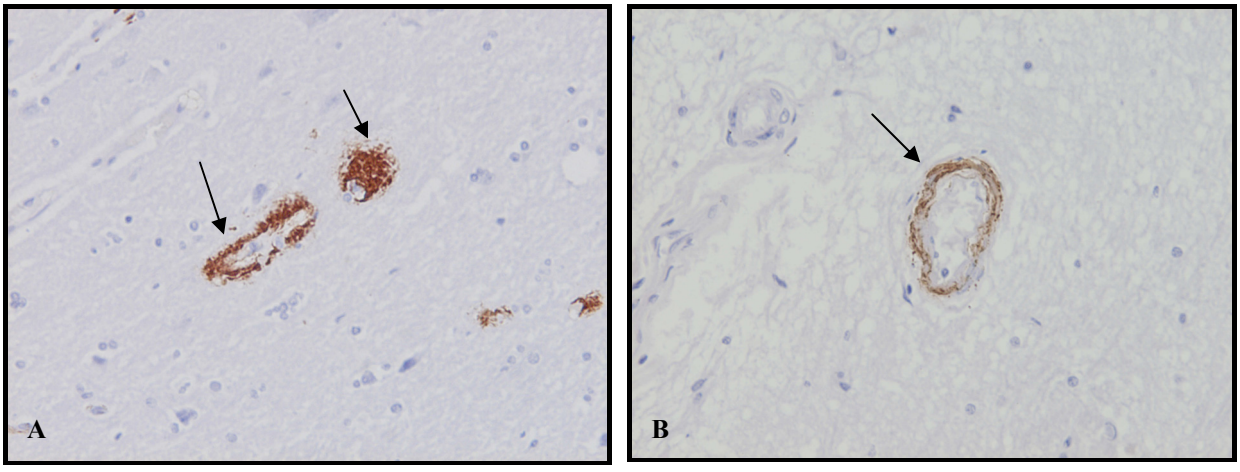


Fig.38- Angiopatia Cerebral Amilóide (⟶).**A:** deposição de amilóide em vasos dos córtex frontal, C55, anti-Aβ, 200x. **B**: deposição de amilóide na parede de vaso no hipocampo, C18, anti-Aβ, 200x

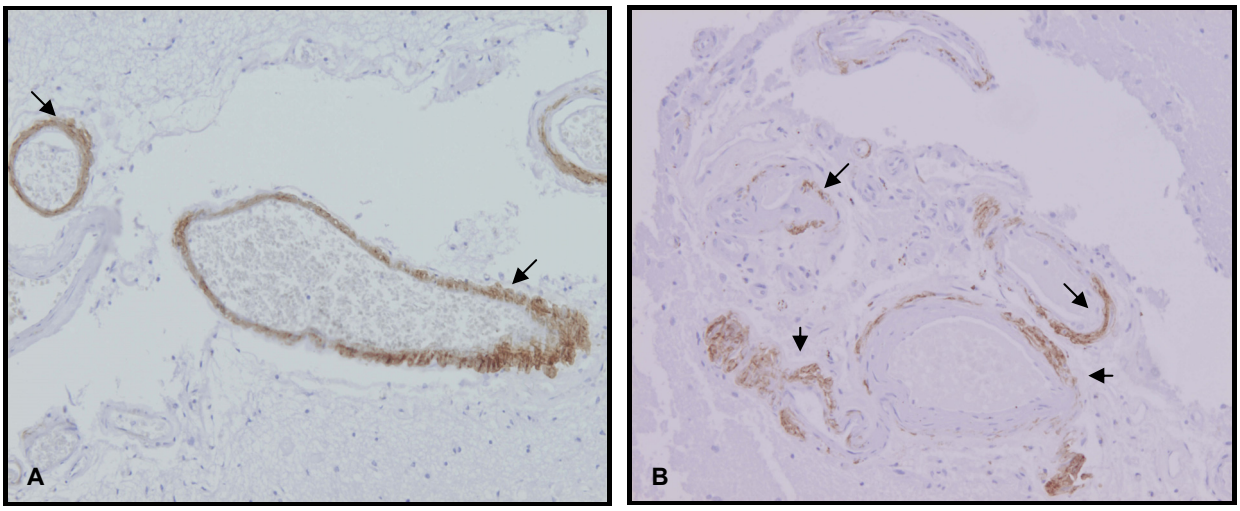


Fig.39 - Deposição de proteína Aβ na parede dos vasos leptomeníngeos (➔). **A:** deposição de proteína amilóide formando um anel contínuo à volta do vaso, C3,anti- Aβ, 40x. **B**: deposição descontínua de amilóide vascular, C12, anti- Aβ, 100x

4.6.3.2- Placas de Amilóide

Na amostra em estudo foram observadas placas de amilóide em 22 canídeos (31.4%). As placas foram mais frequentes no córtex frontal, raramente no entorrinal, sempre em animais com idade superior a 8 anos, cerca de 73% dos quais com mais de 13 anos. Verificamos uma associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis (p=0.001).

Quadro XXII - Associação entre Placas de Amilóide e a Idade

	Idade	0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Placas Amilóides	**Ausente**	16 (33.3)	18 (37.5)	14 (29.2)	48 (100)
	Presente	0 (0)	6 (27.3)	16 (72.7)	22 (100)

χ^2= 14,47; gl= 2; p=0,001

Ao estabelecermos a correspondência entre a idade do cão e a humana, em função do peso, verificamos que a associação entre as placas de amilóide e a idade continuava a ser muito significativa. Cerca de 88% dos animais com idade, correspondente à humana, a menos de 65 anos não apresentou placas de amilóide.

Quadro XXIII- Associação entre Placas de Amilóide e a Idade do cão correspondente à humana

	Idade do cão correspondente à humana	<65 anos	≥ 65 anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Placas Amilóides	**Ausente**	29 (87.9)	19 (51.4)	48 (100)
	Presente	4 (12.1)	18 (48.6)	22 (100)

$\chi 2$= 10,79; gl= 1; p=0,001

Todos os animais com placas exibiam angiopatia amilóide cerebral, mas o contrário não se verificou. O coeficiente de correlação entre as placas de amilóide, a Aβ do córtex e a Aβ das leptomeninges apresentou um valor de r = 0,60 e r = 0,51, respectivamente (p< 0,001).

As placas de amilóide apresentavam diferenças na densidade, morfologia e tamanho. A maioria dos cães (n=18) apresentava um pequeno número de placas, apenas em quatro amostras a densidade foi considerada elevada, foram eles: a amostra C24, macho SRD, com 10 anos; o C57, Caniche fêmea com 12 anos; o C23, Pequinês macho com treze anos; e o C51, macho SRD com 15 anos.

A distribuição cortical de placas iniciava-se no córtex pré-frontal e apenas em dois casos se observaram placas no córtex temporal ao nível do hipocampo. Não foram encontradas placas na substância branca.

Foram identificados os seguintes padrões de deposição de Aβ: depósitos punctiformes compactos nas camadas superficiais do córtex; depósitos difusos de grandes dimensões nas camadas mais profundas do córtex (camada V e VI); depósitos difusos nas camadas superficiais a intermédias; placas compactas nas camadas intermédias a profundas do córtex (Quadro XXIV). A maioria dos canídeos apresentava, em simultâneo, placas difusas e compactas nas camadas superficiais a intermédias do córtex.

Quadro XXIV- Distribuição do tipo de Placas de Amilóide nas camadas do córtex

Camadas córtex / **Tipo de placas**	Camadas superficiais (I- II)	Camadas intermédias (III-IV)	Camadas profundas (V-VI)
Difusas	2	4	5
Compactas	11	5	8

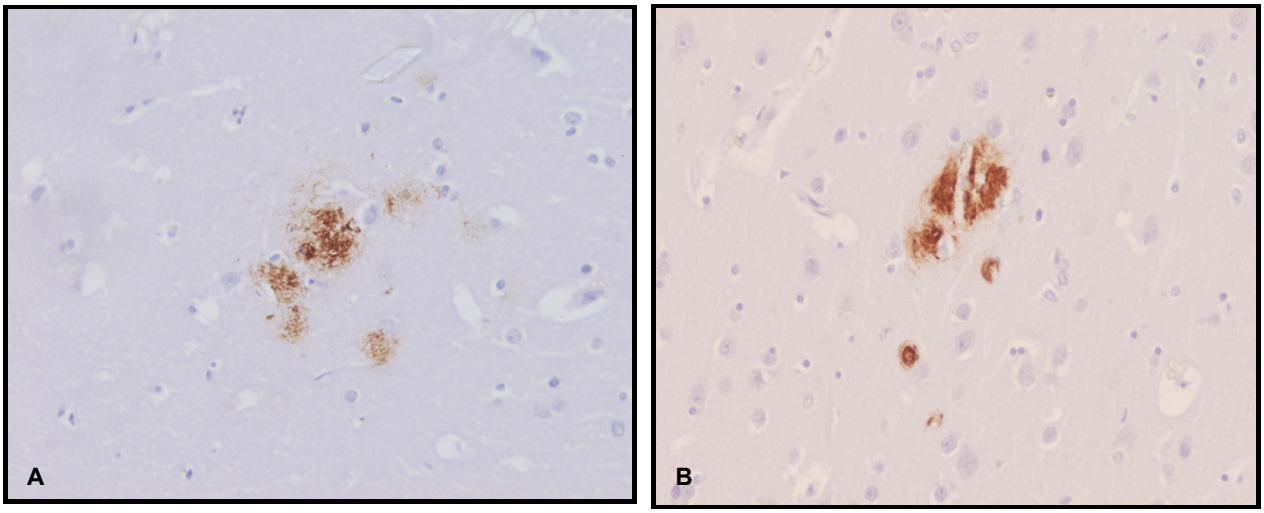


Fig.40- Placas de amilóide**. A:** placas difusas na camada profunda do córtex frontal, C24, anti-Aβ, 200x**. B:** placa de amilóide mais densa e compacta nas camadas II a III do córtex frontal, C6, anti-Aβ, 200x

O cão que apresentou um maior número de placas de amilóide e intensidade de angiopatia amilóide, foi uma fêmea Caniche, com 12 anos (C57). Demonstrava a existência de placas difusas nas camadas intermédias do córtex frontal e outras mais densas e compactas nas camadas mais profundas (Fig.41). Ao nível do córtex entorrinal observamos 2 placas compactas e uma com aspecto mais difuso. Não se sabe se apresentava défices cognitivos, foi enviada para o canil Municipal do Porto para eutanásia devido a morte da dona, junto com outro Caniche macho de 13 anos (C56), também ele com angiopatia amilóide e placas, mas em menor número e intensidade.

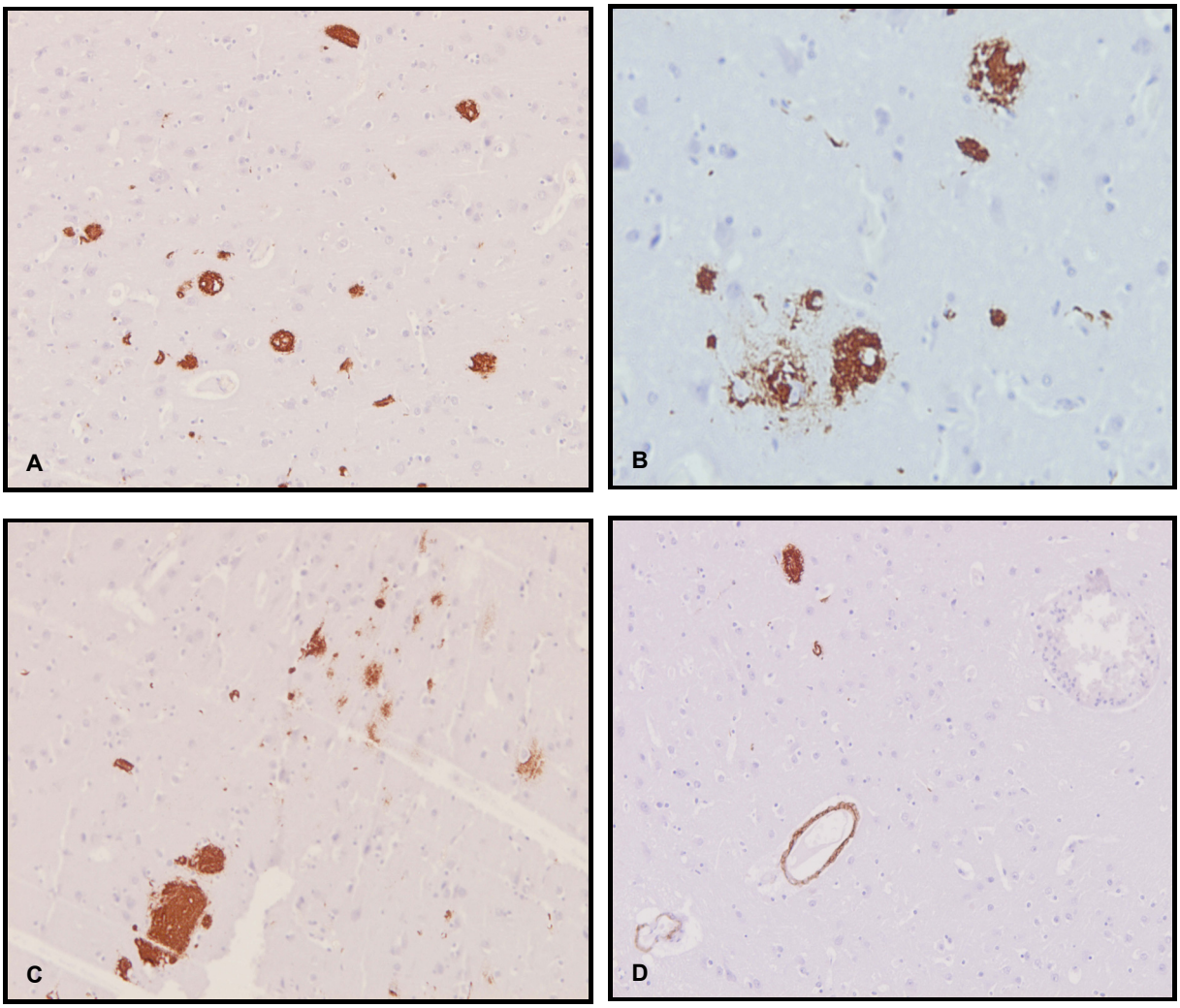


Fig.41 - Placas de amilóide e angiopatia amilóide cerebral. Canídeo 57. **A** e **B:** angiopatia amilóide e placas compactas nas camadas intermédias do córtex frontal. **A:** anti-A β,100x. **B**: anti-A β, 200x**. C:** placa compacta grande e outras mais pequenas e menos densas nas camadas mais profundas do córtex, 100x**. D:** angiopatia amilóide e placa nas camadas mais profundas do córtex, anti-A β, 100x.

As placas de amilóide dos cães em estudo eram desprovidas de infiltrado microglial hiperreactivo, apesar de se observar uma reactividade astrocitária associada (Fig.42).

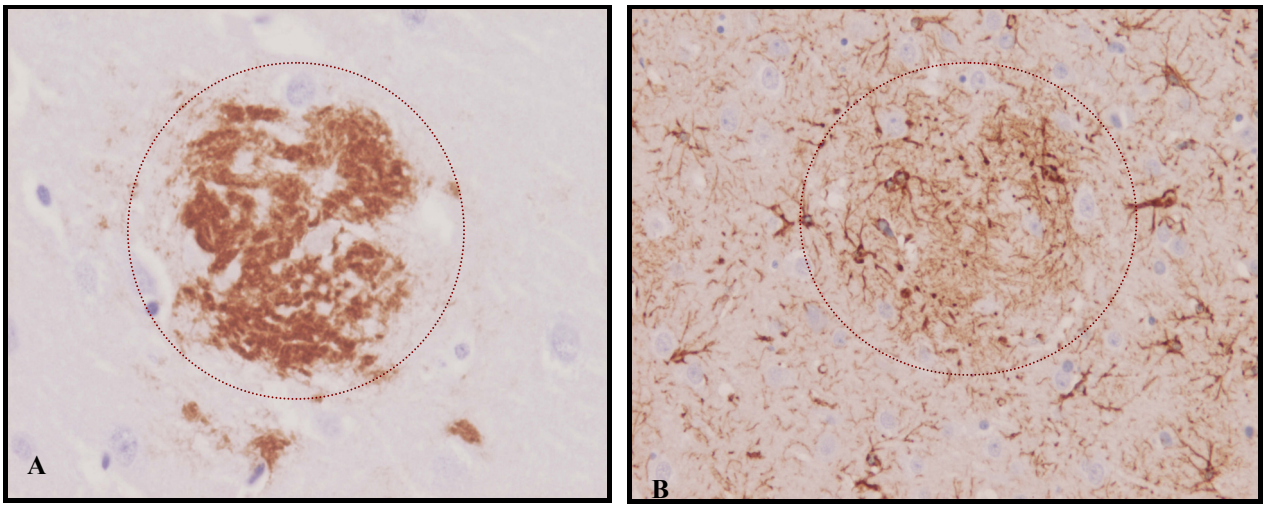


Fig.42 –Reactividade astrocitária ao redor de placa de amilóide**.** Pequinês, macho com 13 anos. **A**: deposição de Aβ vascular e placa amilóide compacta nas camadas intermédias do córtex frontal, anti-Aβ, 400x**. B:** reactividade astrocitária na área de deposição de amilóide. anti-GFAP. 200x

4.6.4- Imunorreactividade à proteína tau

No estudo da imunorreactividade à proteína *tau* encontramos alguns neurónios com marcação sugestiva de patologia neurofibrilhar, presente em cerca de 26% dos animais (n=18). Os resultados obtidos não permitiram estabelecer qualquer associação estatística com o envelhecimento (p=0,74), apesar de 50% dos cães com marcação anti-*tau* terem mais de 13 anos.

Quadro XXV- Associação entre proteína *Tau* e a idade

	Idade	0-7anos	8-12anos	≥13anos	Total
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Tau	Ausente	12 (23.1)	19 (36.5)	21 (40.4)	52 (100)
	Presente	4 (22.2)	5 (27.8)	9 (50.0)	18 (100)

$\chi 2$= 0,60; gl= 2; p=0,74

A marcação era mais evidente no hipocampo, região do Sommer Sector, ao nível do feixe de células piramidais (CA3, CA4) do que no córtex frontal. As células marcadas apresentavam uma mancha escura curvilínea ao longo do citoplasma neuronal, ou bandas mais espessas ao redor do núcleo. A marcação era mais evidente nos neurónios pequenos do que nos de grande dimensão.

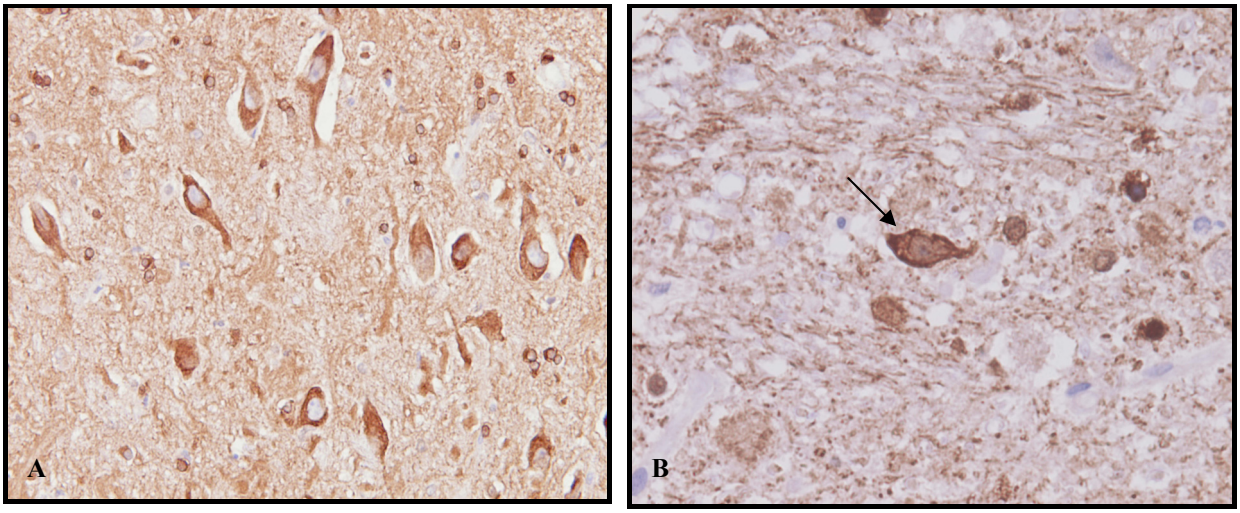


Fig. 43-Imunorreactividade à proteína tau**. A:** células piramidais do hipocampo morfologicamente normais com coloração citoplasmática difusa e fina anti-*tau*, C56, 200x**. B:** marcação anti-*tau* mais intensa ao redor do núcleo, (⟶) C18, 400x.

A microscopia electrónica demonstrou a presença de tranças neurofibrilhares em neurónios do córtex temporal, constituídas por densas bandas de filamentos helicoidais entrelaçados, que ocupavam a maior parte do citoplasma deslocando as organelas e o núcleo (Fig. 44 e 45).

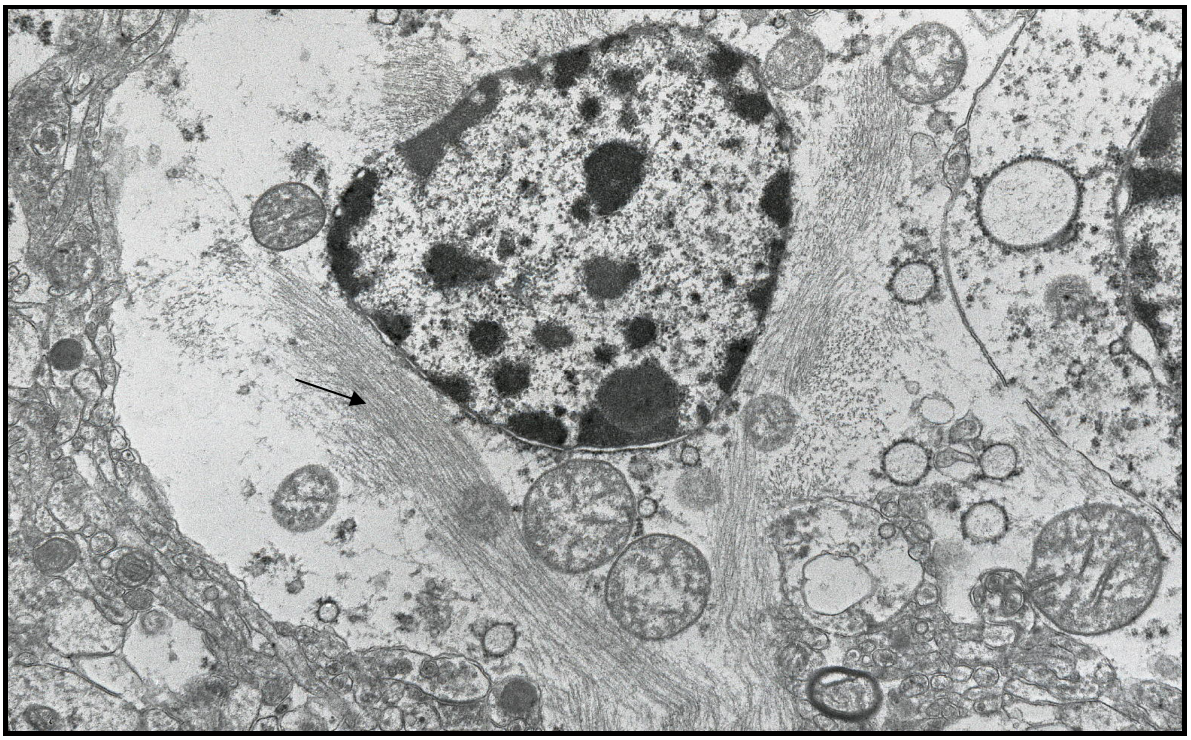


Fig.44- Trança neurofibrilhar. Microscopia electrónica de córtex temporal evidenciando filamentos de aspecto helicoidal formando uma trança neurofibrilhar (⟶), C57, 5300x.

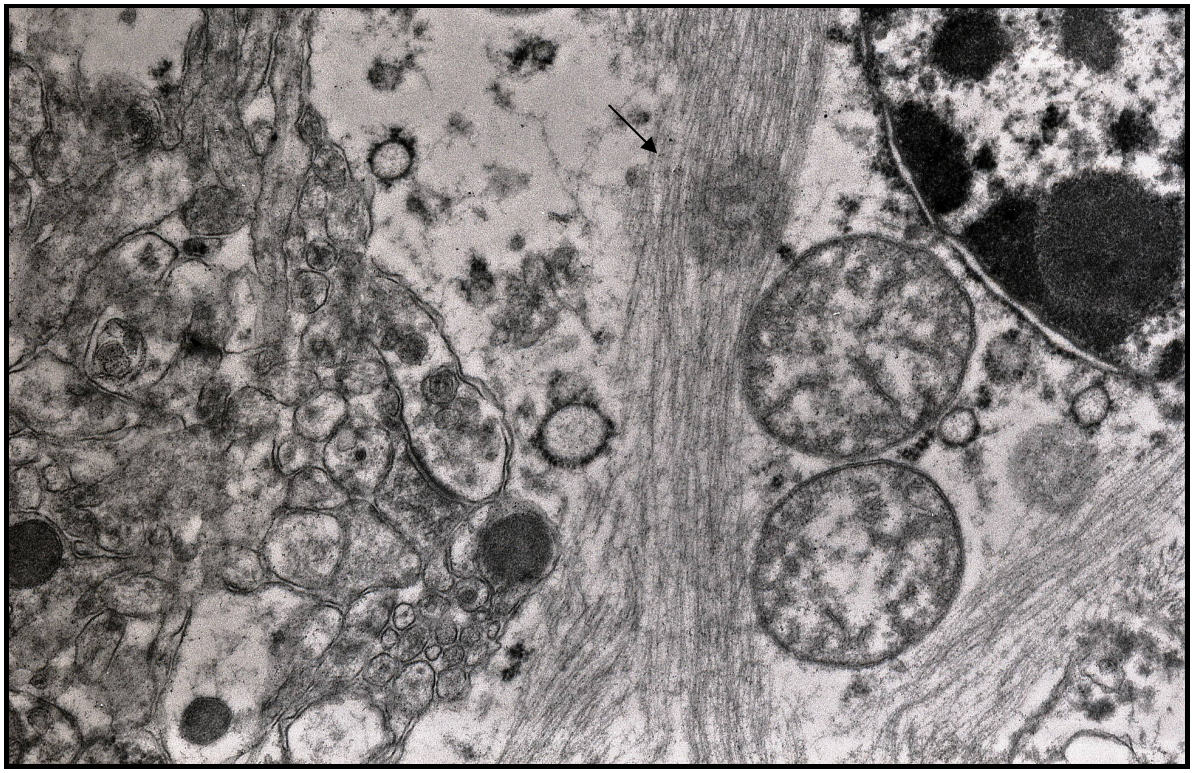


Fig.45- Trança neurofibrilhar. Ampliação da imagem anterior. Os filamentos helicoidais da trança neurifibrilhar comprimem as organelas, (⟶) C57,13000x.

4.7- Estudo do Nervo

4.7.1- Coloração de Hematoxilina & Eosina

Nos cortes corados com H&E apenas foi possível averiguar a existência de perda de fibras ou evidência de reacção inflamatória, o que não foi reconhecido nas seis amostras seleccionadas para este estudo.

4.7.2- Coloração com Azul de Toluidina

Apesar dos cortes semi-finos de nervo corados com Azul de Toluidina apresentarem artefactos relacionados com a fixação e estiramento do nervo durante a colheita, a densidade de fibras mielinizadas era normal, não se observaram fibras em degenerescência ou alterações da mielina nos seis casos estudados.

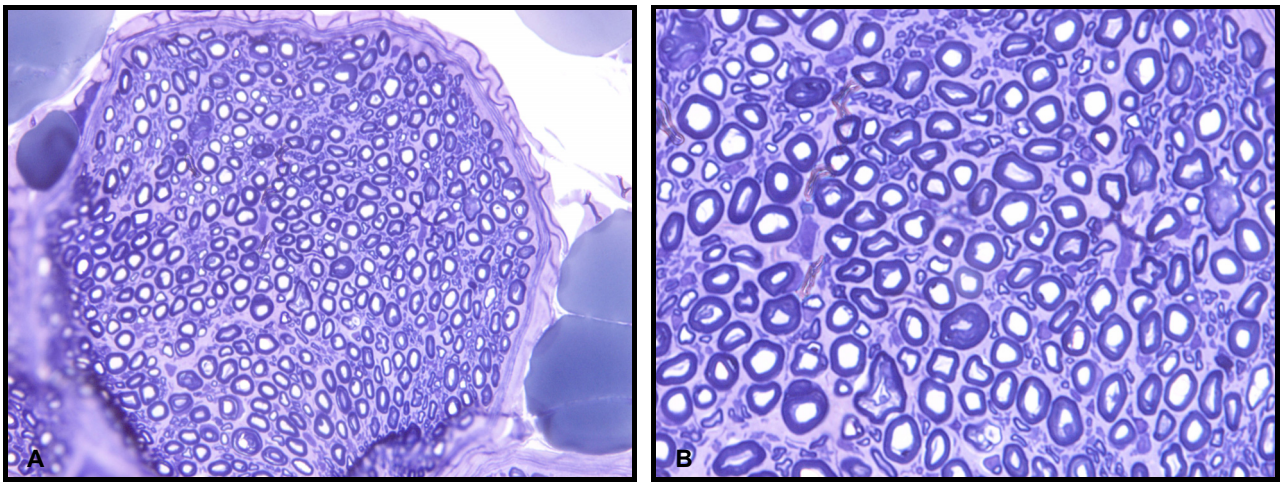


Fig. 46- Imagem de nervo sural corado com Azul de Toluidina. Normal densidade de fibras mielinizadas e sem alterações degenerativas. **A:** C29, 200x. **B:** C29, 400x

4.8- Estudo do Músculo

As colorações que se utilizam por rotina são a Hematoxilina e Eosina e o Tricrómio de Gomori. Ambas demonstram claramente a morfologia das fibras musculares, os elementos não-contrácteis, tal como os nervos, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, tecido adiposo e núcleo, mas também as estruturas anormais das fibras musculares, como os ”bastonetes”(nemaliníca).

4.8.1- Coloração de Hematoxilina & Eosina

A coloração H&E de cortes transversais de músculo-esquelético de 4 amostras, demonstrou normal densidade de fibras musculares, de contornos poligonais dispostas em mosaico. Não foram observadas alterações inflamatórias, necrose ou fibrose.

No canídeo C28, uma fêmea de raça Pastor Alemão com 16 anos, foi observada uma variação no diâmetro das fibras musculares, algumas das quais atrofiadas e de contornos angulosos sugestivo de atrofia neurogénica, patologia associada ao envelhecimento (Fig.47B). O cão C30, uma fêmea Caniche com 16 anos apresentava fibras hipertrofiadas com uma grande variação de diâmetro, sugestivo de alterações miopáticas.

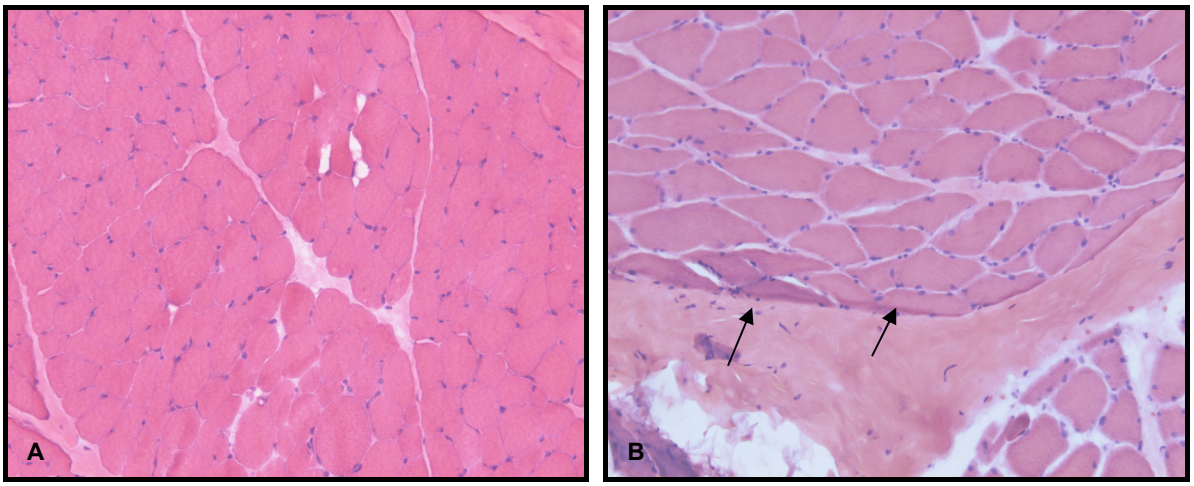


Fig.47- Imagens histológicas de músculo deltóide. **A**: músculo com fibras de diâmetro normal, C27, 1 ano idade, H&E, 100x. **B**: presença de fibras musculares angulosas atrofiadas na periferia do feixe muscular (↘), C28, 16 anos, H&E, 100x.

4.8.2- Coloração de Tricrómio de Gomori

No cão C28 foram observadas fibras com acumulação de mitocôndrias à periferia, caracterizadas por bordos vermelhos de espessura irregular. Estas fibras são denominadas em inglês de "ragged red fibers", (fibras rotas e vermelhas) e são indicativas de acumulação de mitocôndrias. Neste caso apenas havia acumulação anormal, mas não a formação de "ragged red fibers".

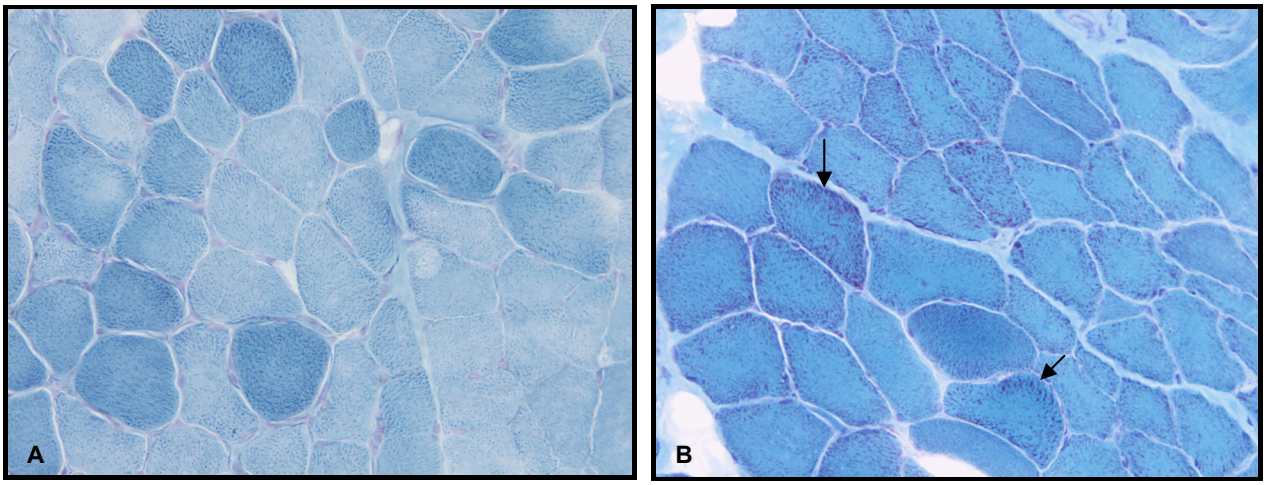


Fig.48 - Músculo corado com Tricrómio Gomori. **A**: músculo normal, C26, 200x. **B:** músculo com agrupamento de mitocôndrias na periferia das fibras, (↘) C28, 200x.

4.8.3 -Estudo histoquímico

A aplicação de colorações histoquímicas a cortes congelados de tecido muscular esquelético, capazes de avaliar os componentes enzimáticos, possibilitou a demonstração dos principais tipos de fibras, que não são identificados em cortes de parafina pela coloração de rotina H&E. As que melhor identificam as diferenças de actividade biológicas são a Adenosina-trifosfatase alcalina e ácido-resistente, ATPase 9,4 e 4,35, respectivamente, e a Nicotinamida adenina dinucleotídeo redutase (NADH), que avaliam a actividade enzimática oxidativa. Estas duas técnicas permitiram a divisão das fibras em dois grandes grupos: as fibras do tipo I e as fibras do tipo II.

4.8.3.1- Reacção às Hidrolases - ATPase

O estudo histoquímico através da reacção com a ATPase revelou a existência de três tipos de fibras: fibras do tipo I, escuras em pré-incubação ácida e negativas em pré-incubação básica, de metabolismo oxidativo; fibras do tipo II, ricas em glicogénio, negativas na pré-incubação ácida e, fortemente positivas na alcalina; e fibras intermédias em ambas as pré-incubações, denominadas de fibras IIB. Variando-se o pH em que é feita a reacção histoquímica para ATPase, as fibras de um tipo reagem e as do outro tipo reagem menos intensamente. As fibras reactivas são demonstradas em castanho-escuro. As não reactivas têm uma coloração esbranquiçada. As amostras de músculos deltóides estudados apresentavam um aparente predomínio de fibras tipo II, embora numa amostra se verificasse um equilíbrio das fibras, com um aspecto mais em "mosaico":

Quadro XXVI- Tipos de fibras musculares

ATPases / Tipo de fibras	PH 9,4	PH 4,35
• **Fibras tipo I**	Claras	Escuras
• **Fibras tipo IIA**	Escuras	Claras
• **Fibras tipo II B**	Cor intermédia	Cor intermédia

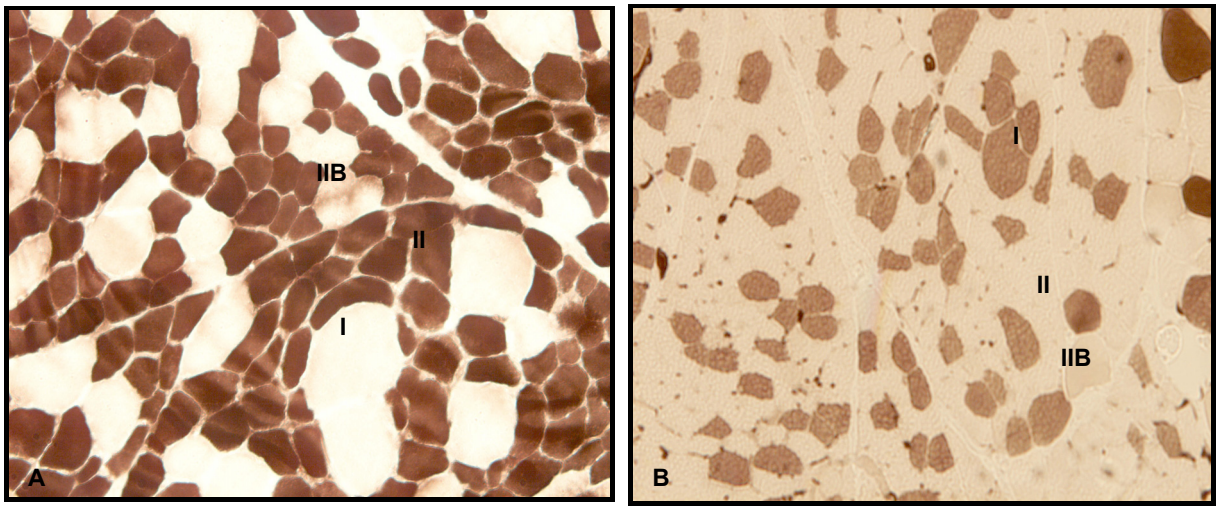


Fig.49- Tipos de fibras musculares identificados através da reacção com ATPase 9,4 e 4,35. **A**: reacção muscular à ATPase 9,4, C26,100x. **B**: reacção muscular à ATPase 4,35, C26, 100x .

4.8.3.2- Reacção às Desidrogenases - NADH e SDH

4.8.3.2.1- Reacção à NADH

A NADH, é uma enzima oxidativa que avalia o metabolismo do glicogénio na fibra muscular. Esta reacção também distingue as fibras do tipo I das do tipo II. As do tipo I, que têm intensa actividade oxidativa, são ricas na enzima e coram de escuro. As de tipo II, que dependem mais da glicólise anaeróbica, aparecem claras. O comportamento das fibras quando sujeitas à reacção metabólica da NADH, demonstrou um amplo espectro de intensidade de coloração (Fig.50).

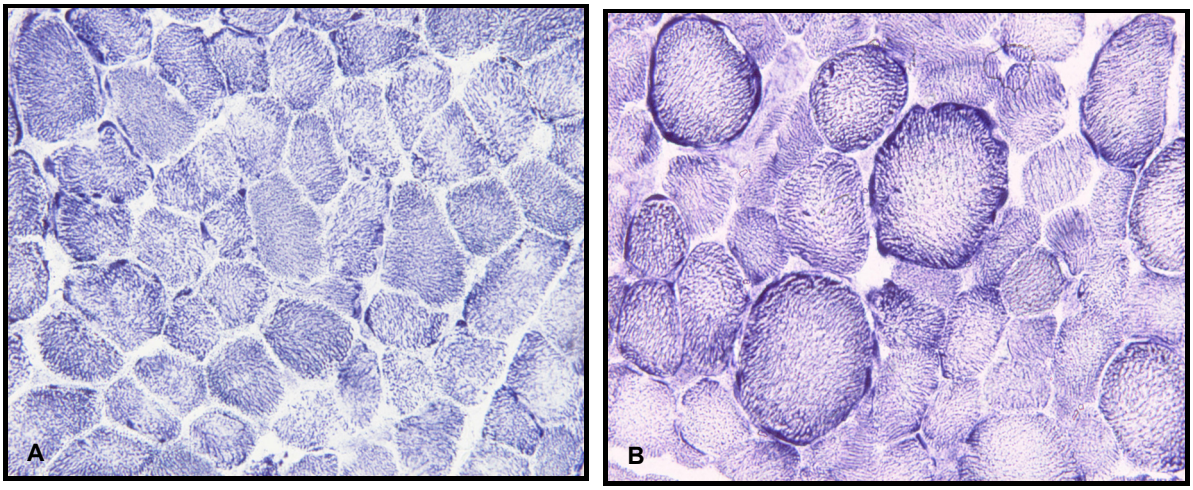


Fig.50-Reacção do tecido muscular à NADH**,** Fibras escuras: tipo I; Fibras claras: tipo II. **A**: músculo normal após reacção com NADH, C26, 100x.**B:** C27, 200x

4.8.3.2.2- Reacção à SDH

Foram observadas algumas zonas de hiperactividade em espelho na periferia das fibras. Isto deve-se a uma maior acumulação de mitocôndrias nas zonas junto a vasos, sendo uma reacção normal (Fig.51A). No caso C28 a reacção à Succinato Desidrogenase demonstrou a presença de fibras com a denominação de “target fibers” caracterizadas por um halo claro central desprovido de actividade enzimática oxidativa, uma zona intermédia com densa coloração e aumento da actividade enzimática e uma zona periférica normal (Fig.51B). A maioria das “target fibers” é em fibras do tipo I.

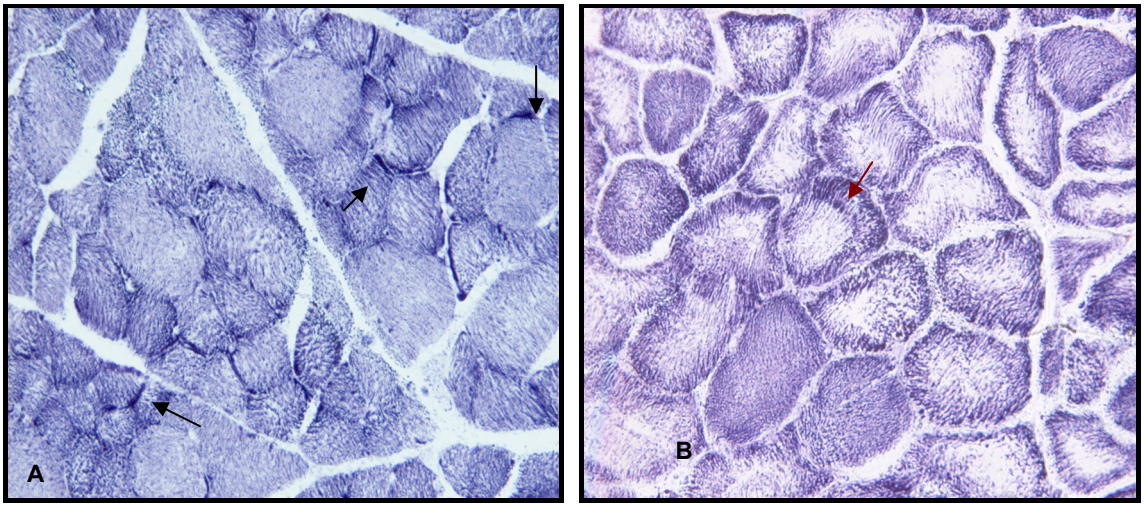


Fig.51-Reacção do tecido muscular à SDH. **A**: hiperreactividade na periferia das fibras (⟶, C30, 200x. **B**:, músculo com presença de fibras com halo claro central "target fibers" (↘), C28, 200x

4.8.3.3-Coloração com PAS

O estudo da coloração demonstrou que as fibras de Tipo II, acumulavam mais glicogénio do que as de tipo I.

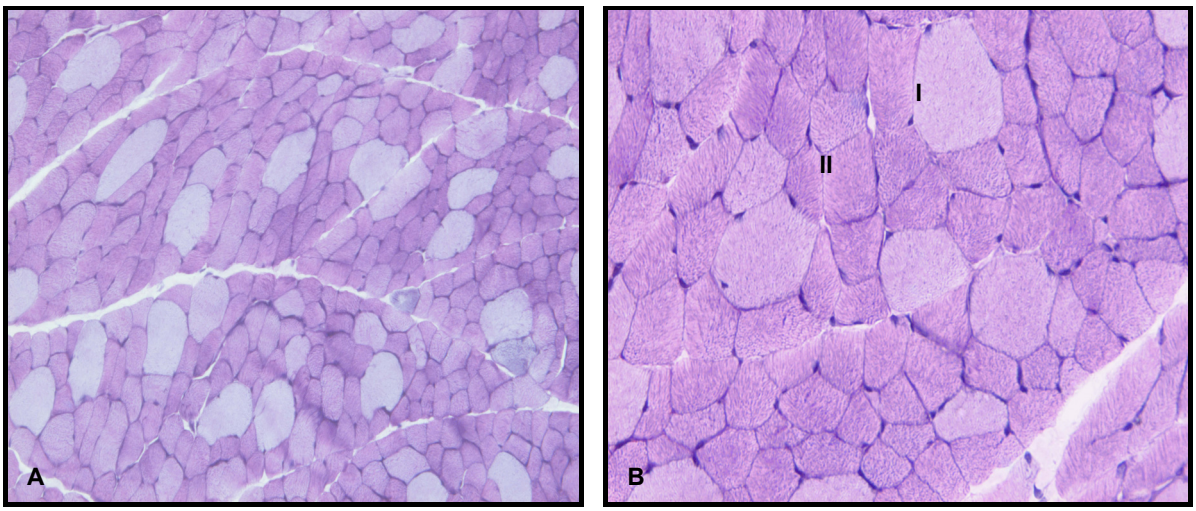


Fig.52- Reacção do tecido muscular à coloração com PAS. **A**: fibras Tipo II com mais quantidade de glicogénio, C30,100x. **B:** C29, 200x

5-DISCUSSÃO

O cão é um excelente modelo de estudo das alterações neurológicas, neuroquímicas e cognitivas verificadas no envelhecimento (Dimakopoulos & Mayer, 2002).

Assim, a amostra constituída por 70 cérebros de cão de várias raças e escalões etários foi objecto de estudo macroscópico, histopatológico, imunohistoquímico e ultra-estrutural para identificar e caracterizar as principais alterações descritas no processo de envelhecimento.

A variabilidade de raças estudadas não influenciará os resultados finais pois, vários autores demonstraram que a raça não tem qualquer efeito no tipo de lesão neuropatológica observada (Kiatipattanasakul *et al*., 1996 ;Borras *et al.,* 1999; Colle *et al*., 2000; Rofina *et al*., 2003; Rofina *et al.,* 2004). A idade seria o factor mais determinante no aparecimento da maioria das lesões que esperávamos encontrar. Por isso, os animais foram divididos em três grupos etários para o estudo de associação com os diferentes parâmetros biológicos. Embora ocorram muitas variações individuais entre animais, foram considerados idosos os cães com mais de 8 anos à semelhança do efectuado por outros estudos (Head *et al.,* 1998; Adams *et al.,* 2000; Callaham *et al.,* 2000) e ainda estabelecemos um terceiro grupo, igual ou superior a 13 anos, uma vez que algumas alterações serão mais constantes após esta idade (Walker *et al.,* 1997; Skoumalova *et al.,* 2003;Rofina *et al.,* 2004).

No processo de envelhecimento verifica-se uma gradual redução de todas as funções fisiológicas, com diminuição da competência imune e um aumento da predisposição para doenças infecciosas e neoplásicas (Mosier *et al*., 1989;Goldston & Hoskins, 1999;Greeley *et al.,* 2001). Os dados obtidos na necrópsia destes setenta cães indicam que as patologias renais, cardíacas e as neoplasias são as que mais atingem os cães idosos, reflectindo a falência dos principais órgãos.

Uma vez que nos cães idosos é frequente observar uma alteração cognitiva semelhante à verificada nos doentes com Alzheimer (Cummings *et al.,* 1993; Ruehl *et al.,* 1997), uma das etapas foi tentar estabelecer uma associação entre as lesões encontradas no SNC, a idade e a performance cognitiva dos cães. Para isso foi elaborado um inquérito que pretendia averiguar a existência de alterações de comportamento ou sinais de demência. Como os animais com patologias hepáticas e renais, demonstram alterações comportamentais semelhantes às observadas nos canídeos dementes (Parker, 1995), foram realizadas colheitas de sangue a 26 cães. Deste modo, após exclusão destas patologias, poderíamos estabelecer uma associação entre as lesões neuropatológicas, o comportamento e défices cognitivos. No entanto,

dado que não obtivemos respostas suficientes e consistentes no inquérito de avaliação da performance cognitiva, não nos foi possível fazer esse estudo.

O passo seguinte foi a descrição e estudo macroscópico do encéfalo. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos no âmbito das alterações macroscópicas, indicativas de alterações que acompanham o processo de envelhecimento. A redução do volume dos hemisférios cerebrais, associada a um alargamento dos sulcos do córtex cerebral, em especial do lobo frontal e temporal, com dilatação dos ventrículos e concomitante aumento do volume do líquido cefalorraquidiano são algumas das alterações descritas no cérebro do cão idoso (Su *et al.,* 1998; Dimakopoulos & Mayer, 2002; Tapp *et al.,* 2004, 2006).

O volume total do cérebro, que inclui o tecido cerebral e o líquido cefalorraquidiano, aparece associado ao peso corporal (Su *et al.,* 1998). Uma investigação que envolveu 18 cães, com idades compreendidas entre os 4 e 15 anos, mostrou que o tamanho do cérebro é proporcional ao peso do animal (Su *et al.,* 2002), facto também verificado no nosso estudo, a correlação entre as duas variáveis foi de 0,86 ($p < 0.001$).

O volume total do cérebro do cão diminui com a idade, sendo que após os 8 anos é observada uma significativa diminuição de volume do lobo frontal que precede a redução do volume total do cérebro o que sugere que o lobo frontal é uma área cerebral particularmente sensível ao envelhecimento (Tapp *et al.,* 2004). O volume do hipocampo também sofre uma diminuição com a idade reflectindo-se na performance cognitiva, o que não é de admirar dada a sua importância nas funções de aprendizagem executivas (Tapp *et al.,* 2006). Contudo, outros estudos volumétricos sugerem que esta aparente diminuição pode ser artefactual uma vez que não encontraram correlação entre o volume do cérebro e o envelhecimento (Dimakopoulos & Mayer, 2002). Neste trabalho, não foi possível estabelecer associação entre a idade e a diminuição do peso do encéfalo. No entanto, entre canídeos da mesma raça, 14 Caniches, verificamos uma diminuição do peso com o envelhecimento, apresentando um coeficiente de correlação igual a -0,625, ($p=0,02$).

Sinais sugestivos de uma atrofia do córtex caracterizada macroscopicamente por um afundamento dos sulcos e estreitamento das circunvoluções, foram observados em vários canídeos idosos neste trabalho, à semelhança do descrito por outros autores (Su *et al.,* 1998; Dimakopoulos & Mayer, 2002; Olby, 2005;Tapp *et al.,* 2004, 2006). As causas para a atrofia da substância cinzenta associada ao envelhecimento podem envolver vários mecanismos neuropatológicos, nomeadamente a progressiva acumulação no cérebro de toxicidade Aβ e a perda neuronal ou sináptica (Head & Torp, 2002). Esta alteração foi demonstrada em modelos animais, (Azcoitia *et al.,* 2005; Smith

et al., 2004) incluindo o modelo canídeo (Morys *et al.,* 1994; Pugliese *et al.,* 2004; Siwak-Tapp *et al.,* 2006). Em contraste com o volume global da substância cinzenta, as alterações da substância branca não são tão significativas, no entanto existem algumas alterações regionais associadas ao envelhecimento, envolvendo a cápsula interna e o corpo caloso (Tapp *et al.,* 2006). Em termos funcionais, o envelhecimento implica uma redução do fluxo sanguíneo ao cérebro com diminuição do metabolismo da glucose e do oxigénio. Esta redução no fluxo sanguíneo pode estar, em parte, associada à atrofia cerebral (Tanna *et al.,* 1991).

A dilatação dos ventrículos laterais, que se observa no normal envelhecimento humano, foi observada em 43% dos cães do estudo, apresentando uma associação significativa com a idade (p=0,03). Cerca de metade dos animais com mais de 8 anos de idade, apresentava dilatação ventricular, tendo sido verificada em apenas três cães da classe etária I. Os estudos efectuados, descrevem que o tamanho dos ventrículos laterais aumenta lentamente até aos 10 anos de idade e depois mais rapidamente. Ou seja, a relação entre a dilatação ventricular e a idade não parece linear, será estável até à idade de 10 anos e depois progride rapidamente (Su *et al*., 1998; Su *et al*., 2005). Este facto sugere que estas são alterações normais determinadas pelo envelhecimento morfológico ou exigências funcionais do cérebro que, indirectamente afectam os ventrículos assim como outras estruturas do SNC (Hirai *et al.,* 1996;Borras *et al.,* 1999).

Foi também detectada assimetria entre o ventrículo direito e o esquerdo. A presença de coartações pode explicar estas assimetrias. Este facto é uma constante nos cornos temporais dos ventrículos laterais, tal como observou González-Sorino e colaboradores (2001), num estudo desenvolvido em cães de raça Pastor Alemão. Apesar deste fenómeno parecer justificar, do ponto de vista morfológico, a assimetria dos ventrículos laterais, a sua possível relação com sinais fisiológicos ou clínicos não é conhecida (González-Sorino *et al.,* 2001).

A dilatação dos ventrículos laterais não apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas (p=0,36), resultados semelhantes aos verificados por outros grupos (Su *et al.,* 1998;González-Sorino *et al.,* 2001; Su *et al.,* 2005; Kimotsuki *et al.,* 2005).

Em relação ao tamanho do III ventrículo, não foi possível, por observação macroscópica, detectar alterações de tamanho ou forma. Contudo, a relação do III - ventrículo com o tálamo e outras estruturas do diencéfalo prevê que qualquer atrofia neuronal (Borras *et al.,* 1999), alteração vascular e perivascular (Summers *et al.,* 1995) que atinja estas estruturas se possa reflectir no tamanho e forma do ventrículo, provocando o seu alargamento (González-Sorino *et al.,* 2001).

Assim, de acordo com os nossos resultados e o de outros autores (Su *et al*., 1998; Borras *et al.,* 1999; González-Sorino *et al.,* 2001; Su *et al*., 2005), verificam-se

importantes alterações no sistema ventricular no processo de envelhecimento dos cães, provavelmente relacionadas com a perda neuronal e a atrofia da substância branca.

A fibrose das meninges e dos plexos coróides está descrita nos cães como uma alteração associada ao envelhecimento (Shimada *et al.,* 1992;Borras *et al.,* 1999). É caracterizada pela proliferação de fibras de colagénio e pela presença de fibroblastos (Borras *et al.,* 1999). A fibrose das meninges, representada macroscopicamente por uma opacidade esbranquiçada dos sulcos cerebrais foi um dos achados macroscópicos mais frequentes, afectando 81% dos canídeos, metade dos quais com mais de 13 anos de idade. A intensidade da fibrose não variava muito entre os grupos etários, mas era uma constante nos animais com mais de 14 anos, o que está de acordo com outros estudos (Borras *et al.,* 1999; Ferrer *et al.,* 1993). O espessamento das leptomeninges geralmente apresentava uma distribuição difusa mais evidente nos hemisférios cerebrais, particularmente nos sulcos. Raramente se observou fibrose na base do cérebro, tal como o verificado por Borras e colaboradores (1999). Apesar de não ter sido possível estabelecer associação estatística significativa entre o porte do animal e a fibrose meningea ($p=0.30$), talvez devido ao reduzido número de exemplares de raça grande e gigante, verificamos que a fibrose apresentava uma tendência para um aparecimento mais precoce nos animais de raças grandes comparativamente aos de raça pequena.

O cálcio é um dos mais importantes mensageiros intracelulares do cérebro, essencial no desenvolvimento neuronal, transmissão, plasticidade sináptica e na regulação de vários processos metabólicos (Mattson & Chan, 2001). Nos humanos a precipitação de cálcio está descrita em diversas situações patológicas tais como a anóxia de nascimento, na síndroma de Down, na demência pré-senil e em determinadas doenças inflamatórias e infecciosas (Ansari *et al.,* 1990; Rodriguez *et al.,* 2001;Ramonet *et al.,* 2002). Uma moderada a severa calcificação nos núcleos da base pode ser observada, como um achado acidental não associado a sintomas, ou nas alterações do metabolismo fosfo-cálcio (Oppenheimer, 1992).

A calcificação irregular das meninges, por vezes associada a focos de metaplasia condróide a óssea foi observada em 38,5% dos canídeos ($n=27$), não apresentando associação significativa com o envelhecimento ($p=0.08$). A calcificação das meninges aparecia sob a forma de estruturas basófilas concêntricas semelhantes a corpos psamomatosos nas leptomeninges dos hemisférios, idêntico ao descrito por estudo de Borras e colaboradores (1999). Também foi possível reconhecer em seis casos (8,6%), a presença de depósitos mineralizados nas camadas mais externas do córtex cerebral. Ao atribuir um significado clínico a este tipo de lesões, o número e a extensão deve ser tida em consideração, (Borras *et al.,* 1999) pois sabe-se que a metaplasia óssea da medula espinal de canídeos idosos pode induzir alterações neurológicas (Wilson *et al.,* 1975).

O significado da calcificação a nível do córtex e das meninges não é claro. Alguns estudos referem a calcificação como parte do mecanismo compensatório excitotóxico da morte neuronal (Bernal, *et al.,* 2000; Mahy *et al.,* 1995). O aumento de precipitação de cálcio pode reflectir um processo excitotóxico mais activo (Ramonet *et al.,* 2002). No rato existem estudos que estabelecem uma associação entre a extensão da calcificação e a intensidade de activação do receptor de glutamato (Petegnief *et al.,* 1999). O glutamato estimula o fluxo glicolítico glial, libertando lactato como forma de substrato energético aeróbio para os neurónios. Esta redução no pH favorece as interacções entre o fósforo e o cálcio, o que pode explicar a formação de precipitados de cálcio a nível cerebral (Sibson *et al.,* 1998; Rodriguez *et al.,* 2001). Na demência vascular e nos casos de hipoxia-isquémia, a reduzida vascularização poderá diminuir substancialmente a produção de energia e, deste modo, a capacidade dos neurónios e astrócitos manterem os níveis basais citoplasmáticos (Sibson *et al.,* 1998 ; Rodriguez *et al.,* 2001).

Na doença de Alzheimer, tem sido estabelecida associação entre algumas características neuropatológicas, nomeadamente as tranças neurofibrilhares e as placas senis, e uma perturbação da homeostasia do cálcio. Segundo parece, no centro do processo degenerativo está uma incapacidade dos neurónios regularem os níveis de cálcio intracelular (Mattson & Chan, 2001; Brzyska & Elbaum, 2003). A deposição de proteína β-amilóide no córtex sob a forma de placas foi observada em 22 animais, mas apenas 6 apresentavam imagens de mineralização do córtex, não sendo possível estabelecer, nesta fase de evolução da deposição de proteína Aβ, qualquer tipo de relação causa efeito entre ambas.

A existência de calcificação em animais sem sinais de isquémia ou deposição de proteína Aβ e até em jovens leva-nos a reforçar a ideia, à semelhança do verificado nos humanos, que a intensidade e extensão da calcificação das meninges e do córtex será também influenciada por outros factores, nomeadamente nutricionais, metabólicos ou na consequência de processos infecciosos (Oster *et al.,* 1988; Ramonet *et al.,* 2002).

A perda neuronal selectiva é uma importante alteração verificada no cérebro dos canídeos relacionada com o envelhecimento (Siwak-Tapp *et al.,* 2006; Morys *et al.,* 1994; Kiatipattanasakul *et al.,* 1996; Summers *et al.,* 1995 Su *et al.,* 1998; Cummings *et al.,* 1996[1]), principalmente nas III e IV camadas do córtex frontal, temporal e occipital (Cummings *et al.,* 1996[1]). Segundo Morrys *et al.,* (1994) os cães com idades superiores a 19,5 anos apresentam uma redução de 18.5 % no número de neurónios quando comparado com animais jovens. Ao nível do hipocampo também se verifica uma significativa perda neuronal na região do hilo, tal como se observa nos humanos, mas não em outras sub-regiões ou no córtex entorrinal (Siwak-Tapp *et al.,* 2006). Estudos mais recentes descrevem a perda de células de Purkinje e de células da camada granular

do cerebelo como uma alteração relacionado com o envelhecimento (Pugliese *et al.,* 2007). Apesar de no nosso estudo não ter sido realizada uma análise quantitativa da perda neuronal foi observada satelitose, indicativa de perda neuronal, em 74% dos canídeos em estudo, 50% dos quais com idade igual ou superior a 13 anos, apresentando uma associação significativa com a idade (p=0,001) Também observamos imagens de descontinuidade da camada de células de Purkinje em vários cães, nomeadamente nos mais idosos.

Durante o processo de envelhecimento e nas doenças degenerativas associadas à idade tais como a doença de Parkinson e Alzheimer, a perda neuronal é acompanhada pela proliferação de astrócitos, quer através da ampliação das suas propriedades funcionais intrínsecas, cujo objectivo é depurar os detritos neuronais e as toxinas, quer com a produção de vários agentes tróficos (Schipper, 1996;Tacconi, 1998;Pugliese *et al.,* 2006).

Os astrócitos compreendem cerca de um terço do volume do córtex cerebral constituindo o elemento celular mais numeroso do tecido cerebral. Participam em vários processos fisiológicos e patológicos. O suporte e metabolismo do SNC são uma função tradicionalmente atribuída aos astrócitos (Kreutzberg *et al.,* 2002). Estão envolvidos na migração neuronal, no crescimento das neurites, na sinaptogénese e plasticidade sináptica, na manutenção de barreira hematoencefálica, na regulação da água e de substâncias neuroactivas como os neurotransmissores, no metabolismo iónico e dos aminoácidos, no suporte de energia e nutrientes, na modulação da resposta imune e inflamatória e na função fagocitária (Schipper, 1996; Overmyer, 2002; Colombo *et al.,* 2000; Kreutzberg *et al.,* 2002). A síntese, armazenamento e catabolismo de glicogénio é uma função glial única dos astrócitos (Kreutzberg *et al.,* 2002). Os astrócitos estão divididos em subclasses de acordo com a sua morfologia e localização (Frederickon *et al.,* 1992). Com base em critérios morfológicos, os astrócitos são classificados em: a) astrócitos protoplasmáticos, na substância cinzenta, caracterizados por delicados prolongamentos finamente ramificados à volta das células nervosas e outras células do neurópilo; b) astrócitos fibrosos, na substância branca, caracterizados por prolongamentos mais espessos e rectilíneos, por entre os axónios e outras células gliais, principalmente os oligodendrócitos.

O principal constituinte bioquímico dos filamentos gliais é a proteína glial fibrilhar acídica (GFAP), uma proteína dos filamentos intermédios do citoesqueleto celular (Kreutzberg, *et al.,* 2002; Pugliese *et al.,* 2006). Nem todos os astrócitos expressam níveis detectáveis de GFAP no seu estado normal (Kreutzberg *et al.,* 2002) no entanto, a resposta dos astrócitos à lesão do SNC é manifestada pelo aumento do número e tamanho dos astrócitos que expressam proteína glial fibrilhar acídica, referidos como

astrócitos reactivos (AR) (Bodjarian *et al*., 1997). Sob determinadas circunstâncias podem mesmo mediar efeitos distróficos no sistema nervoso central e contribuírem para o declínio da função neurológica. São exemplo destas situações os casos de hipoxia, de stress oxidativo e exposição a metais em que verifica a acumulação e libertação de aminoácidos excitotóxicos, que formam uma cicatriz no tecido em resposta à lesão do SNC (Schipper, 1996).

O envolvimento dinâmico dos astrócitos durante as lesões, passíveis de benefícios e efeitos deletérios, é observado nos casos de morte neuronal que decorre essencialmente de três tipos de patologias do sistema nervoso central: 1) isquemia, anoxia e trauma, em que os astrócitos tentam fazer a reparação do tecido cerebral; 2) nas encefalopatias metabólicas, nas quais as alterações astrocitárias são causa primária de défice de função neuronal; 3) nas doenças degenerativas crónicas em que a astrocitose é uma das principais características (Tacconi, 1998).

O córtex humano contém muito poucos astrócitos reactivos, (Frederickon, 1992) mas o número aumenta com a idade em certas regiões do cérebro e em determinadas patologias, (Hansen *et al.,* 1987; Beach *et al.,* 1989) tais como nas doenças neurodegenerativas, desmielinizantes, em infecções do SNC, tumores, traumas (Biernat *et al.,* 1995) e, especialmente, na doença de Alzheimer (Dickson *et al.,* 1988; Beach *et al.,* 1989). A imunorreactividade à proteína GFAP está normalmente limitada à área subpial e substância branca nos casos não associados a demência (Dickson *et al.,* 1988), enquanto que na doença de Alzheimer os astrócitos reactivos aparecem a rodear as placas senis (Dickson *et al.,* 1988) ou difusamente no tecido nervoso (Renkawek et *al.,* 1994). O estímulo que conduz, definitivamente, ao acréscimo de expressão da GFAP ainda não está bem compreendido, mas o aumento de produção de factor β de transformação de crescimento (TGF-β) nos astrócitos reactivos eleva a expressão de GFAP. Os estímulos bioquímicos que produzem a activação dos astrócitos também podem advir da microglia, neurónios e oligodendrócitos (Frederickon, 1992).

A astrocitose no córtex foi observada em 67 canídeos, 80,6% dos quais com mais de 8 anos de idade, constatando-se uma associação significativa com a idade ($p=0.045$). A astrocitose na substância branca não demonstrou relação com a idade ($p=1$), uma vez que também estava presente em cerca de 23% dos canídeos com menos de 8 anos. O hipocampo, foi uma das áreas que evidenciou maior intensidade de astrocitose, mesmo nos animais jovens. Este facto talvez seja explicado porque esta área é mais sensível ao stress oxidativo (Czeh *et al.,* 2005), hipoxia (Siwak-Tapp *et al.,* 2006) e hipertensão (Pietranera *et al.,* 2006).

Estes resultados corroboram outros estudos que sugerem um aumento da astrocitose associada ao envelhecimento do cão (Shimada *et al.,* 1992[2];Borras *et al.,*

1999; Pugliese *et al.,* 2007), à semelhança do verificado nos humanos idosos e com doença de Alzheimer (Dickson *et al.,* 1988; Beach *et al.,* 1989; Hansen *et al.,* 1987).

As alterações vasculares cerebrais são um frequente achado associado ao envelhecimento do cão (Borras *et al.,* 1999), nomeadamente a hialinização da túnica média das arteríolas, as microhemorragias e amiloidose atingindo os vasos leptomeníngeos e as arteríolas de médio calibre e capilares do córtex (Yoshino *et al.,* 1996). De acordo com estudos patológicos, a incidência de alterações vasculares nos cães é baixa (Detweiler, 1989; Braund, 2003). No entanto, alguns autores alegam que as lesões vasculares podem ter uma frequência mais elevada do que a referida e que a disponibilidade de meios de diagnóstico por imagem tem permitido um maior conhecimento acerca deste tipo de condições (Braund, 2003).

O estudo histopatológico efectuado permite concluir que, as alterações vasculares cerebrais são bastante frequentes, uma vez que um grande número de cães apresentava imagens de microhemorragias do córtex (n=43), hialinização vascular (n=62), angiopatia vascular amilóide (n=41); enfartes (n=7) e atrofia perivascular (n=9).

As células do sistema nervoso demonstram uma vulnerabilidade selectiva aos efeitos da hipoxia e isquemia (Summers *et al.,* 1995). A isquemia cerebral indica um insuficiente aporte vascular ao cérebro para manter as normais funções celulares. A isquemia cerebral pode ser consequência de uma oclusão e estreitamento dos vasos, ou devido a uma hipoperfusão do cérebro associada a aterosclerose ou embolismo. Pode ainda ser resultado de uma hipoperfusão sistémica (Summers *et al.,* 1995;Kalimo *et al.,* 2002). No homem, estão também descritas outras causas de isquemia cerebral, tais como alterações de coagulação, doenças imunitárias e vasculite, (Braund, 2003) mas são condições raramente descritas nos cães (Fox *et al.,* 2000). A possibilidade de demência após um enfarte cerebral é influenciada pela quantidade de tecido destruído e pela localização do enfarte (Kalimo *et al.,* 2002).

Baseada na publicação de casos e em estudos de necrópsia, a incidência de enfartes cerebrais no cão é relativamente baixa. A maioria dos enfartes descritos nos canídeos é hemorrágica (Braund, 2003), associados a trombose venosa (Summers *et al.,* 1995). No enfarte hemorrágico observam-se petéquias ou a confluência de várias hemorragias, especialmente na substância cinzenta necrótica. Os enfartes lacunares são pequenos enfartes em áreas mais internas do cérebro, núcleos da base, tálamo, substância branca e tronco cerebral, caracterizados por pequenas cavidades resultantes do enfarte. Este tipo de enfarte é provocado pela obstrução de uma pequena artéria e são particularmente comuns em casos de diabetes e hipertensão, os quais estão por norma associados a severa aterosclerose de pequenos vasos (Kalimo *et al.,* 2002).

Ao contrário do verificado no homem, os enfartes cerebrais do cão raramente estão associados a aterosclerose (Braund, 2003). Podem aparecer secundariamente a êmbolos de células neoplásicas (Kent *et al.,* 2001; McDonough *et al.,* 2002) e estão também descritos enfartes secundários à migração de parasitas ou êmbolos parasitários, sendo os mais frequentes a *Dirofilaria immitis (*Braund, 2003).

No nosso estudo foram observadas imagens de enfartes em 7 cães idosos (10%), quatro deles com características de enfartes hemorrágicos e três lacunares. Êmbolos bacterianos terão sido a provável causa de enfarte em dois destes casos, uma vez que estes animais apresentavam imagens de encefalite e coroidite. Nos restantes animais, outros factores etiológicos estariam implicados.

De acordo com os dados do "National Institute of Neurological and Stroke" a categoria de enfarte mais frequente no homem é o enfarte lacunar, a maioria dos quais assintomáticos, ou com sinais neurológicos focais (Kalimo *et al*., 2002). Na origem sugerida para a formação destas pequenas lacunas está a oclusão de pequenas artérias devido a uma alteração denominada lipohialinose, cuja principal causa é a hipertensão. Vários estudos no homem demonstraram que 24-75% dos casos de enfartes lacunares estão associados à hipertensão (Kalimo *et al.,* 2002). A lipohialinose é o termo usado para denominar uma alteração degenerativa da parede arterial, caracterizada pelo aumento de espessura e eosinofilia da parede. A eosinofilia homogénea dos vasos leptomeníngeos e do córtex, verificada nos cortes corados por H&E, pode ser o resultado de uma alteração fibrinóide (necrose) ou de uma fibrose colagenosa (hialinização). O material fibrinóide da parede dos vasos aparentemente é composto por proteínas plasmáticas, com abundante quantidade de fibrina, formadas pela destruição da barreira hemato-encefálica e por células musculares lisas. Com o tempo, o material fibrinóide é substituído por fibrose, ou seja colagénio produzido pelos fibroblastos e, quando os fibroblastos desaparecem a fibrose é denominada por hialinização (Kalimo *et al.,* 2002).

A hialinização de vasos leptomeníngeos e do córtex foi observada em 62 animais (88,6%) do nosso estudo e apresentou uma associação muito significativa com o envelhecimento ($p<0,001$). Este facto reflecte a extensão da alteração vascular associada à idade ou a determinadas patologias, também elas mais frequentes nos animais mais velhos, capazes de provocar estas alterações na integridade da parede vascular. A amiloidose cerebrovascular poderá ser uma das causas para esta hialinização e para o espessamento da parede dos vasos, uma vez que 51,6% dos animais com hialinização vascular também demonstravam angiopatia vascular amilóide ($p=0,006$).

A atrofia perivascular, caracterizada por vacuolização e perda celular à volta de vasos espessados e hialinizados, causada provavelmente por hipertensão ou anoxia foi observada em 9 animais (12,9%).

Nos canídeos, as hemorragias intracerebrais espontâneas tendem a ser isoladas, localizadas geralmente na área do hipocampo e amígdala (Summers *et al.,* 1995; Braund, 2003). Podem ser de origem traumática ou não traumática. As de origem não traumática podem ter como causa a hipertensão e a angiopatia amilóide cerebral. Em contraste com a elevada incidência verificada no homem, a hemorragia intracerebral resultante de rotura espontânea de vasos ou aneurismas saculares é pouco frequente nos animais (Summers *et al.,* 1995; Braund, 2003). Nos humanos, este tipo de hemorragia está geralmente associada à hipertensão e a alterações degenerativas das artérias intracerebrais (Kalimo *et al.,* 2002). Nos canídeos, tem sido sugerida uma associação entre as hemorragias cerebrais e a angiopatia amilóide cerebral, nomeadamente nos cães mais idosos, após os 9 ou 11 anos (Uchida *et al.,* 1990;Uchida *et al.,* 1991, Borras *et al.,* 1999). Nestas situações são observados micro aneurismas cerebrovasculares e halos hemorrágicos de vários tamanhos, com maior frequência nas camadas superiores do córtex cerebral. O córtex cerebeloso, a substância branca e a substância cinzenta do tronco cerebral raramente estão envolvidos (Uchida *et al.,* 1990). A maioria destas hemorragias são clinicamente inaparentes, raramente possuem extensão suficiente para causar sinais de doença neurológica, (Summers *et al.,* 1995) no entanto estão descritas alterações de comportamento, défices motores e convulsões (Tidwell *et al.,* 1997). Neste estudo não foi encontrada associação entre as hemorragias espontâneas e a presença de angiopatia amilóide cerebral (p=0,50) o que está de acordo com o verificado por outros autores (Borras *et al.,* 1999; Ishihara *et al.,* 1991). Na origem destas hemorragias poderão estar outras causas, tais como a hipertensão (Littman *et al.,* 1988).

A mineralização da parede dos vasos cerebrais é encontrada esporadicamente em cavalos (Yanai *et al.,* 1996), bovinos idosos e em gatos com aterosclerose sistémica (Mandara, 2003). Contudo, no cão não estão descritas calcificações nos vasos sanguíneos (Borras *et al.,* 1999; Ramonet *et al.,* 2002), o que também não se verificou no estudo da nossa amostra. Em nenhum caso se observou mineralização da parede dos vasos.

Os dados obtidos reflectem a importância de controlar as causas das alterações vasculares, com particular ênfase para a hipertensão arterial uma vez que esta aparece como um dos principais factores predisponentes para acidentes vasculares cerebrais.

A definição clara de pressão arterial normal do cão tem sido objecto de vários estudos e ajustamentos. Os valores normais da pressão arterial em cães assemelham-se bastante com os valores humanos, mas podem variar de acordo com o tamanho do animal, (Andrade & Apel, 2004; Montoya *et al.,* 2006) a idade, sexo e raça (Bodey & Michell, 1996). Geralmente é considerada patológica uma pressão arterial superior a 150/95 mm Hg (Acierdo & Labato, 2005; Andrade & Apel, 2004). No cão, as condições

frequentemente associadas com a hipertensão arterial incluem a doença renal, (Bodey & Michell, 1996;Syme *et al.,* 2002;Bartges *et al.,* 1996) o hiperadrenocorticismo, (Bodey & Michell, 1996; Acierdo & Labato, 2005) a diabetes *mellitus*, (Bodey & Michell, 1996; Litman, 1994; Stuble *et al.,* 1998), a obesidade, (Montoya *et al.,* 2006) a anemia crónica e a administração de certas substância incluindo a eritropoietina (Cowgill *et al*., 1998) e os glucocorticóides (Acierdo & Labato, 2005). É importante que nos animais diagnosticados com estas patologias se faça um controlo da pressão arterial e se implemente um protocolo de tratamento adequado. O elevado número de canídeos detectados no nosso estudo com alterações vasculares cerebrais, sugere que o controlo da hipertensão sistémica é um parâmetro a ter cada vez mais em atenção no exame clínico de rotina, em particular no exame dos cães geriátricos.

A acumulação de lipopigmentos nos neurónios, glia e outras células é uma característica associada ao envelhecimento cerebral (Wisniewski *et al.,* 1987; Borras *et al.,* 1999; Palmer *et al.,* 2002;Kreutzberg *et al.,* 2002). A lipofuscina é um lipopigmento resultante da peroxidação de proteínas e lípidos insaturados (Summers *et al.,* 1995; Esiri *et al.,* 2002), constituída por grânulos electro-densos autofluorescentes e componentes lipídicos electro-lucentes (Wisniewski *et al.,* 1987), com efeitos metabólicos pouco conhecidos (Summers *et al.,* 1995; Esiri *et al.,* 2002). A principal fonte de lipofuscina advém da incompleta degradação lisossomal das mitocôndrias alteradas (Brunk & Terman, 2002; Gray & Woulfe, 2005).

A acumulação de lipofuscina representa um dos principais indícios de vulnerabilidade, stress e envelhecimento cerebral (Riga *et al.,* 2006). É utilizada como indicador das alterações produzidas pelos radicais livres em vários tecidos, (Wilhelm & Herget, 1999) nomeadamente no cérebro (Skoumalova *et al.,* 2003), que se formam devido ao stress oxidativo (Wilhelm & Herget, 1999).

O stress oxidativo tem um papel muito importante no desenvolvimento da demência tipo Alzheimer e o mesmo está descrito nos cães (Borras *et al.,* 1999; Smith *et al*., 2000; Head *et al.,* 2002[2]; Rofina *et al.,* 2004;Rofina *et al.,* 2006;Rofina *et al.,* 2007). Este facto é sustentado pela significativa correlação encontrada entre os produtos de degradação, como a lipofuscina, o envelhecimento e os défices cognitivos (Rofina *et al.,* 2006).

Morfologicamente a lipofuscina é uma substância com propriedades idênticas à encontrada numa patologia de armazenamento denominada de Ceroidolipofuscinose (Summers *et al.,* 1995). Esta patologia está descrita em gatos, bovinos, ovinos, humanos e em algumas raças de cães (Green & Little, 1974; Jolly *et al.,* 1980; Jolly *et al.,* 1990; Jolly *et al.,* 1992; Summers *et al.,* 1995 ; Minatel *et al.,* 2000 ; Rossmeisl, *et al.,* 2003). Trata-se de uma patologia lisossomal em que o armazenamento de lipofuscina é a base

patológica dos distúrbios funcionais observados, nomeadamente alterações de visão, de comportamento e epilepsia. Na Ceroidolipofuscinose, os grânulos de pigmento são também autofluorescentes e ricos em enzimas lisossomais, à semelhança dos lipopigmentos observados no envelhecimento, contudo apresentam um aspecto ultraestrutural lamelar (Wisniewski *et al.,* 1987). No estudo de microscopia electrónica realizado a fragmentos de lobo frontal e temporal de cinco cães, foi encontrado lipopigmento intraneuronal com aspecto de corpos curvilíneos num Caniche com 13 anos, semelhante ao que se verifica na Ceroidolipofuscinose, mas não sabemos se este animal apresentava sinais neurológicos.

O armazenamento de lipofuscina é um achado frequente no cérebro de animais velhos de várias espécies (Summers *et al.,* 1995;Borras *et al*., 1999; Esiri *et al.,* 2002), embora também possa ser encontrada em animais com apenas 1 ano de idade, generalizando-se no cérebro por volta dos 4 anos (Summers *et al.,* 1995). Todos os animais com 5 ou mais anos, num total de 60 cães (86%), apresentavam acumulação de lipofuscina, 54 dos quais com idade superior a 8 anos, verificando-se uma associação significativa com o envelhecimento ($p<0.001$). Nos cães jovens, os depósitos de lipofuscina eram visíveis nos neurónios de maiores dimensões do córtex frontal, nas denominadas células de Betz e nos núcleos hipoglosso e oculomotor, à semelhança do descrito por outros estudos (Borras *et al.,* 1999). Nos animais mais idosos a lipofuscina aparecia amplamente distribuída por todo o cérebro, apesar de apresentar diferentes graus de acumulação. Os cortes semi-finos e ultra-finos realizados demonstraram acumulação de lipofuscina intra e extraneuronal muito abundante.

A normal remoção de lipofuscina celular é, provavelmente, realizada através das células da glia adjacentes, uma vez que a quantidade de lipofuscina é inversamente proporcional à quantidade de células vizinhas. A quantidade de pigmento nas células gliais, nos pericitos e no endotélio capilar é maior nos macacos jovens do que nos adultos, sugerindo que a acumulação intraneuronal de lipofuscina aumenta com a idade devido a uma falência na eficiência de remoção da mesma das células (Terman, 2001; Brunk & Terman, 2002; Esiri *et al.,* 2002).

O efeito da sua acumulação no metabolismo celular não é muito claro, no entanto há evidências de que a sua acumulação nas células dos cornos anteriores da medula espinal é acompanhada por uma redução, bastante significativa do RNA citoplasmático, sugerindo que isto conduz, eventualmente, a atrofia e morte celular. Pelo contrário, não há perda neuronal nas células do núcleo olivar inferior e este é o grupo de neurónios com mais lipofuscina do SNC (Kreutzberg *et al.,* 2002). De acordo com os estudos realizados, a lipofuscina pode diminuir a actividade de determinadas funções celulares, incluindo o sistema ubiquitina-proteasoma (Gray & Woulfe 2005; Riga *et al.,* 2006).

A neuromelanina concentra-se normalmente com a idade na substância negra dos humanos, ratos, cães e primatas (DeMattei *et al.,* 1986). No homem, a neuromelanina está presente nos neurónios do *lócus coeruleus* na altura do nascimento e na substância negra após os 18 anos, aumentando gradualmente nestes dois locais até cerca dos 60 anos, altura em que a quantidade de pigmento começa a diminuir (Kreutzberg *et al.,* 2002).

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa cuja principal característica é a perda de neurónios pigmentados (dopaminérgicos) da substância negra e a presença de inclusões eosinifílicas intra-citoplasmáticas denominadas de corpúsculos de Lewy (Dauer & Przedborski, 2003), compostas por uma multiplicidade de proteínas tais como a α-sinucleína, a parkina, a ubiquitina e neurofilamentos (Togo *et al.,* 2001). A degenerescência de neurónios dopaminérgicos da via nigroestrial, composta pelos neurónios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na parte compacta da substância negra e que projectam os seus axónios para o estriado (Przedborski, 2005), conduz à redução dos níveis de metabólitos de dopamina no estriado e noutros núcleos da base (Gerlach & Riederer, 1996). Os núcleos da base formam um grupo de núcleos subcorticais que controlam os movimentos voluntários: o estriado (caudado e putamen), globo pálido (interno e externo), o núcleo subtalâmico e a substância negra (pars compacta e reticulada) (Burch & Sheerin, 2005). A deficiência em dopamina, mais pronunciada no putamen, é característica de todas as formas de manifestação da doença de Parkinson e não aparece em nenhuma outra doença neurodegenerativa (Reynolds & Garret, 1986). Correlações entre análises clínicas e bioquímicas, mostram que os sintomas característicos da doença de Parkinson, o tremor em repouso, a bradicinésia, a rigidez e instabilidade postural começam a aparecer quando é perdida aproximadamente 80% e 60% do conteúdo de dopamina no putamen e na substância negra, respectivamente (Dauer & Przedborski, 2003).

A presença de pigmento melânico intra-neuronal, neuromelanina, foi observada nos 17 cães (24,3%) em que o corte incluía a substância negra ao nível do mesencéfalo. Este pigmento foi detectado nos neurónios ventrais da substância negra, junto ao feixe corticoespinal. Não foram observados grânulos de pigmento extra-neuronal, o que aconteceria no caso de morte neuronal com libertação da neuromelanina e fagocitose. Também não foram encontradas inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas compatíveis com corpúsculos de Lewy.

A doença de Parkinson não se manifesta espontaneamente nos animais (Nakayama *et al.,* 2004), apenas está descrita a indução experimental através da administração de agentes neurotóxicos que provocam uma severa perda de neurónios a

nível da substância negra com diminuição da secreção de dopamina (Gerlagh & Riederer, 1996; Hineno *et al.,* 1992).

O facto de termos identificado neuromelanina nos neurónios da substância negra de cães idosos, sugere que as células neuronais sintetizadoras de dopamina são preservadas durante o processo de envelhecimento, ou serão mais resistentes do que as do córtex cerebral e hipocampo. Estas últimas são mais sensíveis à hipoxia e stress oxidativo, que induz morte neuronal (Mattson *et al.,* 2001[2]). De facto, o aumento de incidência de neurónios apoptóticos na região do tálamo e hipocampo e não ao nível da substância negra, foram observados anteriormente (Kiatipattanasakul *et al.,* 1996). Estes achados levam-nos a supor, à semelhança do verificado num outro estudo, que nos canídeos os neurónios sintetizadores de dopamina da substância negra são preservados durante o processo de envelhecimento (Uchida *et al.,* 2003), ou então os cães não vivem tempo suficiente para que se desenvolva a acumulação de α-sinucleína e os sinais característicos de doença de Parkinson (Nakayama *et al.*, 2004).

No envelhecimento, é frequente encontrar no sistema nervoso inclusões e depósitos extracelulares como os Corpos de Poliglucosan. Corpo de Poliglucosan (CPG) é o termo genérico usado para denominar os "corpora amilácea", os corpos de Lafora e outras estruturas similares constituídas por polímeros de glucose (Yokota *et al.,* 1987;Kamiya *et al.,* 1990; Sugiyama *et al.,* 1993; Kreutzberg *et al.,* 2002).

Os CPG's estão descritos em várias espécies de animais, nomeadamente no cão (Suzuki *et al.,* 1978;Yamanami *et al.,* 1992), nas vacas (Yanai *et al.,* 1994), no gato (Kamiya *et al.,* 1989), na raposa (Kamiya *et al.,* 1991) e nos babuínos (Suzuki *et al.,* 1980). Nos canídeos, os corpos de poliglucosan são encontrados em localização intra ou extra-neuronal, associados ao processo de envelhecimento, verificando-se uma semelhança de características morfológicas e histoquímicas com os dos humanos (Suzuki *et al.,* 1978;Kamiya *et al*., 1989; Kamiya *et al.,* 1990). Também podem aparecer nos nervos periféricos (Sugiyama *et al.,* 1993), incluindo os prolongamentos intramusculares (Bernsen *et al*., 1989).

Os "corpora amilácea" são corpos de poliglucosan constituídos por polímeros de glucose, uma pequena quantidade de proteínas (Nishio *et al.,* 2001; Cissé *et al.,* 1993) e elementos metálicos como o cálcio, ferro e cobre (Singhrao *et al.,* 1993). São corpos esféricos, lamelados que contêm um material amorfo basófilo, por vezes com um core central de coloração mais intensa. Estas estruturas coram positivamente com o iodo, o metil violeta e o PAS (Kreutzberg *et al.,* 2002).

Identificámos "corpora amilácea" em 21 cães (30%), todos com idade superior a 10 anos, facto que permitiu estabelecer uma associação significativa com o

envelhecimento (p=0.002). A localização mais frequente foi a camada molecular do cerebelo.

A natureza e o modo de formação dos "corpora amilácea" têm sido largamente estudados, mais concretamente os seus componentes, através de técnicas histológicas, histoquímicas e biológicas. Uma análise bioquímica directa da sequência de aminoácidos demonstrou que a ubiquitina, pequena proteína com 8.5kDa é um dos componentes polipéptidicos dos "corpora amilácea" (Cissé *et al.,* 1993; Singhrao *et al.,* 1995), e que as proteínas associadas ao choque térmico também são encontradas neste tipo de inclusões, o que sugere que a sua biogénese pode estar relacionada com o stress fisiológico (Cissé *et al.,* 1993). Uma das suas funções poderá ser impedir que estes constituintes proteicos imunogénicos sejam reconhecidos pelos linfócitos e microglia, evitando assim patologia do SNC (Singhrao *et al.,* 1995). Estes dados sugerem que os corpora amiláceos poderão ser um indicador de neurodegenerescência.

Estudos em modelos experimentais apontam também para uma relação entre o desenvolvimento de CPG's e a deposição de proteína β-amilóide nos humanos (Sugiyama *et al.,* 1993; Nishio *et al.,* 2001). De facto verificámos que 18 dos 21 canídeos com "corpora amilácea" apresentavam deposição de proteína β-amilóide, 14 dos quais sob a forma de placas no córtex frontal, o que vai de encontro ao anteriormente referido.

Os corpos de Lafora, outro tipo de corpos de poliglucosan, constituídos por complexos polímeros de glicoproteínas, presentes no corpo celular ou em prolongamentos neuronais do SNC, medula espinal e gânglios da retina (Sugiyama *et al.,* 1993), não foram identificados pela coloração de H&E nos animais do nosso estudo. No entanto, está descrita a sua presença no cão, como um achado acidental, associado ao envelhecimento e na doença de Lafora, (Suzuki *et al.,* 1978, 1979;Summers *et al.,* 1995) embora também possam ser encontrados em animais jovens (Sugiyama *et al.,* 1993). Não foi possível identificar este tipo de inclusão intraneuronal, nem mesmo nos animais mais idosos, talvez por não se terem realizado colorações específicas, nomeadamente PAS, que auxiliariam na identificação deste tipo de inclusões.

A presença de esferóides será também uma manifestação do envelhecimento cerebral (Summers *et al.,* 1995; Borras *et al*., 1999;Uchida *et al.,* 2003). Os esferóides são dilatações de axónios com organelos que normalmente estão em trânsito para a terminação axonal ou de regresso ao soma do neurónio. São constituídos por uma grande variedade de organelos, por neurofilamentos e microtúbulos mal orientados, presumivelmente em transporte anterógrado (Summers *et al.,* 1995). Outros, contêm abundantes quantidades de retículo endoplasmático liso e outros ainda contêm corpos tubulovesiculares. Um outro tipo de esferóides apresenta corpos amorfos densos, mitocôndrias e organelos degeneradas, que provavelmente regressam ao corpo celular

após reciclagem (Summers *et al.,* 1995). A presença de elementos do citoesqueleto axonal na estrutura dos esferóides é constatada através de colorações argênticas e o componente neurofilamentoso confirmado pela imunorreactividade positiva a anticorpos anti-neurofilamentos (Slayter *et al.,* 1998).

Os esferóides apresentam forma circular a fusiforme, de coloração eosinofílica e aparência granular ou vesicular (Summers *et al.,* 1995). Uma pequena quantidade de esferóides é encontrada em qualquer idade e em todos os níveis do neuroeixo, mas são mais comuns nos animais velhos e mais na substância branca do que na cinzenta (Suzuki *et al*., 1979;Summers *et al.,* 1995;Borras *et al*., 1999). Os esferóides são também observados em áreas periféricas de lesões cerebrais ou medulares (Summers *et al.,* 1995). Representam uma resposta inespecífica a uma grande diversidade de lesões, incluindo o trauma, a hipoxia, intoxicações, défices nutricionais e patologias de armazenamento (Summers *et al.,* 1995). Na nossa amostra, os esferóides foram observados, na maioria dos casos, ao nível da substância branca em cerca de 21% dos animais, todos eles com idade superior a 9 anos, contudo não foi possível estabelecer associação significativa com o envelhecimento (p=0,054). Estes depósitos podem impedir o transporte axonal resultando em alterações degenerativas das neurites e axónios (Uchida *et al.,* 2003).

Os tumores cerebrais são mais frequentes nos cães adultos e idosos, embora estejam descritos em animais com menos de 1 ano de idade (Keller & Madewell, 1992). As neoplasias do SNC do cão ocorrem com uma frequência e variabilidade semelhante à verificada no homem, (Long, 2006) e figuram em cerca de 1 a 3% das necrópsias efectuadas (Summers *et al.,* 1995). A prevalência dos vários tipos de tumores difere entre espécies e raças. Existe uma incidência relativamente elevada de meningiomas em gatos, uma incidência elevada de tumores das bainhas nervosas em bovinos, enquanto os gliomas são mais prevalentes nos cães. Nestes últimos, o espectro de tumores verificado é também o mais semelhante ao homem (Koestner *et al.,* 1999).

No nosso estudo foram observadas quatro neoplasias intracranianas, o que representa uma percentagem de 5,7%. Dos quatro tumores encontrados, três verificaram-se em animais com idades compreendidas entre os 12 e 14 anos e o outro num Boxer com 7 anos. Três tumores apareceram em cães de raça braquicefálica, dois Boxer e um Pequinês.

Um dos tumores encontrados era um meningioma transicional, num caniche macho com 13 anos de idade. Os meningiomas são tumores extra-axiais com origem nas células aracnoideias. São um dos tumores intracranianos mais comuns no cão, reportando uma incidência que varia entre os 30 a 45% (Snyder *et al.,* 2006; Long, 2006).

Geralmente surgem em cães adultos a idosos com mais de 7 anos (Summers *et al*., 1995), o que está de acordo com o observado no nosso estudo.

Foram também encontrados dois adenomas da hipófise. Os tumores da hipófise são comuns no cão e aproximadamente 50% dos casos de adenomas verificam-se em raças braquicefálicas (Long, 2006). De facto os dois adenomas da hipófise encontrados por nós registaram-se em canídeos de raça Boxer. Os dois tumores eram funcionais, uma vez que as células expressavam positividade anti-ACTH e anti-GH, indicativo de secreção de hormona adrenocorticotrófica e hormona do crescimento, respectivamente. Apesar disso, nenhum dos animais apresentava história clínica de doença de Cushing ou acromegália.

Os tumores secundários do SNC são menos frequentes do que os primários, numa proporção aproximada de 3:1 (Koestner *et al.,* 1999). Uma fêmea de raça Pequinês apresentava ninhos de células epiteliais neoplásicas no córtex frontal e camada molecular do cerebelo, compatíveis com metastização de um carcinoma mamário, sendo neste caso o cérebro um dos primeiros locais de metastização já que o exame histopatológico não revelou a presença de micro metástases em nenhum outro órgão, nomeadamente o pulmão.

As alterações de desenvolvimento cortical, também denominadas de defeitos de migração neuronal, são resultantes de alterações no processo de formação do córtex cerebral (Kuzniecky & Barkovich, 2001; Silva & Cavalheiro, 2004). Os defeitos de migração neuronal incluem a lissencefalia, a polimicrogiria, as heterotopias neuronais e a agenesia do corpo caloso (Honavar & Meldrum, 2002). A presença de células não diferenciadas no córtex cerebral foi observada em 10 animais (14%), ao nível dos núcleos da base, em zonas periventriculares ou na substância branca. Quando encontradas nesta última localização, são consideradas focos de microdisgenesia, por vezes relacionados com eventual aparecimento de focos epilépticos (Honavar & Meldrum, 2002). As células da placa germinativa não diferenciadas apresentavam um núcleo redondo a fusiforme, intensamente basófilo, formando agregados.

Estes defeitos decorrem da impossibilidade dos neuroblastos da zona periventricular, matriz germinal que forma as paredes dos ventrículos laterais, chegarem ao seu destino, o córtex cerebral, devido a condições hostis que podem ocorrer entre o 1º e 7º meses de gestação, o que resulta em deformações estruturais focais ou generalizadas dos hemisférios cerebrais. São alterações de migração dos neuroblastos que migram mas não se diferenciam. Do ponto de vista histológico, as lesões são caracterizadas por perda da laminação cortical, alteração do posicionamento ou da orientação celular (Silva & Cavalheiro, 2004). Os neurónios imaturos aparecem agrupados em nódulos, bandas ou grossas camadas de células em localização

heterotópica, interferindo difusamente com o padrão normal do córtex (Honavar & Meldrum, 2002). Uma característica marcante dos defeitos de migração neuronal é a sua capacidade de gerar descargas epilépticas (Honavar & Meldrum, 2002), no entanto nenhum dos cães apresentava história clínica de epilepsia.

São várias as doenças degenerativas do sistema nervoso que se caracterizam pela deposição de agregados proteicos insolúveis e corpos de inclusão nas células nervosas (Manetto *et al.,* 1988; Hung *et al.,* 2006). A maioria destas inclusões é constituída por filamentos anormais e partilham vários epítopos com as proteínas do citoesqueleto. Uma dessas inclusões é a ubiquitina, uma proteína reguladora com papel importante na degradação de proteínas anormais (Manetto *et al*., 1988).

A ubiquitina é uma proteína globular constituída por 76 aminoácidos com cerca de 8.5kDA de peso molecular (Pirim, 1998). Grânulos imunorreactivos à ubiquitina aparecem no decorrer do normal envelhecimento humano e em determinadas patologias neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, Alzheimer, demência fronto-temporal e doenças do neurónio motor (Manetto *et al*., 1988;Hung *et al*., 2006; Leigh *et al*., 1988).

A sua função fisiológica é múltipla: reparação do ADN, controlo do ciclo celular e resposta ao stress (Borras *et al.,* 1999). Tem também um importante papel na sinalização de proteínas para a degradação proteolítica não-lisossomal através do sistema de proteólise ATP-dependente (Schlesinger *et al.,* 1975;Hershko *et al*., 2000).

Todas as proteínas intracelulares sofrem uma contínua síntese e degradação (Mortimore *et al.,* 1989). Este ciclo constante, além de outras funções, reduz ao mínimo o tempo que uma determinada proteína é exposta às alterações do meio ambiente celular e, consequentemente, diminui a probabilidade de ser alterada ou danificada (Goldberg, 2003). A proporção na qual as diferentes proteínas são sintetizadas e degradadas dentro da célula é diferente e pode ser alterada em resposta a diferentes estímulos ou sob determinadas situações (Goldberg, 2003;Cuervo, 2004[2]). Se a lesão é muito extensa, ou se não existem condições favoráveis à reparação, as proteínas são sinalizadas para a degradação (Cuervo, 2004[1];Klionsky, 2005).

Os mais importantes sistemas proteolíticos responsáveis pela reciclagem das proteínas intracelulares são o sistema lisossomal e o sistema ubiquitina-proteosoma (Goldberg, 2003;Cuervo,2004[2]). O proteosoma é uma estrutura proteolítica compartimentada, ATP-dependente composta por 30 subunidades que reconhece e degrada os substratos poliubiquitinados (Schmidt *et al*., 2005). O sistema ubiquitina - proteosoma (SUP) contribui para a manutenção da homeostasia celular e controlo da qualidade proteica mas, é o seu papel de regulador de processos intracelulares essenciais tais como a progressão do ciclo celular, divisão celular, transcrição e

sinalização que tornam o funcionamento do SUP uma condição essencial à sobrevivência celular (Goldberg, 2003;Wolf & Hilt, 2004).

Com o envelhecimento, a eficiência do sistema ubiquitina-proteosoma diminui, sugerindo que a presença de proteínas ubiquitinadas e componentes SUP nas inclusões reflecte a falência do sistema em remover os agregados proteicos (Hung *et al.,* 2006). Pensa-se que os agregados proteicos ubiquitinados são o resultado do mau funcionamento e sobrecarga do sistema proteosoma-ubiquitina, ou então resultam de alterações estruturais dos substratos proteicos que impedem o reconhecimento e degradação através do sistema ubiquitina-proteosoma (Upadhya & Hegde, 2005).

As inclusões intracelulares formam-se quando a capacidade dos proteosomas celulares, o mais importante mecanismo proteolítico da célula, fica saturado (Johnston *et al.,* 1998). Se este tipo de inclusões é o resultado de um mecanismo de protecção celular, ou se a sua presença causa toxicidade e morte celular, permanece por esclarecer (Johnston *et al.,* 1998; Hung *et al.,* 2006).

Pequenos grânulos ubiquitina positivos, podem ser observados em cães de qualquer idade disseminados pela substância branca, mas este tipo de estruturas aumenta dramaticamente nos mais velhos. Aparecem na forma de grânulos livres ao longo dos axónios, ou em forma de glóbulos no citoplasma das células gliais, nomeadamente nos oligodendrócitos, macrófagos na substância branca dos hemisférios cerebrais, corpo caloso e substância branca do cerebelo (Ferrer *et al.,* 1993). Observámos depósitos de ubiquitina dispersos na substância branca em 88,1% dos cães com mais de 8 anos, com um claro aumento de intensidade associado ao envelhecimento ($p>0,001$) semelhante ao observado em outros estudos (Ferrer *et al.,* 1993; Borras *et al.,* 1999). A presença de inclusões intraneuronais positivas à ubiquitina foram raras, não havendo pois resultados suficientes para as relacionar com o processo de envelhecimento.

A presença de estruturas ubiquitinadas sugere a existência de alterações degenerativas na substância branca destes canídeos. Uma vez que a ubiquitina se conjuga com diferentes substratos proteicos que, frequentemente são sinalizados para o sistema proteolítico ATP-dependente, é possível que as estruturas imunorreactivas para a ubiquitina sejam constituídas por proteínas não degradadas que se acumulam na substância branca dos animais idosos (Ferrer *et al.,* 1993). Uma desordem primária na mielina capaz de induzir um aumento dos níveis de proteínas anormais, ou uma diminuição na actividade proteolítica são duas proposições que podem explicar a presença destes corpos ubiquitinados (Ferrer *et al.,* 1993). Se estas anomalias da substância branca desencadeiam défices neurológicos não se sabe, mas os estudos indicam que se trata da principal alteração neuropatológica verificada em animais com

desorientação espacial, e comportamentos anormais com incontinência urinária (Ferrer *et al.,* 1993).

A investigação na área da neuropatologia do envelhecimento tem sido largamente dedicada ao estudo dos eventos moleculares que envolvem a acumulação de proteína β-amilóide (Aβ) e a formação de placas senis (Dimakopoulus & Mayer, 2002).

Ao contrário da maioria dos animais de laboratório e outras espécies, o cão desenvolve de forma espontânea a acumulação de proteína β-amilóide (Selkoe *et al.,* 1987; Johnstone *et al.,* 1991;Head *et al.,* 2002; Studzinski *et al.,* 2005), perpetuando a ideia de que este animal será um bom modelo do processo de envelhecimento cerebral do homem (Head *et al.,* 1998).

A angiopatia amilóide cerebral e a deposição de proteína amilóide sob a forma de placas senis são alterações patológicas associadas ao envelhecimento do cão, iniciando-se cerca dos 8 anos e aumentando de forma linear com a idade (Czasch & Baumgärtner, 2006). A deposição de Aβ foi também observada em outras espécies, nomeadamente em primatas não-humanos (Selkoe *et al.,* 1987;Bons *et al.,* 1991;Uno *et al.,* 1996), ursos (Selkoe *et al.,* 1987; Cork *et al.,* 1988) e em gatos com mais de 18 anos (Nakaruma *et al.,* 1996; Cummings *et al.,* 1996[2]).

A proteína β-amilóide é o principal constituinte das placas senis e da angiopatia amilóide cerebral -AAC- (Okuda *et al.,* 1994). É um polipeptídeo formado pela clivagem proteolítica da proteína precursora amilóide -APP- (Blom *et al.,* 1992;Torp *et al.,* 2000[1];Head et al., 2002[1]), através da digestão por α, β e γ-secretases (Fukuoka *et al.,* 2004). A APP é uma proteína transmembranar, com cerca de 700 aminoácidos e várias isoformas, expressa no corpo celular dos neurónios, prolongamentos neuronais e placas senis (Fukuoka *et al.,* 2004).

Durante o normal processamento da APP**,** a produção de Aβ é impedida sendo que o péptido Aβ resulta, provavelmente, de mecanismos alternativos de clivagem. Vários factores podem aumentar o processamento alternativo da APP. Uma explicação é a de que as alterações configuracionais na APP, induzidas por mutações no gene, possam facultar a clivagem alternativa da APP e consequente produção de Aβ (Blom *et al.,* 1992). Este parece ser o caso de certas famílias com doença de Alzheimer. Outra hipótese para o aumento de produção de Aβ é a excessiva expressão de APP, como a verificada na trissomia 21, cujos portadores manifestam sinais neuropatológicos de Alzheimer após os 40 anos. O gene da APP humano está localizado no cromossoma 21, de modo que as pessoas com síndroma de Down expressam mais esta proteína. A excessiva expressão da APP também pode ser desencadeada após uma resposta aguda, por parte do cérebro, a uma lesão (Blom *et al.,* 1992).

A Aβ é uma proteína com tempo de semi-vida longa, de modo que sofre várias modificações pós-translacionais, incluindo a isomerização e a racemização. Bioquimicamente, a sequência de aminoácidos da Aβ canina é semelhante à dos humanos (Selkoe *et al.,* 1987; Johnstone *et al.,* 1991) e de várias outras espécies de mamíferos (Johnstone *et al.,* 1991) incluindo os primatas não-humanos, (Podlisny *et al.,* 1991) sendo então vulnerável às mesmas alterações pós-translacionais (Shapira *et al.,* 1988;Satou *et al.,* 1997; Fonseca *et al.,* 1999).

As placas senis e a angiopatia amilóide cerebral descritas no cérebro de cães e humanos são formadas essencialmente pela agregação de proteína β-amilóide (Uchida *et al.,* 1992), apesar de outros subconstituintes também entrarem na composição das placas senis (Uchida *et al.,* 1997). A proteína β-amilóide é também encontrada, em baixas concentrações, nos fluidos biológicos, a denominada Aβ solúvel com predominante arranjo em α-hélice (Wisniewski *et al.,* 1996).

A Aβ encontrada no cérebro do cão geralmente não apresenta conformação em folha-β, apesar de já terem sido descritas algumas placas vermelho do Congo e tioflavina S positivas, portanto com predomínio do pregueamento em folha-β (Cummings *et al.,* 1996[1]). O que induz estas diferenças configuracionais continua por esclarecer.

A deposição de Aβ na parede dos vasos cerebrais e leptomeníngeos -Angiopatia Amilóide Cerebral (AAC) é uma das características da doença de Alzheimer, do envelhecimento, da síndroma de Down e da hemorragia cerebral hereditária associada à amiloidose (Wegiel *et al.,* 1995; Esiri *et al.,* 2002). Apesar de descoberta no início do último século, só recentemente surgiu como uma importante entidade clínica e laboratorial (Walker *et al.,* 1997). Foram três os desenvolvimentos importantes que ajudaram a reacender o interesse pela amiloidose cerebrovascular: primeiro, está hoje bem evidente que a AAC aumenta o risco de hemorragias cerebrais e pode ser responsável por casos de hemorragias nos adultos idosos (Vinters *et al.,* 1996); segundo, foram associados polimorfismos específicos a várias formas de AAC (Greenberg *et al.,* 1996;Hendriks *et al.,* 1992); terceiro, o tipo mais comum de amilóide cerebrovascular tem origem na proteína β-amilóide**,** que também forma o core das placas senis na doença de Alzheimer (Joachim *et al.,* 1988). Os recentes progressos na descoberta dos mecanismos celulares e moleculares da amiloidogénese cerebral são uma esperança na tentativa de desenvolver terapêuticas eficazes para a angiopatia amilóide cerebral**.** O estabelecimento de modelos animais no estudo da AAC é essencial na aferição de novas estratégias de diagnóstico e tratamento destas patologias (Walker *et al.,* 1997).

A amiloidose dos órgãos periféricos é estudada em animais de experiência desde o início do século XX (Uchida *et al.,* 1991). Contudo, a amiloidose cerebral apenas foi descrita em espécies não-humanas após 1950, quando Braunmühl constatou a existência

de placas senis e angiopatia congofílica em cães idosos (Walker *et al.,* 1997), confirmado depois por outros investigadores (Selkoe *et al.,* 1987; Giaccone *et al.,* 1990; Uchida *et al*., 1990; Shimada *et al.,* 1991; Cummings *et al.,* 1993;Tekirian *et al.,* 1996; Wegiel *et al.,* 1995; Ishihara *et al.,* 1991).

A maioria dos estudos morfológicos demonstrou uma elevada frequência de amiloidose cerebral no cão (Selkoe *et al.,* 1987; Shimada *et al.,* 1991;Cummings *et al.,* 1993), chegando a atingir os 100% nos mais idosos (Wegiel *et al.,* 1995). De acordo com Uchida *et al.,* (1990), os primeiros sinais de angiopatia amilóide surgem cerca dos 8-9 anos e está presente em todos os animais com mais de 15 anos. Um outro estudo realizado por Wegiel e colaboradores (1995) em cerca de 30 cães Mogrel, com idades compreendidas entre os 6.5 e os 26.5 anos, encontrou angiopatia amilóide nos cães com mais de 13.5 anos de idade, mas a densidade variava consideravelmente entre os animais. No nosso estudo, foi reconhecida a presença de angiopatia amilóide nos vasos das leptomeninges e do córtex em 57% e 46% dos casos, respectivamente, sempre em cães com mais de 8 anos de idade, verificando-se uma associação muito significativa com o envelhecimento ($p < 0,001$). A deposição de amilóide vascular aparecia primeiro nos vasos das leptomeninges, atingindo depois os vasos de pequeno e médio calibre e capilares do córtex, o que corrobora o verificado em outros estudos (Giaccone *et al.,* 1990; Uchida *et al.,* 1991; Cummings *et al.,* 1993; Wegiel *et al.,* 1995). A marcada diferença individual verificada na intensidade de deposição de amilóide na parede dos vasos leptomeníngeos e do córtex sugere uma heterogeneidade da amostra. Outro factor capaz de aumentar as diferenças individuais pode ser o impacto ambiental na evolução da amiloidose vascular (Soltysiak, 1985). No entanto, também foram observadas diferenças individuais num estudo que envolveu uma população homogénea de Beagles (Cummings *et al.,* 1993), sugerindo que a evolução da angiopatia amilóide no cão é influenciada não só pela idade, raça e meio ambiente, mas também por outros factores não identificados (Wegiel *et al.,* 1995).

No homem, a angiopatia amilóide cerebral é encontrada com mais frequência nos vasos do neocortex e das leptomeninges, depois no hipocampo, cerebelo, núcleos da base e, raramente no diencéfalo, tronco encefálico e substância branca (Kalimo *et al.,* 2002). Nos canídeos do nosso estudo, a angiopatia cerebrovascular foi também mais frequente nos vasos do neocortex, verificando-se no hipocampo em apenas 34% dos casos e ao nível da substância branca em 18,7% das amostras com AAC.

Nos estádios avançados de amiloidose, a parede vascular é composta por células musculares, cluster's de detritos celulares rodeados por amilóide e anéis de amilóide ao redor de cavidades vazias após a completa desintegração dos miócitos (Wegiel *et al.,* 1995). Nas artérias, a atrofia das células musculares torna-se evidente (Yamaguchi *et al.,*

1992), acabando por degenerar e morrer (Wegiel *et al.,* 1995). Há evidências de perda de viabilidade das células endoteliais nas zonas de extensivos depósitos de proteína β-amilóide, o que pode causar rotura da barreira hematoencefálica. O endotélio danificado pode aumentar a vasoconstrição causando hipoperfusão cerebral crónica (Prior *et al.,* 1996). Alguns estudos sugerem, à semelhança do verificado nos humanos (Kalimo et al., 2002), uma possível associação entre a angiopatia amilóide cerebral e as hemorragias intracerebrais (Uchida *et al.,* 1991), no entanto tal relação não foi possível constatar no nosso estudo.

Uma investigação realizada em cães idosos demonstrou que a amilóide depositada nas veias das leptomeninges é constituída principalmente por $A\beta_{1-40}$ (Wisniewski *et al.,* 1996). Outros estudos constataram que a AAC verificada nas arteríolas e capilares leptomeníngeos possuía ambas as formas de amilóide**,** $A\beta_{1-40}$ e a $A\beta_{1-42}$ (Cummings *et al.,* 1996[2]; Tekirian *et al.,* 1996; Nakaruma *et al.,* 1997). Apesar dos depósitos difusos de Aβ no córtex dos cães conter mais $A\beta_{42}$ do que $A\beta_{40}$, a amilóide vascular é composta principalmente por $A\beta_{40}$ (Wisniewski *et al.,* 1996; Tekirian *et al.,* 1996). Existem evidências de que a proteína β-amilóide da angiopatia vascular do homem contém, comparativamente às placas, menos proporção do fragmento curto $A\beta_{1-40}$ e mais do fragmento longo $A\beta_{1-42}$, e que a amilóide vascular pode caracterizar uma fase inicial da formação de placas no cérebro com Alzheimer (Roher *et al.,* 1993; *Esiri et al.,* 2002).

A constante presença de Angiopatia Amilóide Cerebral na grande maioria dos cães com idade superior a 13 anos e a semelhança bioquímica entre a Aβ humana e canina, sustenta o interesse do cão no estudo deste tipo de patologia. Contudo, tal como o verificado por outros estudos (Walker *et al.,* 1997), a variabilidade natural da extensão de AAC nos animais de idade similar, é uma desvantagem que só pode ser ultrapassada com a análise de uma amostra maior.

Os cães geriátricos também desenvolvem, de forma natural, a formação de placas senis que são, sob o ponto de vista patológico, sequencialmente idênticas às observadas nos humanos (Selkoe *et al.,* 1987;Johnstone *et al.,* 1991). As placas senis são constituídas sobretudo por agregados extracelulares de presenilina1 (PS1), apolipoproteína E (apoE) e proteína β-amilóide (Aβ), sendo esta última a principal constituinte (Uchida *et al.,* 1997; Dimakopoulos & Mayer, 2002). Outros constituintes, para além destes, são encontrados nas placas senis do homem e dos cães, como a proteína precursora amilóide (APP), a ubiquitina e a α- antiquimiotripsina (Nishiyama *et al.,* 1996;Uchida *et al.,* 1997).

As placas senis são classificadas de acordo com a sua morfologia, conformação em α-hélice ou folha-β e associação a elementos reactivos tais como os astrócitos,

microglia ou neurites distróficas. No homem, as placas senis são divididas em quatro tipos: difusas, neuríticas, clássicas e compactas, de acordo com as suas características morfológicas e bioquímicas (Delaere *et al.,* 1991; Armstrong *et al*., 1998). As placas difusas são constituídas por depósitos de tamanho irregular de proteína amilóide não fibrilar com arranjo em α-hélice, visíveis com coloração argênticas, mas não com o vermelho do Congo. As placas neuríticas são basicamente constituídas por neurites distróficas, positivas à Aβ mas desprovidas de core amilóide. As placas clássicas possuem um distinto core central amilóide rodeado por um anel de neurites distróficas positivas à Aβ. As placas compactas compreendem um core amilóide mas falta o anel de neurites distróficas (Yoshino *et al.,* 1996). Dos quatro tipos de placas, as últimas três são constituídas por proteína amilóide fibrilar insolúvel, em conformação folha-β, geralmente denominadas placas maduras (Yoshino *et al.,* 1996; Miyawaki *et al.,* 2001). A evolução das placas parece pois progredir desde estruturas difusas com arranjo em α-hélice desprovidas de pregueamento em folha-β, seguida de placas neuríticas em folha-β desprovidas de core amilóide central com raras neurites distróficas e escassa reacção glial, até placas tioflavina e vermelho do Congo positivas, com core central amilóide, extensas neurites distróficas e reacção glial (Cummings *et al.,* 1993[2]; Dimakopoulos & Mayer, 2002).

No cão, verifica-se um aumento da extensão de deposição da proteína β-amilóide em várias áreas do córtex em função da idade (Cummings *et al.,* 1993;Cummings *et al.,* 1996[3];Head *et al.,* 1998;Russel *et al.,* 1996). Podem ser observados todos os tipos de placas, apesar da maioria ser do tipo difuso (Uchida *et al.,* 1992; Yoshino *et al.,* 1996). A deposição de Aβ, particularmente a forma $A\beta_{1-42}$ do terminal-C, ocorre nos neurónios e região sináptica, numa fase inicial do processo. Numa fase posterior estes depósitos dão lugar à formação de placas, na forma difusa, denominada pré-amilóide, que se tende a desenvolver espontaneamente, mas raramente atingem a forma neurítica (Dimakopoulos & Mayer, 2002). Estes depósitos pré-amilóides não coram com o vermelho do Congo nem com a tioflavina S e estruturalmente são compostos por material amorfo não fibrilar (Wisniewski *et al.,* 1996). As clássicas placas tioflavina positivas raramente são observadas nos cães (Russel *et al.,* 1992;Selkoe *et al.,* 1987). De facto, vários estudos imunohistoquímicos de fluorescência indicam que o principal tipo de placa encontrada nos canídeos é do tipo difusa, embora ocasionalmente tenha sido visualizado o subtipo maduro (primitivo ou neurítico) (Nakaruma *et al.,* 1997). No entanto, mesmo quando presentes, as placas em folha-β nunca são tão numerosas como as placas do tipo difuso (Shimada *et al.,* 1992;Cummings *et al.,* 1996[1]).

De acordo com o descrito, as primeiras placas senis aparecem em cães com idades compreendidas entre os 8 e 9 anos e aproximadamente metade da população

com mais de 15 anos apresenta placas de amilóide no cérebro (Uchida *et al.,* 1990).

Observámos placas de amilóide no córtex frontal ou temporal em 22 cães, todos com mais de 8 anos, 73% dos quais com mais de 13 anos. Escolhemos córtex frontal e temporal para estudar a deposição de Aβ pois, de acordo com vários estudos, a sua distribuição é mais consistente nestas áreas (Hou *et al.,* 1997; Satou *et al.,* 1997 ; Head et al., 2000[1];Head *et al.,* 2002[3]; Wóznicka *et al.,* 2006). No córtex parietal e occipital são pouco frequentes, o tronco cerebral e cerebelo não são afectados (Hou *et al.,* 1997; Satou *et al.,* 1997 ; Head *et al.,* 2000[1];Head *et al.,* 2002[3]). As placas de amilóide apareciam primariamente ao nível do córtex frontal e só depois no temporal. Este padrão de acumulação é comparável ao observado nos humanos (Braak & Braak 1991; Braak *et al.,* 1993). A maioria dos cães evidenciava um pequeno número de placas, apenas quatro animais apresentavam uma maior densidade de placas de amilóide.

O tipo de placas encontradas nos cães, tal como no homem, não é o mesmo em todas as áreas. Diferentes áreas podem demonstrar preferência para a formação de determinado tipo de placas. O padrão de distribuição de placas Aβ no córtex frontal dos canídeos é classificado da seguinte forma: placas de tipo I, pequenas, escassas, de aspecto leve e localizadas nas camadas profundas do córtex (camadas V e VI); a progressiva condensação forma placas de tipo II, maiores e difusas também localizadas nas camadas profundas do córtex (camadas V e VI); o tipo III é caracterizado por placas difusas nas camadas profundas, acompanhadas por placas pequenas com aspecto mais denso e compacto, presentes nas camadas superficiais II e III; finalmente o tipo IV apresenta uma distribuição mais densa de placas compactas, de menores tamanhos, abundantes em todas as camadas do córtex (Satou *et al.,* 1997;Pugliese *et al.,* 2006). Este padrão de distribuição em quatro estádios é semelhante ao observado nos humanos e a fase de maturação está correlacionada com o grau de défice cognitivo do cão (Cummings et al., 1996[3]; Miyawaki *et al.,* 2002; Satou *et al.,* 1997).

No presente trabalho identificámos os seguintes padrões de distribuição de Aβ: depósitos punctiformes compactos nas camadas superficiais do córtex; depósitos grandes difusos nas camadas mais profundas do córtex (camada V e VI); depósitos difusos nas camadas intermédias e placas compactas nas camadas profundas do córtex. A maioria dos canídeos apresentava placas de amilóide difusas e compactas em simultâneo nas camadas superficiais a profundas do córtex, semelhante ao estádio III de padrão de distribuição. Não foram observadas placas na substância branca, o que está de acordo com resultados obtidos por Pugliese *et al.,* (2006). Os primeiros casos de deposição de proteína Aβ na forma de placas começavam por volta dos 8 anos de idade, uma idade associada a elevados níveis de stress oxidativo e à dramática quebra das defesas antioxidante (Head *et al.,* 2000[2]; Papaioannou *et al.,* 2001). Ao estabelecermos a

correspondência entre a idade do cão e do homem em função do peso, verificámos que cerca de 88% dos cães com menos de 65 anos não apresentavam placas de amilóide. Nos humanos a presença de placas senis raramente é observada em indivíduos jovens e de meia-idade, mas são comuns a partir dos 60-65 anos (Esiri *et al.,* 2002).

Nos cães, os depósitos de Aβ das placas não apareciam associados a células da microglia como acontece nos casos humanos, apenas observámos uma reactividade astrocitária caracterizada por aumento da reactividade à GFAP, na área envolvente às placas, o que está de acordo com o descrito em outros trabalhos (Nakurama *et al.,* 1997; Satou *et al.,* 1997; Cummings *et al.,* 1993[1];Rofina *et al.,* 2003). Pensa-se que este tipo de placas senis são menos maduras do que as que contêm elementos celulares da glia (Cummings *et al.* 1996[2]). Contudo esta situação é alterada se as placas Aβ adquirem a conformação em folha-β (Shimada *et al.,* 1991).

As formas de Aβ detectadas nas placas são de diferentes tamanhos, todas elas com origem na clivagem diferencial do terminal-C da proteína precursora amilóide (APP). A forma mais comum presente nas placas de amilóide do cão é do tipo $A\beta_{1-42}$ (42 aminoácidos) (Cummings *et al.,* 1996[2]; Wisniewski *et al.,* 1996;Tekirian *et al.,* 1996), enquanto as placas maduras (primitivas ou neuríticas) observadas no envelhecimento cerebral humano tendem a incorporar uma outra forma, a $A\beta_{1-40}$ (40 aminoácidos) (Gravina *et al.,* 1995; Nakaruma *et al*., 1997;Cummings et al*.,* 1996[2]*;* Wisniewski *et al., 1996;* Head *et al.,* 2002; Cotman & Head, 2002). O péptido $A\beta_{1-42}$ tem uma maior propensão à agregação e tem sido sugerido que pode ser crítico na disseminação da amilóide. Contudo a deposição de $A\beta_{1-42}$ não conduz à formação de placas neuríticas no cão (Cummings *et al.,* 1996[2]; Wisniewski *et al.,* 1996). Apesar de incerto, especula-se que a razão $A\beta_{1-42}$/ $A\beta_{1-40}$ poderá ser um factor decisivo na progressão das placas de difusas a neuríticas, potencialmente neurotóxicas (Kumar-Shingh *et al.,* 2000). Vários outros parâmetros, incluindo o tipo de células activado, a APP, o processamento do péptido Aβ e a esperança de vida do cão podem representar factores contributivos (Cummings *et al.,* 1996). O tempo de vida do cão pode explicar a ausência de placas neuríticas, talvez o cão não viva tempo suficiente para que o fragmento $A\beta_{1-40}$, responsável pelo core da placa, se precipite (Cummings *et al.,* 1996[2]; Colle *et al.,* 2000; Pugliese *et al.,* 2006). Outros autores têm demonstrado, em estudos realizados *in vitro,* que a presença do péptido Aβ mais longo não é fundamental no processo de amiloidogénese (Wisniewski *et al.,* 1996) e assim a ausência de placas neuríticas no cão poderá estar relacionada com outros factores tais como a Apolipoproteína E, iões metálicos, a expressão específica da GFAP e reacção microglial (Mrak *et al.,* 1996; Vehmas *et al.,* 2003; Pugliese *et al.,* 2006[2]).

A Apolipoproteína E (ApoE) é um dos constituintes das placas senis, das tranças neurofibrilhares e da angiopatia amilóide vascular presente na doença de Alzheimer (Nishiama *et al.,* 1996). É uma glicoproteína reguladora do metabolismo lipídico com três isoformas, a ApoE ε2, a ApoE ε3 e a ApoE ε4, que diferem entre si na estrutura primária e com diferentes impactos no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Ye *et al.,* 2005). A Apolipoproteína E está presente no citoplasma neuronal e também é detectada nas células gliais, especialmente nos astrócitos (Diedrich *et al.,* 1991). Alguns estudos indicam que a ApoE ε4 é um factor de risco na doença de Alzheimer, uma vez que promove a agregação da amilóide em fibrilhas e a formação de tranças (Kuusisto *et al.,* 1994; Gearing *et al.,* 1995). Seria pois interessante estudar o gene da ApoE e de que modo esta interfere no processo de amiloidogénese do cão.

Os trabalhos realizados por vários autores indicam que a Aβ é tóxica para os neurónios (Forloni *et al.,* 1993; Pike, *et al.,* 1993;Ivins *et al.,* 1998;LaFerla *et al.,* 1995). O aumento dos níveis da proteína β-amilóide induz stress oxidativo, o que prejudica a homeostasia iónica da célula e o metabolismo energético tornando os neurónios vulneráveis à apoptose e à excitotoxidade (Mattson & Chan, 2001). Contudo apesar das placas amilóides serem agentes destrutivos das células neuronais, estas últimas são frequentemente encontradas intactas e embebidas na massa amilóide. Isto pode ser explicado pelo facto que a Aβ apenas exerce o seu efeito neurotóxico quando agregada em conformação folha-β, sendo neurotrófica quando na forma solúvel (Pike *et al.,* 1993).

O efeito tóxico directo da deposição de Aβ relacionada com os défices cognitivos tem sido demonstrado nos humanos e cães (Cummings *et al.,* 1996[1]; Cumming's *et al.,* 1996[3]; Cummings *et al.,* 1996[4];Head *et al.,* 1998; Colle *et al.,* 2000; Näslund *et al.,* 2000;Rofina *et al.,* 2006). Contudo, no cão a extensão e o número de placas de amilóide geralmente iguala ou excede o observado na maioria dos casos severos de Alzheimer (Cummings *et al.,* 1996[3];Giaccone *et al*., 1990) e, no entanto, o declínio cognitivo apenas pode ser comparável ao de um estado inicial da doença de Alzheimer (Cummings *et al.,* 1993). Possivelmente outros eventos subjacentes, que meramente se manifestam com a acumulação anormal de Aβ, são mais críticos na rotura da função celular (Cummings *et al.,* 1996[3]).

A maioria dos estudos realizados demonstra uma elevada frequência de amiloidose cerebral, chegando a atingir quase os 100% nos cães com mais de 14 anos (Wegiel *et al.,* 1996; Russel *et al.,* 1996;Czasch & Baumgärtner*,* 2006). Um dos factores a ter em conta, em relação à diferença de resultados entre o nosso e outros estudos, prende-se com o método de detecção da Aβ. No nosso estudo os depósitos de Aβ não foram uma constante nos animais com mais de 14 anos, contrariamente ao referido, talvez porque o anticorpo utilizado detecta o segmento $A\beta_{1-17}$ da proteína. Este é um

factor importante a considerar uma vez que os depósitos de Aβ do cérebro do cão consistem maioritariamente no fragmento $Aβ_{1-42}$, de modo que é possível que com o uso de outros anticorpos se possam observar com mais frequência (Cummings *et al.,* 1996[2]; Nakaruma *et al.,* 1997; Russel *et al.,* 1996; Wisniewski *et al.,* 1996). Além do mais, existem técnicas mais sensíveis, como ensaios enzimáticos, capazes de detectar depósitos de proteína amilóide nos casos em que não são observados por imunocitoquímica (Funato *et al.,* 1998).

A amostra de canídeos seleccionados para o estudo é outro factor que poderá explicar a variabilidade encontrada em relação à deposição de Aβ. A raça e a origem dos cães são factores que poderão influenciar a extensão de deposição de proteína Aβ, uma vez que determinadas raças têm maior predisposição que outras para o desenvolvimento de Aβ em idades mais jovens, sendo a raça Beagle, de todas as estudadas, a que demonstra uma maior incidência, determinada provavelmente por herança familiar ou outros factores (Russel *et al.,* 1992).

O porte do animal não foi factor significativo na previsão de acumulação de Aβ, o que indicia que outros factores de saúde não contribuem significativamente para a deposição de Aβ. O meio ambiente e factores genéticos são de considerar (Soltysiak, 1985).

O efeito do sexo não foi avaliado no nosso estudo, no entanto seria interessante estudar o efeito hormonal no desenvolvimento de Aβ, particularmente o estudo dos mecanismos subjacentes aos baixos níveis de estrogénio no desenvolvimento de patologia cerebral, pois sabe-se que as mulheres que atingem a menopausa mais jovens são mais susceptíveis a desenvolver patologias neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Henderson *et al.,* 1994; Paganini-Hill & Henderson, 1994).

A acumulação intraneuronal de proteína *tau* hiperfosforilada, que conduz à formação de tranças neurofibrilhares (TNF's) e às neurites distróficas das placas senis, é uma das principais características da doença de Alzheimer, geralmente indicativa de uma fase avançada da doença (Esiri *et al*., 2002; LaFerla & Oddo, 2005;Wegiel *et al*., 1998; Pugliese *et al*., 2006[2]).

A proteína *tau* é uma fosfoproteína associada aos microtúbulos, essenciais na estrutura e função das células nervosas, maioritariamente expressa nos neurónios onde tem um importante papel na agregação de monómeros de tubulina em microtúbulos que constituem a rede de microtúbulos neuronais**.** Os microtúbulos estão envolvidos na manutenção do tamanho da célula e servem como trilho no transporte axonal (Buée *et al*., 2000). Esta proteína apresenta três isoformas diferentes, de acordo com o grau de fosforilação: proteína *tau* citosólica com fosforilação normal (C); a forma hiperfosforilada solúvel (HP); e a HP polimerizada em filamentos em dupla hélice (PHF). A

hiperfosforilação da proteína *tau* tem como consequência o colapso do sistema de microtúbulos da célula nervosa (Overmyer, 2002).

O principal evento patológico em muitas desordens neurodegenerativas é a agregação das isoformas da proteína *tau* em inclusões intraneuronais filamentosas. A presença de proteína *tau* na forma de PHF é muito frequente nas patologias degenerativas tais como o Alzheimer, a paralisia supranuclear progressiva, a degenerescência cortico-basal, a doença de Pick, a demência fronto-temporal (Spillantini *et al.,* 1998).

Estudos moleculares revelaram que a anormal fosforilação será um dos principais acontecimentos no processo que conduz à sua agregação. No entanto, a proteína *tau* normal aparece fosforilada no cérebro de fetos e adultos, não se agregando em inclusões filamentosas, o que pressupõe que deve existir um outro mecanismo envolvido na formação patológica de filamentos *tau*, para além da fosforilação (Buée *et al*., 2000). De acordo com Rofina *et al.,* (2004), a formação de tranças neurofibrilhares (TNF's) tem lugar com a polimerização da proteína *tau* em PHF e ligação à ubiquitina. A formação de tranças neurofibrilhares está associada a uma redução da solubilidade da proteína *tau* e ao aparecimento de uma forma alterada da proteína resistente às proteases (Esiri *et al.,* 2002).

A microscopia electrónica revelou que as clássicas tranças que se observam na doença de Alzheimer são constituídas por densas bandas de filamentos entrelaçados, que ocupam a maior parte do citoplasma deslocando as organelas e o núcleo. Os filamentos medem cerca de 20nm com uma constrição regular de 10nm a cada 80nm (Esiri *et al.,* 2002).

Alterações neurofibrilhares associadas à idade estão descritas nos ovinos e caprinos em ausência de amilóide (Wegiel *et al.,* 1998), em ursos polares e gatos na presença simultânea de β-amilóide (Wegiel et al., 1998; Pugliese *et al.,* 2006[2]**;** Riederer *et al.,* 2001). Apesar das semelhanças existentes entre o cão e o homem em relação à deposição de proteína β-amilóide e aos défices cognitivos, no cão raramente se verifica a formação TNF's (Cummings *et al.,* 1993[1]; Cummings *et al.,* 1996[1]; Shimada *et al.,* 1991; Dimakopoulos & Mayer, 2002; Pugliese *et al.,* 2006;Russel *et al.,* 1992; Morys *et al.,* 1994). De acordo com alguns autores, a transição entre a normal fosforilação da proteína tau para a hiperfosforilação que conduz à degenerescência celular e formação de TNF's não foi detectada nos cães (Cummings *et al.,* 1993; Dimakopoulos & Mayer, 2002). No entanto, está documentada a existência de níveis elevados de proteína *tau* hiperfosforilada no cérebro de cães idosos (Uchida *et al.,* 1997;Wegiel *et al.,* 1998; Pugliese *et al*., 2006[2]).

Na nossa amostra 18 cães apresentavam marcação anti-*tau* sugestiva de patologia neurofibrilhar nos neurónios do hipocampo, caracterizada por uma coloração citoplasmática difusa e fina, na maioria dos casos, adquirindo uma forma curvilínea em chama de coloração mais intensa em outros. A presença de marcação *tau* positiva em 4 cães jovens do nosso estudo, sugere que a deposição de proteína tau hiperfosforilada não estará apenas associada à idade, o que corrobora uma investigação efectuada anteriormente (Wegiel *et al.,* 1998).

No Homem, as tranças neurofibrilhares têm uma distribuição regional diferente das placas senis. As primeiras áreas afectadas por TNF's são as projecções dos neurónios do córtex entorrinal e formação do hipocampo, enquanto que a deposição de proteína β- amilóide, na forma de placas senis, observa-se primeiro ao nível do neocórtex do lobo frontal, temporal e parietal (Braak & Braak, 1991). A distribuição de placas de amilóide e de TNF's observada nos cães em estudo foi semelhante, as primeiras placas foram observadas no córtex frontal e as TNF's na formação do hipocampo.

Apesar de existirem vários estudos que indicam que o processo de neurodegenerescência do cão não envolve a formação de TNF's, o estudo ultraestrutural efectuado a fragmentos do lobo frontal e temporal de quatro canídeos idosos, permitiu identificar a presença de tranças neurofibrilhares num dos casos, um Caniche com 12 anos de idade. As tranças neurofibrilhares apresentavam o aspecto de longos filamentos entrelaçados, de aspecto helicoidal, presentes no citoplasma a comprimir as mitocôndrias. De salientar que de entre os quatro cães estudados este era o mais novo, mas o que apresentava uma maior intensidade e extensão de deposição de proteína Aβ. No entanto, não foi possível estabelecer associação entre a deposição de Aβ e a imunorreactividade anti-*tau*.

De facto os nossos resultados estão mais em concordância com os apresentados por Papaioannou *et al*., (2001) e Pugliese *et al.,* (2006[2]). O primeiro utilizou três anticorpos monoclonais anti-*tau* e constatou a presença, com um dos anticorpos, de tranças neurofibrilhares no cérebro de cães idosos num padrão punctiforme disperso. O segundo estudo, mais recente, utilizou anticorpos monoclonais, anti-*tau* 1 que reconhecem os resíduos 189 e 207 da sequência humana. Constatou que a hiperfosforilação da proteína *tau* é um processo comum associado ao envelhecimento do cão. Além disso, este estudo também sugere que a hiperfosforilação da proteína *tau* e a deposição de Aβ são processos independentes que ocorrem durante o envelhecimento do cão (Pugliese *et al*., 2006[2]).

A presença de tranças neurofibrilhares, confirmada por microscopia electrónica, em um de quatro cães e a marcação anti-*tau* observada em dezoito cães reforça a necessidade em aprofundar mais os estudos acerca das alterações do citoesqueleto.

No homem, o envelhecimento também provoca lesões selectivas no sistema nervoso periférico (SNP), à semelhança do que acontece em áreas centrais do sistema nervoso, nomeadamente a perda e degenerescência de receptores cutâneos e terminações nervosas sensitivas que explicam os défices sensitivos observados nos indivíduos mais idosos. No nervo as alterações descritas incluem uma diminuição de densidade das fibras mielinizadas e não-mielinizadas, a presença de axónios em degenerescência e alterações vasculares relacionadas com a hipertensão e a diabetes (Cowen, *et al.,* 2005). No músculo, está descrita a presença de fibras atrofiadas e angulosas, traduzindo desnervação e também alterações vasculares das artérias do endomísio (Dubowitz, 1985; Vandervoort, 2002).

Por essa razão decidimos estudar nervo e músculo de alguns cães, para verificar possíveis alterações neuromusculares relacionadas com a idade.

Os cortes semi-finos do nervo, corados com Azul de Toluidina não evidenciaram alterações patológicas. A densidade de fibras mielinizadas era normal e não se observaram fibras em degenerescência ou alterações da mielina.

A aplicação de colorações histoquímicas a cortes congelados de tecido muscular esquelético é de grande valor no estudo de patologias musculares, por várias razões. Primeiro, porque podem ser utilizadas para demonstrar o tipo de fibras com base nas reacções enzimáticas e, deste modo, o tipo selectivo de fibra envolvido em cada processo patológico. Segundo, porque estes métodos podem evidenciar a ausência de uma enzima em particular ou o excesso de um particular substrato (ex: o glicogénio nas doenças de armazenamento de glicogénio). Por último, podem demonstrar várias alterações estruturais do músculo, impossíveis de visualizar com as técnicas histológicas de rotina, como os “cores” de deficiência-enzimática e as anomalias na distribuição das mitocôndrias (Dubowitz, 1985).

A determinação da composição quanto ao tipo de fibras depende muito do método utilizado (Latorre *et al.,* 1993). De acordo com as diferentes técnicas, sendo que a mais utilizada é a determinação da actividade da enzima miosina adenosina trifosfatase (ATPase), podemos encontrar os seguintes tipos de fibras musculares, com características fisiológicas e metabólicas definidas: Tipo I, fibras de contracção lenta e metabolismo oxidatico; Tipo IIA, de contracção rápida, elevado metabolismo anaeróbio e moderadamente oxidativo; Tipo IIB, de contracção rápida e elevado metabolismo anaeróbio. As fibras do tipo I dependem de fosforilação oxidativa para obtenção de energia e, portanto, são ricas em mitocôndrias e em mioglobina. As fibras de tipo II são fibras que utilizam a glicólise anaeróbica para obtenção de energia e são pobres em mitocôndrias e mioglobina. Está geralmente assumido que este tipo de identificação corresponde, respectivamente, a fibras com predomínio de uma fonte energética

oxidativa apropriada a actividade de sustentação, e a fibras com fonte de energia predominantemente do tipo glicolítica apropriada a uma actividade mais forte e de curta duração (Hulland, 1993; Vleet, 1997). No entanto, ambos os tipos de fibras contêm uma grande variedade de enzimas que as torna capazes de grande amplitude de actividades bioquímicas e, em certas circunstâncias, de uma inter-conversão das fibras em actividade (Hulland, 1993). O envelhecimento é, em geral, acompanhado por uma pronunciada diminuição da actividade física, o que causa uma mudança no tipo de fibra no sentido rápida para lenta (Minamoto, 2005).

O estudo histoquímico do músculo do deltóide das amostras seleccionadas empregando a reacção da ATPase, permitiu a identificação de três tipos de fibras: Tipo I, escuras em pré-incubação ácida e negativas em pré-incubação básica, de metabolismo oxidativo; fibras Tipo IIA, negativas em pré-incubação ácida e positivas na alcalina, e fibras intermédias em ambas as pré-incubações, denominadas Tipo IIB. Verificámos um predomínio de fibras Tipo II, no entanto este facto pode estar associado ao tipo de músculo colhido, um músculo superficial, pois, segundo um estudo efectuado, há uma maior percentagem de fibras tipo II nos músculos mais superficiais do membro anterior (Armstrong *et al.,* 1982).

No músculo de cão, as investigações para identificar os diferentes tipos de fibras, produziram resultados contraditórios, uma vez que as fibras Tipo II não apresentam o típico comportamento metabólico das fibras IIB. Este tipo de fibras Tipo II cão é muito mais oxidativa e demonstram-se pela reacção com a NADH (Mercado *et al.,* 2003). Alguns autores reclamam não terem encontrado fibras Tipo IIB no músculo de cão, enquanto que outros afirmam ter encontrado este tipo de fibra, ainda que com ténues diferenças relativamente às encontradas noutros mamíferos (Latorre *et al.,* 1993). Um estudo levado a cabo por Snow *et al.,* (1982) através do uso de técnicas histoquímicas, bioquímicas e imunohistoquímicas demonstrou a existência de fibras Tipo IIA e de uma fibra Tipo II peculiar (II cão). Apesar destas últimas apresentarem diferentes propriedades na reacção com a ATPase e na estrutura de cadeias pesadas de miosina, não correspondiam às clássicas fibras Tipo IIB verificadas nas outras espécies. Este tipo de fibras Tipo II cão é muito mais oxidativa e demonstram-se pela reacção com a NADH (Mercado *et al.,* 2003) No entanto, como a finalidade deste trabalho não foi a classificação dos subtipos de fibras, optou-se pela classificação em Tipo I, Tipo IIA e Tipo IIB.

O comportamento das fibras, quando sujeitas à reacção metabólica da NADH, demonstrou um amplo espectro de intensidade de coloração. Esta heterogeneidade sugere a ausência de um ponto exacto de demarcação entre as fibras e a alta capacidade oxidativa do músculo canino (Mercado et *al.,* 2003).

O músculo deltóide de um dos cães, um Pastor Alemão com 16 anos, apresentava alterações musculares sugestivas de miopatia associada ao envelhecimento, caracterizada por aumento da variabilidade do diâmetro de fibras e a presença fibras atrofiadas e angulosas. A reacção à SDH demonstrou a presença de fibras com halo claro central, desprovido de actividade enzimática, alteração normalmente associada a neuropatias periféricas crónicas ou neuropatias agudas em fase de recuperação. Os estudos experimentais sugerem que este tipo de fibras se observa durante a reenervação (Dubowitz, 1985).

As polineuropatias são comuns nos cães no entanto, a determinação da causa específica, tal como acontece nos humanos, geralmente não é encontrada (Goldston & Hoskins, 1999). Uma grande percentagem é de origem congénita ou hereditária e os mecanismos fisiopatológicos são ainda pouco claros (Kline, 2001). Entre as neuropatias de origem congénita ou hereditária descritas estão a neuropatia do Boxer, a neuropatia axonal de raças gigantes, a neuropatia hipertrófica dos Mastins e as neuropatias sensoriais. A maioria destas patologias é degenerativa e não têm tratamento. Estão também descritas as neuropatias inflamatórias ou imunomediadas que incluem as poliradiculites e as de origem metabólica, na sequência de diabetes, hipotiroidismo e hiperadrenocorticismo (Kline, 2001; Goldston & Hoskins, 1999). Os sinais clínicos de lesão do 2º neurónio ou do nervo periférico serão a atrofia muscular, a diminuição dos reflexos (Nelson & Couto, 1998) e alterações disautonómicas (Dubowitz, 1985).

As miopatias do cão são classificadas em inflamatórias e não-inflamatórias. Apesar de ambas as formas aparecerem nos idosos, as miopatias não inflamatórias, particularmente as de origem metabólica e endócrina são mais comuns neste grupo etário (Kline, 2001; Nelson & Couto, 1998).

Será muito interessante, num futuro projecto, dedicarmo-nos ao estudo neuropatológico e genético das doenças neuromusculares nos canídeos.

6-CONCLUSÃO

O estudo realizado permitiu as seguintes conclusões:

- As principais alterações neuropatológicas encontradas associadas ao processo de envelhecimento do cão foram a fibrose das meninges, a dilatação dos ventrículos laterais, a hialinização vascular, a satelitose, a astrocitose do córtex, a deposição de lipofuscina, o aumento de inclusões de "corpora amilácea" e corpos ubiquitinados na substância branca, a angiopatia amilóide cerebral e as placas de amilóide.

- A acumulação intraneuronal de proteína *tau* hiperfosforilada, sugestiva de patologia neurofibrilhar, foi observada nas células piramidais do hipocampo em 18 cães e o estudo ultraestrutural evidenciou a presença de tranças neurofibrilhares num cão com 12 anos de idade, o que não está de acordo com os resultados da maioria dos estudos anteriores que indicam que o processo de neurodegenerescência do cão não envolve a formação de TNF's.

- A deposição de proteína β-amilóide vascular e sob a forma de placas verificou-se apenas nos animais com idade superior a 8 anos em significativa associação com o envelhecimento, num padrão de distribuição semelhante ao do Homem. A maioria dos cães apresentou, em simultâneo, placas difusas e compactas nas camadas superficiais e intermédias do córtex, semelhante ao estádio III de padrão de distribuição.

- O porte do cão não influenciou a presença de qualquer alteração neuropatológica, nomeadamente a fibrose das meninges apesar desta se ter observado em cães jovens de grande porte. O peso do encéfalo apresentou uma correlação de positiva com o peso corporal. A calcificação das meninges e do córtex, não apresentou relação com a idade, outros factores nomeadamente nutricionais, patologias metabólicas, processos infecciosos e alterações de vascularização poderão estar na causa destes depósitos de cálcio ao causarem morte neuronal alterando o equilíbrio fosfo-cálcio.

- As alterações vasculares cerebrais foram observadas com elevada frequência, nomeadamente as microhemorragias do córtex e leptomeninges, a hialinização da parede dos vasos, a atrofia perivascular e enfartes. Estes resultados reflectem a importância de controlar as causas das alterações cerebrovasculares, em particular a monitorização da tensão arterial no cão geriátrico, uma vez que a hipertensão é apontada como uma das principais causas da maioria das lesões cerebrovasculares encontradas.

- As microhemorragias do córtex, não se relacionaram com a idade e, contrariamente ao descrito nos humanos, não se estabeleceu associação com a angiopatia amilóide cerebral.

- Não foram observadas inclusões eosinifílicas compatíveis com corpos de Lewy ou perda de neurónios pigmentados na substância negra, o que sugere que os neurónios sintetizadores de dopamina são preservados durante o envelhecimento do cão.

- O estudo neuromuscular das amostras seleccionadas não revelou alterações relacionadas com o envelhecimento, mas serão necessários mais amostras para melhor caracterização.

-Os dados apresentados suportam a teoria de que os cães idosos são um bom modelo de estudo da doença de Alzheimer e envelhecimento do humano. Os canídeos constituem um importante componente de avaliação nos estudos das patologias neurodegenerativas humanas e poderão eventualmente ser úteis no desenvolvimento de terapêuticas eficazes.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acierdo, M.J., Labato, M.A. (2005) Hypertension In renal disease: Diagnosis and treatment. Clinical Techniques in Small Animal Practice. (20):23-30

Adams, B., Chan, A., Callahan, H. Milgram, N.W. (2000) The canine as a model of human cognitive aging: Recent Developments. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. (24): 675-692

Adams, B.,Chan, A., Callahan, H., Siwak, C., Tapp, D., Douglas, C., Atkinson, P., Head, H., Cotman, C.W., Milgram, N.W. (2000^2).Use of a delayed non-matching to position task to model age-dependent cognitive decline in the dog. Behavioural Brain Research. (108):47-56

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging (21):383-42

Anderson, A.J., Ruehl, W.W., Fleischmann, L.K., Stenstrom, K., Entriken, T.L., Cummings, B.J. (2000) DNA damage and apoptosis in aged canine brain: relationship to Abeta deposition in the absence of neuritic pathology. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biology Psychiatry. (24): 787-799

Andrade, S.F., Apel, T.L. (2004) Hipertensão arterial primária em um cão de raça Pastor Alemão- relato de um caso. Clínica Veterinária. (51): 52-56

Ansari, M.Q., Chincanchan, C.A., Armstrong, D.L. (1990). Brain calcification in hypoxic-ischemic lesions: an autopsy review. Pediatric Neurology.(2):94

Armstrong, R.A. (1998). Beta-amyloid plaques: stages in life history or independent origin?. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders. (4):227-238

Armstrong, R.B., Saubert, C.W., Seeherman, H.J., Taylor, C.R. (1982).Distribution of fiber types in locomotor muscles of dogs. The American Journal of Anatomy. (1): 87-98

Azcoitia, I., Perez-Martin, M., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Garcia-Segura, L.M. Tresguerres, J.A. (2005) Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. Neurobiology of Aging. (5): 697-703

Barsoum, S., Callahan, H., Robinson, K.,Chang, P. (2000) Canine Models for Human Genetic Neurodegenerative Diseases.Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biology Psychiatry. (24): 811-823

Bartges, J.W.,Willis, A.M., Polzin, D.J. (1996). Hypertension and renal disease. Veterinary Clinics of North America Small Animals. 1331-1345

Beach, T.G., Walker, R., Mcgeer, E.G.(1989) Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. Glia. (2):420-426

Bernal, F., Andres, N., Samuel, D., Kerkerian-LeGoff, L., Mahy, N. (2000) Age-related resistance to alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid-induced hippocampal lesion. Hippocampus. (3):296-304

Bernsen, R.A., Busard, H.L., Ter Laak, H.J.,Gabreels, F.J., Renier, W.O.;Joosten, E.M., Theeuwes, A,G.(1989) Polyglucosan bodies in intramuscular motor nerves. Acta Neuropathologica. (6):629-633.

Biernat, W., Liberski, P.P.,Guiroy, D.C., Yanagihara, R., Gajdusek, D.C., (1995) Profiferation cell antigen immunohistochemistry in astrocytes in experimental Creutzfeldt-Jacob disease and in human Kuru, Creutzfeldt-Jacob disease and Gerstmann-Straussler – Scheinker syndrome. Neurodegeneration. (4):195-201

Blom, N., Linnemann, D.(1992) Alzheimer's dementia and amyloid precursor-protein. Ugeskr Laeger. (15):1010-1015

Bodey, A.R., Michell, A.R. (1996). Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs. Journal of Small Animal Pratice. (37): 116-125

Bodjarian, N., Jamali, S., Boisset, N., Tadie, M.(1997) Strong expression of GFAP mRNA in rat hippocampus after a closed-head injury. Neuroreport. (18): 3951-3956

Bons , N., Mestre, N., Petter, A.(1991) Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microbeus murinus.* Neurobiology of Aging. (13): 99-105.

Borras, D., Ferrer, I., Pumarola, ,M. (1999) Age- related Changes in the Brain of the Dog. Veterinary Pathology (36):202-211

Braak, H., Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathologica. (4):239-59

Braak H, Braak E, Bohl,J. (1993). Staging of Alzheimer-related cortical destruction. European Neurology. (6):403-408

Braund, K.G. (2003). Neurovascular disorders. Clinical Neurology in Small Animals-Localization, Diagnosis and Treatment. International Veterinary Information Service. (www.ivis.org) Ithaca, New York, USA.

Brunk, U.T., Terman, A. (2002) The mitochondrial-lisosomal axis theory of ageing. Accumulation of damage mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. European Journal of Biochemistry. (269)1996-2000

Brzyska, M., Elbaum, D. (2003). Dysregulation of calcium in Alzheimer's disease. Acta Neurobiologica. (3):171-183

Buée, L., Bussière, T.,Buée- Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R.(2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Research Reviews. (33): 95-130

Burch,D., Sheerin, F. (2005). Parkinson‘s Disease. Lancet. (365):622-627

Callahan, H., Ikeda-Douglas, C., Head, E., Cotman, C.W., Milgram, N.W.(2000) Development of a protocol for studying object recognition memory in the dog. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biology Psychiatry. (24):693–697

Cissé,S., Perry,S.G., Lacoste-Royal,G., Cabana,T., Gauvreau (1993) Immunochemical identification of ubiquitin and heat-shock proteins in corpora amylacea from normal and Alzheimer’s diseade brains. Acta Neuropathologica. (85):233-240

Cochran, W.G. (1954). Some methods for strengthening the common χ^2 tests. Biometrics. (10):417-451

Colle, M.A., Hauw, J.J., Crespeau, F., Uchihara,T., Akiyama,H., Checler,F., Pageat,P., Duykaerts,C. (2000) Vascular and parenchymal Aβ deposition in the aging dog:- correlation with behavior. Neurobiology of Aging (21):695-704

Colombo, J.A., Fuchs, E., Härtig, W., Marotte, L.R., Puissant, V. (2000). Rodent-like and primate-like types of astroglial architecture in the adult cerebral cortex of mammals: acomparative study. Anatomy and Embryology. (201):11-120

Cork, L.C., Powers, R.E., Selkoe, DJ., Davies, P., Geyer, JJ., Price, DL.(1988) Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. Journal of Neurophatology and Experimental Neurology. (7): 629-641

Cotman, C., Head, E. (2002) The Neuropathology of Alzheimer's Disease. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral Changes in Dogs. 23-26. Orlando.USA.

Cowen, T., Ulfhake, B., King, R.H. (2005). Aging in the Peripheral Nervous System. *In* Peripheral Neuropathy. Volume 1. 4th Edition. Dyck, P.J., Thomas, P.K.Copyright, Elsivier.

Cowgill, L.D., James, K.M., Levy, J.K., Browne, J.K., Miller, A., Lobingier, R.T., Egrie, J.C. (1998). Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. Journal of the American Veterinary Medical Association. (4):521-528

Cuervo, A.M. (2004[1]). Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biology. (2):70-77

Cuervo, A.M. (2004[2]) Autophagy: many paths to the same end. Molecular and Cell Biochemistry. (1-2):55-72

Cummings, B.J., Su, J., Cotman, C.W., White, R.G., Russel, M. (1993[1]) β-Amiloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer disease. Neurobiology of Aging (14): 547-560

Cummings, B.J., Su, J.H., Cotman, CW.(1993[2]) Neuritic involvement within bFGF immunopositive plaques of Alzheimer's disease. Experimental Neurology. (2):315-325

Cummings, B.J., Head, E., Ruehl,W., Milgram, N.W., Cotman, C.W.(1996[1]) The canine as an animal model of human aging and dementia. Neurobiology of Aging (17):259-268

Cummings, B.J., Satou, T., Head, E., Milgram, N.W., Cole, G., Savage, M., Podlisny,M., Selkoe, D., Siman, R., Greenberg, B., Cotman, C.W. (1996[2]) Diffuse plaques contain C-terminal ABeta 1-42 and not ABeta 1-40: evidence from cats and dogs. Neurobiology of Aging. (4):653-659

Cummings, B.J., Head, E., Afagh,A.J., Milgram, N.W., Milgram, N.W. (1996[3]) β-Amyloid Accumulation Correlates with Cognitive Dysfunction in the Aged Canine. Neurobiology of Learning and Memory. (66):11-23

Cummings, B.J., Pike, C.J., Shankleb, R., Cotman, C.W. (1996[4]). β-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. (17): Issue 6, November-December, Pages 921-933

Czasch, S., Baumgärtner, W.(2006). A comparison of immunohistochemical and silver staining methods for the detection of difuse plaques in the aged canine brain. Neurobiology of aging. (27): 293-305

Czeh, B., Simon, M., Hart, M.G., Schmelting, B., Hesselink,M.B., Fuch, E. (2005) Chronic Stress Decreases the Number of Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons in the Hippocampus: Prevention by Treatment with a Substance P Receptor (NK1) Antagonist. Neuropsychopharmacology. (30): 67–79

Dauer, W., Przedborski, S.(2003).Parkinson Disease, Mechanisms and Models. Neuron. (39):889-903

Deeb, D.J., Wolf, N.S.(1994). Studying longevity and morbidity in giant and small breeds of dogs. Veterinary Medicine. (89):702-13)

Delaere, P., Duyckaerts, C., He,Y., Piette, F., Hauw, J.J. (1991).Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. Acta Neuropathologica. (3):328-335

DeMattei, M., Levi, A.C., Fariello, R.G. (1986). Neuromelanin pigment in nigra neurons of rats and dogs. Neuroscience Letters. (72):37-42

Detweiler, D.K. (1989) Spontaneous and induced arterial disease in the dog: pathology and pathogenesis. Toxicologic Pathology. (17): 94-108

Dickson, D.W., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., Yen, S.(1988) Alzheimer's Disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. American Journal of Pathology. (13):86-101

Diedrich, J.F., Minnigan,H., Carp, R.I., Whitaker, J.N., Race, R., Frey,W., Haase, A.T.(1991). Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes.
Journal of Virology.(9): 4759-4768

Dimakopoulos A. C., Mayer R. J. (2002) Aspects of Neurodegeneration in the Canine Brain. The American Society for Nutricional Sciences. (132):1579-1582.

Dubowitz, V.(1985). Muscle Biopsy-A Practical Approach. Second Edition. Baillière Tindall.W.B. Saunders.19-81

Esiri, M.M., Hyman, B.T., Beyreuther, K., Masters, C.L. (2002). Ageing and dementia. *in* Greenfield's Neuropathology.(7th Ed.) Graham, D.I. *et* Lantos, P.L., Arnold, London, UK.

Ferrer, I., Pumarola, M., Rivera,R., Zújar, M.J., Cruz-Sanchez,F., Vidal, A.(1993) Primary central white matter degeneration in old dogs. Acta Neuropathologica. (86): 172-175

Fonseca, M.I., Head, E., Velazquez, P., Cotman, C.W., Tenner, A. (1999). The presence of Isoaspartic Acid in β-Amyloid Plaques Indicates Plaque Age. Experimental Neurology.(157): 277.288

Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., Angeretti N.(1993) Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. Neuroreport. (5):523-526

Fox, P., Petrie, J.P., Suter, P. (2000). *in* Bonagura, J.D. ed. Textbook of Veterinary Internal Medicine.5th ed. Philadelphia: WB Saunders .964-981

Frank, D.(2003) Cognitive Dysfunction in Dogs. Praktische Tierarzt, 84(3):184

Fredrickson, R.C. (1992). Astroglia in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. (13): 239-253

Fukuoka, A., Nakayama, H., Doi, K.(2004) Immunohistochemical detection of β-amyloid precursor protein in the canine brain and non.neuronal epithelial tissues. Amyloid Journal of Protein Folding Disorders. (11):173-178

Funato, H., Yoshimura, M., Kusui, K., Tamaoka, A., Ishikawa, K., Ohkoshi, N., Namekata, K.; Okeda, R., Ihara, Y.(1998). Quantification of amyloid beta-protein (A beta) in the córtex during aging and in Alzheimr's disease. American Journal of Pathology. (152): 1633-1630

Gearing, M., Schneider, J.A., Rebeck, G.W., Hyman, B.T.,Mirra, S.S. (1985). Alzheimer's disease with and without coexisting Parkinson's disease changes: apolipoprotein E genotype and neuropathologic correlates. Neurology. (45):985-1990,

Gerlach, M., Riederer, P. (1996). Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. Journal of Neural Transmission. (103): 987-1041

Giaccone,G., Verga, L., Finazzi, M., Pollo, B., Tagliavini, F., Frangione, B., Bugiani, O. (1990) Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in aged dogs. Neuroscience Letters. (114): 178-183

Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl,D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R.(2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. Neurology. (9):1495-1500

Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. (3):885-90

Goedert, M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. Trends in Neurosciences.(11):460-465

Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature. (426): 895-899

Goldston, R.T., Hoskins, J.D.(1999).Geriatrics & Gerontology of the Dog and Cat. W.B Saunders Company

González-Sorino, J., Martin,P.G., Contreras-Rodriguez, J., Martinez-Sainz, P., Rodriguez-Veiga, E. (2001) Age -related changes in the ventricular system of the dog brain. Annals of Anatomy. (183): 283-291

Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W. Jr, Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. Journal of Neuroscience. (14):4491-500

Gravina, S.A., Ho, L., Eckman, C.B., Long, K.E., Otvos Jr.,L., Younkin, L.H., Suzuki, N., Younkin, S.G.(1995) Amyloid β Protein (Aβ) in Alzheimer's Disease Brain Biochemical And Immunocytochemical Analysis With Antibodies Specific For Forms Ending At Aβ40 Or Aβ42(43) .Journal of .Biological Chemistry.(270):7013-7016

Gray, D.A., Woulf, J.(2005). Lipofuscin and Aging: A matter of toxic Waste. Science of Aging Knowledge Environment. (5)

Greeley, E.H., Ballam, J.M., Harrison, J.M., Kealy, R.D., Lawler, D.F., Segre, M. (2001).The influence of age and gender on the immune system: a longitudinal study in Labrador Retrivier Dogs.Veterinary Immunology and Immunopathology. (82): 57-71

Green, P. D., Little, P. B.(1974). Neuronal Ceroid-lipofuscin Storage in Siamese Cats. Canadian Journal of Comparative Medicine. (2): 207–212.

Greenberg, S.M., Briggs ,M.E., Hyman, B., Kokoris, G., Takis, C., Kanter, D., Kase, C., Pessin, M. (1996) Apolipoprotein E 4 Is Associated With the Presence and Earlier Onset of Hemorrhage in Cerebral Amyloid Angiopathy. Stroke. (8):1333-7.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung,Y.C., Quinlan,M., Wisniewski, H.M.(1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proceedings of National Academy of Sciences. U S A. (13):4913-4917

Hansen, L.A., Armstrong,D.M, Terry, R.D. (1987). An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in aging human cerebral cortex. Neurobiology of Aging. (8): 1-6

Head, E.,Mehta, R., Hartley, J., Kameka, M., Cummings, B.J., Cotman, C.W., Ruhel, W.W., MilgramN.W.(1995). Spacial Learning and Memory as a Function of Age in the Dog. Behavioral Neuroscience. (109): 851-858

Head, E., Callahan,H., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., Milgram, N.W.(1998) Visual-discrimination learning ability and β-amyloid acumulation in the dog. Neurobiology of Aging. (19): 415-425

Head, E., McCleary,R., Hahn,F.F., Milgram,N.W., Cotman,C.W. (2000[1]) Region -specific age onset of β-amyloid in dogs. Neurobiology of Aging. 21(1):89-96

Head, E., Thornton, F.L., Tong,L., Cotman,C.W. (2000[2]) Initiation and Propagation of Molecular Cascades in Human brain Aging:Insight from the canine model to promote successful Aging. Progress in Neuro-Phychopharmacology & Psychiatrics (24):777-786

Head, E., Torp. R.(2002[1]) Insights into Aβ and Presenilin from a Canine Model of Human Brain Aging. Neurobiology of Disease (9): 1-10

Head, E., Liu.J., Hagen,T.M., Muggenburg,B.A., Milgram,N.W., Ames,B.N., Cotman, C.W.(2002[2]) Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. Journal of Neurochemistry. 82 (2):375-381

Head, E., Milgram,N., Cotman,C.(2002[3]) Neuropathology and Cognitive Dysfunction in Aging Dogs. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral Changes in Dogs. 23-26. Orlando. USA.

Henderson, V.W., Paganini-Hill, A., Emanuel, C.K., Dunn, M.E., Buckwalter, J.G. (1994). Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. Archives of Neurology. (9):896-900

Hendriks, L., van Duijn, CM., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, MG., Antonarakis, SE.; Martin. JJ. (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. Nature Genetics. (3):218-221

Hershko, A., Ciechanover, A., Varshavsky, A. (2000). The ubiquitin system. Nature Medicine. (6): 1073-1081

Hineno, T., Mizobuchi, M., Hiratani, K., Inami, Y., Kakimoto, Y. (1992). Disappearence of circadian rhythms in Parkinson's disease model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in dogs. Brain Researh. (580)(1-2): 92-99

Hirai, T., Kojima, S., Shimada, A., Umemura, T., Sakai, M., Itakura, C. (1996) Age-related changes in the olfactory system of dogs. Neuropathology and Applied Neurobiology. (6):531-539

Hirtz, D., Thurman, D.J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R., Zalutsky, R. (2007) How common are the "common" neurologic disorders. Neurology. (5):326-337

Honavar, M., Meldrum, B.S. (2002). Epilepsy. *in* Greenfield's Neuropathology.(7Th Ed.) Graham, D.I. et Lantos, P.L. Arnold, London.UK.

Hou, Y., White R.G., Bobik M., Marks J.S., Russell MJ., (1997). Distribution of beta-amyloid in the canine brain. Neuroreport. (4):1009-10012

Hulland, T. J. (1993). Muscle and Tendon. *In* Pathology of Domestic animals. 4th Edition. Volume 1. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. Academic Press.183-189

Hung, C., Davison, E.J., Robinson, P.A., Ardley, H.C.(2006) The aggravating role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative disease. Biochemical Society Transactions. (5):743-745

Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T., Irizarry, M.C. (2004) Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain.
Neurology. (6):925-931

Ingram D. K.,Wiliams N.(2002) Neurobiology of Cognitive Dysfunction Syndrome in Dogs. Clinical and Nutricional Management of Senior Dogs and Cats. (WSAVA).

Ishihara,T.,Gondo,T.,Takahashi,M., Uchido,F., Ikeda,F., Allsop,D., Imai, K. (1991) Immunohistochemical and immunoelectron microscopical characterization of cerebrovascular and senile plaque amyloid in aged dog's brains. Brain Research. (1-2):196-205

Ivins, KJ., Bui, E.T., Cotman, C.W. (1998) Beta-amyloid induces local neurite degeneration in cultured hippocampal neurons: evidence for neuritic apoptosis. Neurobiology of Disease. (5):365-78.

Joachim, CL., Duffy, LK., Morris, JH., Selkoe, DJ.(1988). Protein chemical and immunocytochemical studies of meningovascular beta-amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging. Brain Reserch. (1):100-111

Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R., Little, SP.(1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. Molecular Brain Research. (4):299-305

Johnston, J.A., Ward, C.L., Kopito, R.R.(1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. The Journal of Cell Biology. (7):1883-1898

Jolly, R.D., Janmaat, A.,West, D.M., Morrison, I.(1980) Ovine ceroid-lipofuscinosis: a model of Batten's disease. Neuropathology and Applied Neurobiology. (3):195-200

Jolly, R. D.,Martinus, R. D., Shimada,A., Fearnley I .M., Palmer, D. N.(1990) Ovine ceroid-lipofuscinosis is a proteolipid proteinosis. Canadian Journal of Veterinary Research. (1): 15–21

Jolly, R.D., Gibson, A.J., Healy, P.J., Slack, P.M., Birtles, M.J.(1992). Bovine ceroid-lipofuscinosis: pathology of blindness. New Zealand Veterinary Journal. (3):107-111

Kalimo, H., Kaste,M., Haltia, M. (2002).Vascular Diseases *in* Greenfield's Neuropathology. (7Th Ed.) Graham, D.I. et Lantos, P.L., Arnold, London. UK.

Kamiya, S., Suzuki, Y.(1989). Polyglucosan bodies in the brain of the cat. Journal of Comparative Pathology. (3):263-267-Abstrat

Kamiya, S., Suzuki, Y.;Daigo, M. (1990) Immunoreactivity of canine and feline polyglucosan bodies for monoclonal antibody against human polyglucosan. Acta Neuropathologica. (81):217-218

Kamiya,S., Suzuki, Y., Daigo, M.(1991) Polyglucosan bodies in the central nervous system of a fox. Journal of Comparative Pathology. (4):467-477

Keller, E.T., Madewell, B.R. (1992). Locations and types of neoplasms in immature dogs: 69 cases. Journal of the American Veterinary Medical Association.(10):1530-1532

Kent, M., Delahunta, A., Tidwell, A.S.(2001). MR imaging findings in a dog with intravascular lymphoma in the brain. Veterinary Radiology & Ultrasound. (6):504-510

Kiatipattanasakul, W., Nakaruma, S., Hossain, M.M., Nakkayama, H., Uchino, T., Shumuya, S., Goto, N., Doi, K.(1996). Apoptosis in aged dog brain. Acta Neuropathologica. (92):242-248

Kimotsuki, T., Nagaoka, T., Yasuda, M., Tamara, S., Matsuki, N., Ono, K. (2005) Changes of magnetic resonance imaging on the brain in Beagle dogs with aging. Journal of Veterinary Medical Science. (10):961-967

Kline, K. (2001). Neuromuscular Disorders. *In* Atlantic Coast Veterinary Conference. visitado em www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00232.htm. em 20-11-2007

Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. Journal of Cell Science. (1):7-18.

Knopman, D.S.(1998).The initial recognition and diagnosis of dementia. American Journal of Medicine. 104(4A): 39S-42S

Koestner, A., Bilzer, T., Fatzer, R., Schulman, F.Y., Summers, B.A., Winkle, T.J. (1999).Histological Classification of Tumours of the Nervous System of Domestic Animals.Second Series. Volume V. Published by Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. Washington, DC.

Kreutzberg, G.W., Blakemore, W.F., Graeber, M.B. (2002). Cellular pathology of the central nervous system. *In* Greenfield's Neuropathology. .(7Th Ed.) Graham, D.I., Lantos, P.L., Arnold, London.UK.

Kumar-Singh, S., De Jonghe, C., Cruts, M., Kleinert, R., Wang, R., Mercken, M., De Strooper, B., Vanderstichele, H., Lofgren, A., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Kroisel, P. M. & Van Broeckhoven, C. (2000). Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a gamma (42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. Human Molecular Genetics. (9):2589-2598

Kuusisto,J., Koivisto, K., Kervinen, K., Mykkanen, L., Helkala, E.L., Vanhanen, M., Hanninen, T., Pyorala, K., Kesaniemi, Y.A., Riekkinen, P., Laasko, M. (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. BMJ Journals. (309):636-638

Kuzniecky, R.I., Barkovich, A.J.(2001). Malformations of cortical development and epilepsy. (23): 211

LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C., Jay, G.(1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. Nature Genetics. (1):21

Landsberg, G., Ruehl W.(1997). Geriatric behavioral problems. The Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice. (6):1537-1559

Landsberg, G. (2002). Behavior and Brain Aging. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral Changes in Dogs. 23-26. Orlando.USA

Landsberg, G. Araújo, J.A. (2005). Behavioral problems in geriatric pets. The Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice. (3):675-698

Latorre, R., Gil, F., Vazquez, J.M., Moreno, F., Mascarello, F., Ramirez, G.(1993). Skeletel muscle fibre types in the dog. Journal of Anatomy.(182): 329-337

Leigh, P.N., Anderton, B.H., Dodson, A., Gallo, J.M., Swash, M., Power,D.M.(1988) Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. Neuroscience Letters. (93):197-203

Littman, M.P., Robertson, J.L., Bovée, KC.(1988) .Spontaneous systemic hypertension in dogs: five cases. J Am Vet Med Assoc. (4):486-494

Litman, M.P.(1994). Spontaneous systemic hypertension in 24 cats. Journal of Veterinary International Medicine. (8): 79-86

Long,S. (2006).Neoplasis of the Nervous System. Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment, Vite, C.H. International Veterinary Information Service, www.ivis.org). Ithaca, New York, USA.

Mahy, N., Bendahan, G., Boatell, M.L., Bjelke, B., Tinner, B., Olson, L., Fuxe, K.(1995) Differential brain area vulnerability to long-term subcortical excitotoxic lesions. Neuroscience.(1):15-25.

Mandara, M.T.(2003). Meningeal blood vessel calcification in the brain of the cat. Acta Neuropathologica. (105): 240-244

Manetto,V., Perry,G., Tabaton, M., Mulvihill, P., Fried, V. A., Smith, H., Gambetti, P., Gambetti, L.A.(1988) Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases. Proceedings of the .National Academy of Sciences. USA (85):4501-4505

Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer´s disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. The EMBO Journal. (4):2757-2753

Mattson, M.P., Chan, S.L. (2001). Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. Journal of Molecular Neuroscience. (2):205-224

Mattson, M.P., Duan, W., Pedersen, W.A.,Culmsee, C. (2001^2) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. Apoptosis. (1-2):69-81

Mattson, M.P. (2002). Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. Journal of Neurovirology. (6): 539-550

Mercado, M., Toledo, S.M., Alvarez, A.,Ontiveros, M.L., Graziotti, G. (2003). Valoración anatómica, histológica, tomografia y ultrasonográfica del músculo vasto lateral en caninos sanos. Revista InVet. (5):45-54

McDonough, S.P., Van Winkle, T.J., Valentine, B.A., vanGessel, Y.A., Summers, B.A. (2002). Clinicopathological and immunophenotypical features of canine intravascular lymphoma malignant angioendotheliomatosis. Journal of Comparative Pathology. (4):277-288

McKhann, G., Grachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology. (7): 939-944

Milgram, N.W., Head,E., Weiner,E., Thomas, E. (1994) Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspacial visual tasks. Behaviour Neuroscience.(108):57-68

Minamoto, V.B. (2005). Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão. Fisioterapia e Pesquisa. (3): 50-55

Minatel, L., Underwood, S.C., Carfagnini, J.C.(2000) Ceroid-Lipofuscinosis in a Cocker Spaniel Dog. Veterinary Pathology. (37):478-490

Mizutani, T., Amano, N., Sasaki, H., Morimatsu, Y., Mori, H., Yoshimura, M., Yamanouchi, H., Hayakawa, K., Shimada, H.(1990) Senile dementia of Alzheimer type characterized by laminar neuronal loss exclusively in the hippocampus, parahippocampus and medial occipitotemporal cortex. Acta Neuropathologica. (6):575-580

Miyawaki, K., Nakayama, H. (2001) Three-dimensional structures of canine senile plaques. Acta Neuropathologica. (102):321-328

Miyawaki, K., Nakayama, H., Matsuno, S., Tamaoka, A., Kunio, D. (2002). Three-dimensional and fractal analyses of assemblies of amyloid β protein subtypes (Aβ40 and Aβ40(42)) in canine senile plaques. Acta Neuropathologica. (103):228-236

Montoya. J.A., Morris, P.J., Bautista, I., Juste, M.C., Suarez, L., Peña,C., Hackett, R.H., Rawlings, J. (2006). Hypertension: A risk factor associated with weight status in dogs. Americam Society for Nutrition. Journal Nutrition. (136): 2011-2013

Morrys, J., Narkiewicz, O., Maciejewska, B., Wegiel,J., Wisniewski,HM.(1994) Amyloid deposits and loss of neurones in the claustrum of the aged dog. Neuroreport.(5): 1825-1828

Mortimore, G.E., Poso, A.R., Lardeux, B.R.(1989) Mechanism and regulation of protein degradation in liver. Diabetes Metabolic Reviews. (3):320

Mosier, J.E. (1989). Effect of aging on body systems of the dog. Veterinary Clinics of North American. Small Animal Practice. 19(1):1-12

Mrak, R.E., Sheng, J.G., Griffin, W.S. (1996) Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.(3):273-279

Münch, G., Gasic-Milenkovic, J., Dukic-Stefanovic, S., Kuhla, B., Heinrich, K., Riederer, P., Huttunen, H.J., Founds, H., Sajithlal, G.(2003). Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells. Exp Brain Res.150 (1):1-8.

Nakaruma, S., Nakayama, H., Kiatipattanasakul, W., Uchida, K., Uetasuka, K., Got, N,(1996). Senile plaques in very aged cats. Acta Neuropathologica. (91): 437-439

Nakaruma, S., Tamaoka, A., Sawamura,N., Kiatipattanasakul,W., Nakayama, H., Shoji, S., Yoshikawa,Y., Doi, K.(1997) Deposition of amyloid beta protein (A beta) subtypes(a beta 40 and beta 42) in canine senile plaques and cerebral angiopathy. Acta Neuropathologica.(94):323-328

Nakayama, H., Uchida, K., Doi, K. (2004). A comparative study of age-related brain pathology – are neurodegenerative diseases present in nonhuman animals? Medical Hypotheses.(63):198-202

Näslund, Haroutunian,V., Mohs, R., Davis, K.L.,Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D.(2000) Correlation Between Elevated Levels of Amyloid -Peptide in the Brain and Cognitive Decline..(283):1571-1577

Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, D., Ruhel, W. (2001) Prevalence of behavioural changes associated with age –related cognitive impairment in dogs. Journal of American Veterinary Medical Association.(218): 1787-1791

Nelson, R.W. Couto, C.G. (1998). Disorders of Peripheral Nerves and the Neuromuscular Junction. *In* Small Animal Internal Medicine. Second Edition. Cap.73.1052-1053

Nishio, S., Moriaoka, T., Kawamura, T., Fukui, K., Nonaka, H., Matsushima, M. (2001). Corpora Amylacea Replace the hippocampal pyramidal cell layer in a pacient with temporal lobe epilepsy. Epilepsia. (42):960-962

Nishiyama, E., Iwamoto, N., Ohwada,J., Arai, H.(1996) Distribution of Apoliprotein E in senile plaques in brains with Alzheimer's disease: investigartion with the confocal laser scan microscope. Brain Research. (750):20-24

Okuda, R., Uchida,K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama, H.(1994) The distribution of amyloid beta precursor protein in canine brain. Acta Neuropathologica. (87): 161-167

Olby, N.(2005). Doenças Degenerativas de início adulto em cães e em gatos. Veterinary Medicine. Maio/Junho. 55-56

Oppenheimer, D.R., Esiri, M.M. (1992) Diseases in basal ganglia, cerebellum and motor neurons. *In* Adams JH, Duchen LW- Greenfield's Neuropathology, 5th edn. Arnold, London. 1005-1007

Oster, S., Reske-Nielsen, E., Bruun, I.(1988). Lafora's disease and brain calcifications. Acta Neuropathologica. (76):532-538

Overmyer, M.(2002). Gliosis in relation to Alzheimer's hallmark in aging and Alzheimer's disease. A postmorten immunohistochemical study. Doctoral dissertation. 19-20

Paganini-Hill1, A.,Henderson, V.W. (1994). Estrogen Deficiency and Risk of Alzheimer's Disease in Women. American Journal of Epidemiology Vol.(140): 256-261

Palmer, D.N., Oswald, M.J., Westlake, V.J., Kay, G.W. (2002). The origin of fluorescence in the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease) and neuron cultures from affected sheep for studies of neurodegeneration. Archives of Gerontology and Geriatrics. (34):343-357

Papaioannou, N., Tooten, P.C., van Ederen, A,M., Bohl, J.R., Rofina, J., Tsangaris,T., Gruys, E.(2001) Immunohistochemical investigation of the brain of aged canine dogs.I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4 –hydroxynonenal protein,an oxidative damage product in senile plaques. Amyloid (8): 11-21

Parker, A.L. (1995). Behavioral signs of organic disease. *In* Ettinger S.J., Feldmen, E.C.;Eds. Texbook of Veterinary Internal Medicine.Philadelphia: WB. Saunders Company. 175-178

Patronek, G.J., Wasters, D.J., Glickman, L.T. (1997) Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. Journal of Gerontology. American Biological Medical Science. (3):171-178

Petegnief, V., Saura, J., Dewar, D.; Cummins, D.J., Dragunow, M., Mahy, N. (1999). Long-term effects of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and 6-nitro-7-sulphamoylbenzo(f)quinoxaline-2,3-dione in the rat basal ganglia: calcification, changes in glutamate receptors and glial reactions. Neuroscience. 94(1):105-115.

Pietranera, L., Saravia, F., Gonzalez Deniselle, M.C., Roig, P., Lima, A., De Nicola, A.F. (2006). Abnormalities of the hippocampus are similar in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats and spontaneously hypertensive rats. Journal of .Neuroendocrinology. (6):466-74

Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by ß-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. Journal of Neuroscience. (13):1676-1687

Pirim, I. (1998). Characterisation of polyclonal antiserum against ubiquitina and its use in the investigation of ubiquitina conjugate distribution in normal and stressed 3T3- LI cells.Trends . Journal of Medical Sciences. (28): 583-589

Podlisny, MB, Tolan DR, Selkoe DJ.(1991). Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. American Journal of Pathology. (6):1423-1435

Prior, R., D. Urso, D., Frank, R., Prikulis, I., Pavlakovic, G.(1996). Loss of vessel wall viability in cerebral amyloid angiopathy. Neuroreport. (2):562-564

Przedborski, S.(2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. Parkinsonism and Related Disorders. (11): S3-S7

Pugliese, M., Carrasco, J.L., Geloso, M.C., Mascort, J., Michetti, F., Mahy, N. (2004) Gamma-aminobutyric acidergic interneuron vulnerability to aging in canine prefrontal cortex. Journal of Neuroscience Research. (6):913-920

Pugliese, M., Geloso, M.C., Carrasco, J.L., Mascorte, J., Michetti, F., Mahy, N.(2006). Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100β – astrocytosis but not with insulin cerebrospinal. Acta Neuropathologica. (111):519-528

Pugliese, M., Mascort, J., Mahy, N., Ferrer,I., (2006[2]). Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated process in aged dogs with behavioral deficits. Acta Neuropathologica. (112):175-183

Pugliese, M., Gangitano, C., Ceccariglia, S., Carrasco, J.L., Del Fa, A., Rodriguez, M.J.,Michetti, F., Mascort, J., Mahy, N. (2007). Canine cognitive dysfunction and cerebellum: Acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. Brain Research. (1139):85-94

Ramonet, D., Pugliese, M., Rodríguez, M., Yebra, L., Andrade, C., Adroer, R., Ribalta, T., Mascort, J., Mahy, N.(2002) Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases. Journal of Physiology (96):307-312

Reynolds, G.P., Garrett, N.J. (1986).Striatal Dopamine and Homovanillic Acid in Huntington´s Disease. Journal of Neural Transmission. (65): 151-155

Renkawek, K., Vooter, C.E., Bosman, G.J., Workum, F.P., Jong, W.W. (1994) Expression of alpha β-crystallin in Alzheimer's disease. Acta Neuropathologica. (2): 155-160

Riga, D., Riga, S., Halalau, F., Schneider, F. (2006) Brain Lipopigment Accumulation in Normal and Pathological Aging. Annals of New York Academy of Sciences.(1067):158-163

Riederer, M.B., Mourton-Gilles, C., Frey, P., Delacourte, A., Probst, A. (2001) Differential phosphorylation of tau proteins during kitten brain development and Alzheimer's disease. Journal of Neurocytology . (30): 145-158

Ritchie, K., Lovestone, S. (2002). The dementias. Lancet. (9347):1759-1766

Rossmeisl, J.H., Duncan, R., Fox, J., Herring, E.S., Inzana, K.(2003) Neuronal ceroid-lipofuscinosis in a Labrador Retrivier. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation .(15):457-460

Rodriguez, M.J., Ursu, G., Bernal, F., Cusi, V.,Mahy, N.(2001) Perinatal human hypoxia-ischemia vulnerability correlates with brain calcification. Neurobiology of Disease. (1):59-68

Ruehl, W.W., Entriken, T.L., Muggenburg, B.A., Bruyette, D.S., Griffith, W.C., Hahn, F.F.(1997) Treatment with L-deprenyl prolongs life in elderly dogs. Life Science. (11):1037-1044

Rofina, J.E., van Andel, I., van Ederen, A.M., Papaioannou, N., Yamaguchi, H., Gruys, E. (2003). Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. Amyloid Journal of Protein Folding Disorders. (10):86-96

Rofina, J.E., Singh,K., SkoumalovaVesela, A., Ederen,A., Asten, A., Wilhelm, J., Gruys,E. (2004). Histochemical accumulation of oxidative damage produts is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. Amyloid Journal of Protein Folding Disorders. (11):90-100

Rofina, J.E., Ederen, A., Toussaint, M., Secrève, M., Spek, A., Meer, I., Eerdenburg, F., Gruys, E. (2006). Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer ‘s disease. Brain Research. (1069):216-226

Rofina, J.E., Eerdenburg, F., Gruys, E.(2007). Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. Visitado em www.vetscite.org/publish/articles/000064/article.html em Março 2007

Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E., Ball, M.J.(1993) Beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. (22): 10836–10840

Russel, M., White, R., Patel, E., Markesbery, W., Watson, C.R., Geddes, J.W.(1992) Familial influence on plaque formation in the beagle brain. Neuroreport. (3): 1093-1096

Russel, M.J., Bobik, M., White, R.G., Hou,Y., Benjamin, S.A., Geddes, J.W. (1996). Age specific onset of beta-amyloid in beagle brains. Neurobiology of Aging (17):269:273

Satou, T., Cummings, B.J., Head, E., Nielson, K.A., Hahn, F.F., Milgram, N.W., Velazquez, P., Cribbs, D.H., Tenner, A.J., Cotman, C.W.(1997) The progression of β-amyloid deposition in the frontal cortex of the aged canine. Brain Research (774):35-43

Schipper, H.M., (1996). Astrocytes, brain aging, and neurodegeneration. Neurobiology of aging. (17):467-480

Schlesinger, D.H., Goldstein, G., Niall, H.D. (1975). The complete amino caid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclise stimulating polypeptide probably universal in living cells. Biochemistry. (10): 2214-2218

Schmith, M., Hanna, J., Elsasser, S., Finley, D.(2005) Proteosoma –associated proteins: regulation of a proteolytic machine. Journal of Biological Chemistry. (8): 725-737

Selkoe, D., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L., Cork, L.C.(1987) Conservation of brain amyloid in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. Science. (20): 873-877

Selkoe, D.J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews. (2):741-766

Skoumalova, A., Rofina, J., Schwippelova, Z., Gruys, E.,Wilhelm, J.(2003). The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. Experimental Gerontology. (6):711-719

Shapira, R., Austin, G.E., Mirra, S.S.(1988) Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized. Journal of Neurochemistry. (1):69-74

Shimada, A., Kuwamura, M.,Umemura, T., Takada, K., Ohama, E., Itakura, C.(1991) Modified Bielschowsky and immunohistochemical studies on senile plaques in aged dogs. Neuroscience Letter. (1):25-28

Shimada, A., Kuwamura, M., Awakura, T., Umemura, T., Takada, K., Ohama, E. Itakura,C. (1992) Topographic relationship between senile plaques and cerebrovascular amyloidosis in the brain of aged dogs. Journal of Veterinary Medical Science.(1):137-144

Shimada, A., Kuwamura, M., Awakura, T., Umemura, T., Itakura,C. (1992[2]). An immunohistochemical and ultrastructural study on aged-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. Journal of Veterinary Medical Science. (1): 29-36

Shull, E.A. (2002) Neurologic Desorders in Aged Dogs. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral. Changes in Dogs.17-19. Orlando. USA

Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G.(1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A. (1):316-321

Silva, A.V., Cavalheiro, E.A. (2004). Epilepsia: uma janela para o cérebro. A Mente Humana. (3).

Singhrao, S.K., Neal, J.W., Newman, G.R. (1993) Corpora Amylacea could be an indicator of neurodegeneration. Neuropathology and Applied Neurobiology. (3): 269-276

Singhrao, S.K., Morgan, B.P., Neal, J.W., Newman, G.R.(1995) A functional role for corpora amylacea based on evidence from complement studies. Neurodegeneration. (3): 335-345

Siwak, C.T., Tapp, P.D., Milgram, N.W. (2002). Behavioral Correlates of Age-Associated Cognitive Changes in Dogs. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral Changes in Dogs. 20-21. Orlando.USA

Siwak-Tapp, C.T., Head, E., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Cotman, C.(2006) Region Specif neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. Neurobiology of Aging. (1):39-50

Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, AK., Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. Purchase Biochimica et Biophysica Acta. (1502): 139-144

Smith, D.E., Rapp, P.R., McKay, H.M., Roberts, J.A., Tuszynski, M.H. (2004) Memory impairment in aged primates is associated with focal death of cortical neurons and atrophy of subcortical neurons. Journal of Neurosciences. (18):4373-4381

Snow, D.H., Billeter, R., Mascarello, F., Carpene, E., Rowlerson, A., Jenny, E. (1982). No classical type IIB in dog skeleteal muscle. Histochemistry.(1): 53-65

Slayter, M.V., Summers, B.A., Meade, R.P., Anderson, C.A. (1998). Axonal Spheroids in the Cochlear Nucleus of Normal Beagle Dogs. Veterinary Pathology. (35):150-153

Snyder, J.M., Shofer, F.S., Van Winkle, T.J., Massicote, C. (2006). Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 cases. Journal of Veterinary Internal Medicine. (3): 669-675

Soltysiak, Z. (1985). Comparative pathomorphology of senile lesions in the central nervous system of dogs from rural, urban and industrial environments.Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej We Wroclawiu, Weterynaria.(42):249-271

Spillantini, M.G., Goedert, M.(1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. Trends Neuroscience. (10):428-433

Struble, A.L., Feldman, E.C., Nelson, R.W., Kass, P.H. (1998). Systemic Hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus. Journal of American Veterinary Medical Association. (6):822-825

Studzinski, C., Araujo, J., Milgram, N. (2005) The canine model of human cognitive aging and dementia: Pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. (29): 489-498

Su, M., Head E., Brooks, W., Wang, Z., Muggenburg, B., Adam, A., Sutherland, R., Cotman, C.W., Nalcioglu, O. (1998) Magnetic Resonance Imaging of Anatomic and Vascular Characteristics in a Canine Model of Human Aging. Neurobiology of Aging. (19):479-485

Su, M., Head, E., Muggenburg, B., Chiou, Jr-Y., Wang, Z., Brooks, W., Lee, O., Cotman,C.W., Nalcioglu, O.(2002) MRI Measurement of changes in the aging canine brain. Simposium of Brain Aging and Related Behavioral Changes in Dogs. 13-16 Orlando. USA

Su, M.A, Tapp, P.D., Vu, L., Chu, Y., Muggenburg, B., Chiou, Jr-Y.;Chen, C., Wang, J., Bracco, C., Head, E.(2005) A longitudinal study of brain morphometrics using serial magnetic resonance imaging analysis in a canine model of aging. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. (29):389-397

Sugiyama, H., Hainfellner, J.A., Lassmann, H. Indravassu, S., Budka, H. (1993) Uncommon types of polyglucosan bodies in the human brain: distribution and relation to disease. Acta Neuropathologica. (86):484-490

Summers, B.A., Cummings, J.F., de Lahunta, A. (1995) Neuropathology of Aging. Veterinary Neuropathology.Vol.316. Mosby -Year Book, St. Louis, MO.

Suzuki, Y., Akiyama, K., Su,S. (1978) Lafora-like inclusion bodies in the CNS of aged dogs. Acta Neuropathologica. (44):217-222

Suzuki, Y., Ohta, K., Suu, S. (1979) Correlative studies of axonal spheroids and Lafora-like bodies in aged dogs. Acta Neuropathologica. 48(1):77-81

Suzuki, Y., Ohta, K., Kamiya, S., Suu, S. (1980) Topographic distribution pattern of Lafora-like bodies in the spinal cord of some animals. Acta Neuropathologica. (2):159-161

Syme, H.M, Barber, P.J., Markwell, P.J., Elliott,J. (2002). Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation. Journal of the American Veterinary Medical Association. (220): 1799-1804

Tacconi, M.T. (1998) Neuronal Death: Is there a role for astrocytes? Neurochemical Research. (23):759-765

Tanna, N.K., Kohn, M.I., Horwich, D.N., Jolles, P.R., Zimmerman, R.A., Alves, W.M., Alavi, A. (1991). Analysis of brain and cerebrospinal fluid volumes with MR imaging: impact on PET data correction for atrophy. Part II. Aging and Alzheimer dementia. Radiology. (1):123-130

Tapp, P.D., Siwak, C.T., Gao, F.Q., Chiou, J.Y., Black, S.E., Head, E., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., Milgram, N.W., Su, M.Y. (2004). Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. Journal of Neuroscience. (22): 8205–8213.

Tapp, P.D., Head, K., Head, E., Milgram, N.W. (2006) Application of an automated voxel-based morphometry technique to assess regional gray and white matter brain atrophy in a canine model of aging. NeuroImage (29): 234-244

Tayebati, S., (2006) Animal models of cognitive dysfunction. Mechanisms of Aging and Development. (127):100-108

Tekirian, TL., Cole, GM., Russell, MJ., Yang, F., Wekstein, DR., Patel, E., Snowdon, DA., Markesbery, W.R., Geddes, JW. (1996). Carboxy terminal of beta-amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. Neurobiology of Aging. (2):249-57

Terman, A. (2001) Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage? Redox Report. (1): 15.26

Tidwell, A.S., Ross, L.A., Kleine, L.J. (1997) Computed tomography and magnetic resonance imaging of cavernous sinus enlargement in a dog with unilateral exophthalmos. Veterinary Radiology & Ultrasound. (5):363-370

Togo, T., Iseki, E., Maurai, W., Akiyama, H., Uéda, K., Kosaka, K.(2001).Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. Journal of Neurological Sciences.(184): 71-75

Torp, R., Head, E. (2000[1]) Ultrastructural evidence of fibrillar B-amyloiid associated with neuronal membranes in behaviourally characterized aged dog brains. Neuroscience. (96): 495-506

Torp, R., Head, E., Cotman, C.W. (2000[2]). Ultrastructural analyses of β-amyloid in the ages dog: neuronal β-amyloid is localized to the plasma membrane. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. (24):801-810

Uchida, K., Miyauchi, Y., Nakayama, H., Goto, N.(1990). Amyloid angiopathy with cerebral haemorrhage and senile plaque in aged dogs. Nippon Juigaku Zasshi. (3):605-611

Uchida, K., Nakayama, H., Goto, N. (1991) Pathological studies on cerebral amyloid angiopathy, senile plaques and amyloid deposition in visceral organs in aged dogs. Journal of Veterinary Medical Science. (6):1037-1042

Uchida, K., Tani, Y., Uetsuka, K., Nakayama, H., Goto, N. (1992) Immunohistochemical studies on canine cerebral amyloid angiopathy and senile plaques. Journal of Veterinary Medical Science. (4):659-67

Uchida, K., Kuroki, K., Tomoko, Y., Yamaguchi, R., Tateyama, S.(1997) Immunohistochemical study of constituents other than β-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. Acta Neuropathologica. (93):277-284

Uchida, K., Kihara, N., Hashimoto, K.,Nakayama, H., Yamaguchi, R., Tateyama, S., (2003) Age-Related Histological Changes in the Canine Substantia Nigra. Journal of Veterinary Medical Science (65):179-185

Uno, H., Alsum, P.B., Dong, S., Richardson, R., Zimbric, ML., Thieme, CS., Houser, WD. (1996) Cerebral amyloid angiopathy and plaques, and visceral amyloidosis in aged macaques. Neurobiology of Aging. (2):275-81

Upadhya, S.C., Hegde, A.D.(2005). Ubiquitin-proteosome pathay components as therapeutic targets for CNS maladie. Current Pharmaceutical Design. (29):3807-3828

van der Flier, W.M., Middelkoop, H.A., Weverling-Rijnsburger, A.W., Admiraal-Behloul, F., Bollen, E.L., Westendorp, R.G., van Buchem, M.A. (2005) Neuropsychological correlates of MRI measures in the continuum of cognitive decline at old age. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders. (2-3):82-88

Vandervoort, A.A. (2002). Aging of the human neuromuscular system. Muscle & Nerve. (25): 17-25

Vehmas, A.K., Kanas, C.H., Stewart, W.F., Troncoso, J.C. (2003). Immuno reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. Neurobiology of aging. (24): 321-331

Vinters, H.V., Wang, Z.Z., Secor, D.L. (1996) Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer's disease. Brain Pathology. (2):179-195

Vleet, J. V. (1997). Skeletal muscle. *In* Veterinary Pathology. 6th edition. Cap. 18. Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. Copyrigth. Williams & Wilkins. 873-874

Walker, L.C. (1997) Animal models of cerebral β-amyloid angiopathy. Brain Research Reviews. (25):70-84

Wegiel, J., Wisniewski, H., Dziewiatkowski, J., Tarnawski, M., Nowakowski, J., Dziewiatkowska, A., Soltysiak, Z. (1995) The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. Brain Research (705):225-234

Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Dziewiatkowski, J., Tarnawski, M., Dziewiatkowsk, A., Morys, J., Soltysiak,,Z., Kim, K.S. (1996). Subpopulation of dogs with severe brain parenchymal β-amyloidosis distinguished with cluster analysis. Brain Research (728):20-26

Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Soltysiak, Z.(1998). Region and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. Brain Research. (1-2):259-266

White, L., Petrovitch, H., Ross, G.W., Masaki, K.H., Abbott, R.D., Teng, E.L., Rodriguez, B.L., Blanchette, P.L,, Havlik, R.J,, Wergowske, G., Chiu, D., Foley, D.J., Murdaugh, C., Curb, J.D.(1996). Prevalence of dementia in older Japanese-American men in Hawaii: The Honolulu-Asia Aging Study. The journal of the American Medical Association.(12):955-960

Wilson, J.W., Greene, H.J., Leipold, H.W. (1975). Osseous metaplasia of the spinal dura mater in a Great Dane. Journal of the American Veterinary Medical Association. (1):75-77

Wisniewski, H.M., Wen, G.Y., Opitz, J.M., Reynolds, J.F., Pullakat, R.K.(1987) Lipopigment in the aging brain. American Journal of Medical Genetics. (31):183 - 191

Wisniewski, T., Lalowoski, M., Bobit, M., Russel, M., Strosznajders, J., Frangione, B.(1996) Amyloid β 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. Biochemical Journal.(313):575-580

Wilhelm, J., Herget, J.(1999) Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the fluorescent end-products of lipid peroxidation. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. (6):671-681

Wolf, D.H., Hilt, W. (2004). The proteasome: aproteolytic nanomachine of cell regulation and wasrw disposal. Biochimica et Biophysica Acta. (1695): 19-31

Wóznicka,A., Malinowska,M., Kosmal,A. (2006) Cytoarchitectonic organization of the entorhinal cortex of the canine brain. Brain Research Reviews. (52) 346-367

Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Lemere, CA., Frosch, M.P., Selkoe, D.J.(1992) Beta amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. American Journal of Pathology. (1):249-259

Yamanami, S., Ishihara, T., Takahashi, M., Uchino, F. (1992) Comparative study of intraneuronal polyglucosan bodies in brains from patients with Lafora disease and aged dogs. Acta Pathologica Japonica. (11):787-792
Yanai, T., Masegi, T., Iwanaka, M., Yoshida, K., Ueda, K., Suzuki, Y., Kamiya, S. (1994). Polyglucosan bodies in the brain of a cow. Acta Neuropathologica. (1):75-77

Yanai, T., Masegi, T., Ishikawa, K., Sakai, H., Iwasaki, T., Moritomo, Y., Goto, N.(1996). Spontaneous vascular mineralization in the brain of horses. Journal of Veterinary Medical Sciences. (1):35-40

Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Gied, G., Meng, E., Cohen, F., Kunz, I., Weisgraber, K., Mahley, R. (2005). Apolipoprotein (apo)E4 enhances amyloid β peptide production in cultured cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. Proceedings of the National Academy of Sciences. (51):18700-18705

Yokota, T., Ishihara, T., Kawano, H., Yamashita, Y., Takahashi, M.; Uchino, F.; Kamei, T., Kusunose, Y., Yamada, M.; Matsumoto, N. (1987) Immunological homogeneity of Lafora body, corpora amylacea, basophilic degeneration in heart, and intracytoplasmic inclusions of liver and heart in type IV glycogenosis. Acta Pathologica Japonica. (6):941-946

Yoshino, T., Uchida, K., Tateyama, S., Yamaguchi, R., Nakayama H., Goto, N.(1996) A retrospective study of canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. Veterinary Pathology. (33) 2: 230-234

8-ANEXOS

Tabela I- Correspondência entre a idade do cão e do homem em função do peso corporal.

Idade do cão em idade Humana				
Idade	Até 10kg	Entre 11-25kg	Entre 26-45kg	Mais de 46kg
5	36	37	40	42
6	40	42	45	49
7	44	47	50	56
8	48	51	55	64
9	52	56	61	71
10	56	60	66	78
11	60	65	72	86
12	64	69	77	93
13	68	74	82	101
14	72	78	88	108
15	76	83	93	115
16	80	87	99	123
17	84	92	104	Números a vermelho =sénior Números a azul = geriátrico
18	88	96	109	
19	92	101	115	
20	96	105	120	
Tabela desenvolvida por Dr. Fred L. Metzger, DVM, State College, PA. (Pfizer Animal Health).				

Tabela II- Questionário

Identificação do animal
Nome:_____ Raça :_____; Peso_____ Idade_____
Sexo: M ☐ ☐

CHAVE: NÃO=0; SIM: 1=fraco; 2=moderado; 3=severo	**NÃO**	**SIM**	**QUANDO?**
A- Confusão, Conhecimento, Orientação espacial: Perde-se em locais conhecidos? Não contorna objectos? Vai de encontro a portas? É menos responsivo a estímulos?			
B- Comportamento Social: Diminui o interesse por brincadeiras? Já não felicita o dono e conhecidos? Alterações ou problemas com a hierarquia social? Tornou-se mais dependente ou mais carente?			
C1- Actividade aumentada ou repetitiva: Espantado, olhar fixo, ou partir objectos? Aumento da Vocalização? Aumento do apetite? Lambe o dono ou objectos? Vagueia com intenção de guardião?			
C2- Actividade diminuída (apatia): Diminuição da exploração ou actividade? Diminuição na resposta a estímulos? Diminuição nos cuidados próprios? Apetite diminuído ou desinteresse?			
D- Ansiedade ou aumenta da irritabilidade: Ansiedade por separação? Impaciente ou agitado? Aumento da irritabilidade?			

CHAVE: NÃO=0; SIM: 1=fraco; 2=moderado; 3=severo	**NÃO**	**SIM**	**QUANDO?**
E- Ciclo sono/ alerta (horário nocturno e inverter o dia): Agitação do sono ou acordar de noite? Aumento do tempo sono durante o dia?			
F1- Aprendizagem e Memória (eliminação de fezes e urina): Urina ou defeca dentro de casa em vários sítios? Vai á rua e depois urina e defeca dentro de casa? Urina ou defeca no local ou no cesto onde dorme? Tem incontinência?			
F2- Aprendizagem e Memória (trabalho , ordens e tarefas): Deterioração da habilidade de trabalho? Dificuldade de reconhecer os donos ou outros cães? Diminuição ou engano de resposta a ordens? Diminuição da habilidade de realizar tarefas? Incapacidade ou diminuição na aprendizagem de novas tarefas?			

Tabela III- Dados Clínicos e de Necrópsia

Animal	Raça	Idade	Sexo	Motivo de eutanásia ou causa aparente de morte	Dados de necrópsia
C1	SRD	10	F	E- desconhecida	Sem lesões
C2	SRD	10	F	E- desconhecida	Desmetocélio; nefrite crónica
C3	SRD	15	F	E- desconhecida	Tumor hepático e mamário;enfarte renal
C4	Pastor Alemão	9	F	E-atropelado	Hemorragias internas
C5	Caniche	7	F	E- desconhecida	Sem lesões
C6	Caniche	13	F	E-sem condições ter cão	Cataratas;nefrite; endocardiose
C7	Pastor Alemão	10	M	E-capturado	Nefrite
C8	SRD	14	M	E-doença não referida	Hemangiosarcoma esplénico com metástases
C9	SRD	10	F	E-capturada	Sem lesões
C10	Perdigueiro	14	F	E-doença não referida	Tumor mamário misto benigno;hiperplasia endometrial com endometrite
C11	SRD	10	F	E-doença não referida	Neoplasia hepática;ulceras gástricas;nefrite crónica
C12	SRD	15	M	E-doença não referida	Cistite poliposa; nefrite; gastrite hipertrófica; tumor biliar
C13	Boxer	10	M	E-tumores pele	Tumores pele; endocardiose verrucosa
C14	SRD	15	F	E- velhice	Gastrite hemorrágica, endocardiose; sarna sarcóptica,cistite
C15	SRD	14	M	E- doença não referida	Tumor esplénico; cardiomiopatia;
C16	SRD	16	M	E-Tumor abdominal	Metastização generalizada tumor abdominal, quisto prostático
C17	SRD	14	M	E- doença não referida	Gastrite hipertrófica; pólipo duodenal
C18	SRD	13	M	E- doença não referida	Hérnia perianal com retroflexão int.grosso; pielonefrite
C19	Caniche	12	F	E- capturado	Distrofia hepática
C20	Caniche	13	M	E- velhice	Neoplasia SNC;endocardiose
C21	Pincher	15	M	E- cegueira	Cataratas;colelitíase;gastrite ulcerativa
C22	SRD	5	M	E-cegueira	Úlcera profuna da córnea
C23	Pequinês	13	M	E- causa desconhecida	Hérnia perianal
C24	SRD	10	M	E-doença naõ referida	Nefrite;quistos prostáticos,endocardiose
C25	SRD	10	M	M- morte súbita	Sem lesões
C26	SRD	12	M	E-doença não referida	Conjuntivite purulenta;nefrose;DAPP
C27	SRD	1	M	E-doença não referida	Sem lesões
C28	Pastor Alemão	15	F	E- doença não referida	Hiperplasia tiróide;epicardite;esclerose renal;cistite;quisto ovárico
C29	Caniche	17	F	E -Falecimento dona	Colelitíase;endocardiose;
C30	Caniche	16	F	E- Falecimento dona	Colelitíase;nódulo biliar;endocardiose
C31	Rottweiler	9	F	M- Rotura gástrica	Rotura Gástrica;fibrose hapática
C32	Boxer	7	M	M- Suspeita Erlchiose	Quadro congestivo- hemorrágico;neoplasia SNC
C33	SRD	11	M	M- Tumor baço	Neoplasia esplénica
C34	Caniche	12	M	M- Ins. Renal	Lipoma;esclerose renal;quistos prostáticos
C35	Pastor Alemão	13	M	E- doença não referida	Neoplasia hepática com metastização;enterite hemorrágica
C36	Boxer	10	M	M- Morte súbita	Hidropericárdio;hipertrofia cardíaca;fígado cardíaco;hemorragias pâncreas
C37	Pequinês	14	F	M-rinite e sinusite	Rinite e sinusite mucopurulenta
C38	Boxer	12,5	F	E-Epilepsia	Neoplasia SNC;
C39	Caniche	14	F	M-Morte súbita	Endocardiose; edema pulmonar;hemorragia base crâneo; colelitíase; nefrite crónica
C40	Rottweiler	8	M	E-Tumor abdominal	Neoplasia disseminada cavidade abdominal(Lipossarcoma)
C41	Perdigueiro	13	M	M-Morte súbita	Hemorragias pâncreas;quisto renal;edema pulmonar

Animal	Raça	Idade	Sexo	Motivo de eutanásia ou causa aparente de morte	Dados de necrópsia
C42	SRD	16	M	E- causa desconhecida	Dilatação impactação gástrica;hepatite;colite ulcerativa
C43	SRD	17	M	E-Diarreia crónica	Hipertrofia unilateral tiróide;hepatite;nefrite
C44	Caniche	13	M	M- causa desconhecida	Enterite hemorrágiaca;endocardiose;nódulo tiróide
C45	SRD	12	F	M-Morte súbita	Obstrução intestinal por coprostase com peritonite;nefrite; endocardiose
C46	SRD	10	M	M- Mordido outro cão	Ferimentos tecidos moles; hemorragias pulmonares.
C47	Caniche	9	M	E- Tetraplegia	Hemorragiana base do cérebro com compressão
C48	Caniche	10	M	M-causa desconhecida	Endocardiose verrucosa
C49	Pastor Alemão	10	F	M-causa desconhecida	Hemangioma cutâneo; carcinoma mamário; leiomiomas uterinos
C50	Pequinês	13	M	M-peritonite	Peritonite,enterite necrosante;endocardiose;enfarte renal
C51	SRD	15	M	M-Vómitos	Gastrite hemorrágica
C52	Pequinês	18	M	M-velhice	Cardiomiopatia dilatada;hipertrofia prostática assimétrica
C53	Pequinês	12	F	M-tumores mamários	Endocardiose; ovários poliquisticos; tumor mamário
C54	Boxer	13	M	E- velhice	Enfartes renais;dilatação cardíaca; aderências serosas
C55	Pincher	16	M	E-causa desconhecida	Esclerose renal; gastrite hemorrágica; endocardiose
C56	Caniche	13	M	E- causa desconhecida	Endocardiose; nefrite
C57	Caniche	12	F	E-causa desconhecida	Endocardiose; hepatite
C58	Pastor Alemão	15	M	M-Morte súbita	Dilatação-torção gástrica
C59	Pincher	??	M	M-Peritonite	Corpo estranho intestino,peritonite
C60	SRD	5	M	M-mordido outro cão	Fractura costelas; fractura pulmão esquerdo; fractura da T7
C61	SRD	2	M	M-Morte súbita	Congestão e edema pulmonar; microhemorragias cerebrais
C62	Rottweiler	2	M	M-Morte súbita	Enfarte miocárdio
C63	Boxer	5	M	M- morte súbita	Enfarte miocárdio
C64	Caniche	5	M	E-Agressiviadae	Sem lesões
C65	SRD	1	F	M-Hemoparasitismo	Quadro hemorrágico generalizado;hepatite
C66	SRD	6	F	M-Morte súbita	Cardiomiopatia dilatada;quadro hemorrágico
C67	SRD	4,5	M	M-Atropelado	Hemorragia interna por lesão hilo renal
C68	SRD	1	M	M-Pneumonia	Pneumonia,gastroenterite hemorrágica
C69	SRD	2	F	M-Esgana	Pneumonia
C70	Malamute	7	M	M- Insuf. Renal	Úlcera gástrica;colite hemorrágica; colelitíase;cistite poliposa;nefrite crónica

M- Morte natural

E- Eutanásia
SRD- Sem Raça Definida

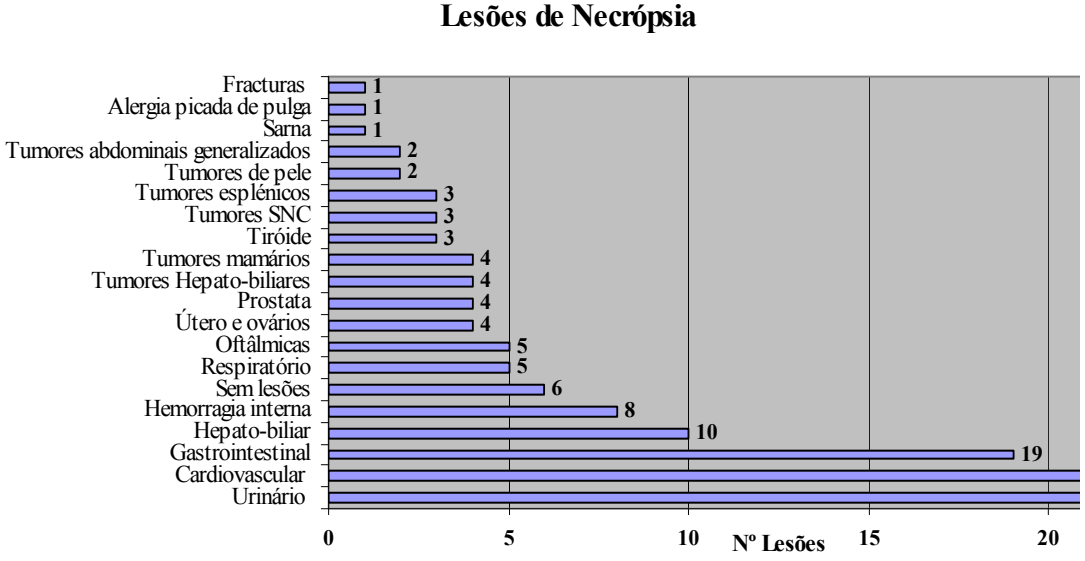


Tabela IV- Resultados Macroscópicos e Histológicos

Cão nº	Raça	Idade	Peso(kg)	Sexo	Idade Lebeau	Idade/peso*	Peso encéfalo(g)	Dil.Ventr.	Fibro.Men.	Calcif.	Hial.Vasc.	Hemorr.	Satelitose	Lipofuscina	C.Amilác.	Esferói.
C1	SRD	10	10	F	56	56	54,00	1	1	0	2	1	2	1	0	0
C2	SRD	10	11	F	56	60	70,00	1	0	0	2	2	2	2	2	1
C3	SRD	15	7	F	76	76	60,00	1	1	0	1	2	1	2	1	1
C4	Pastor Alemão	9	33	F	52	61	98,00	0	1	1	2	3	1	2	0	0
C5	Caniche	7	7	F	44	44	57,10	0	0	0	1	1	1	1	0	0
C6	Caniche	13	8	F	68	68	62,80	0	1	0	2	1	1	2	1	0
C7	Pastor Alemão	10	33	M	56	66	78,30	0	2	0	3	1	2	1	0	0
C8	SRD	14	15	M	72	78	85,90	1	1	3	2	1	1	2	0	0
C9	SRD	10	6	F	56	56	55,10	0	1	2	2	1	2	1	0	0
C10	Perdigueiro	14	20	F	72	78	95,00	0	2	3	2	1	1	1	0	1
C11	SRD	10	19	F	56	60	76,60	0	2	1	2	1	2	1	1	1
C12	SRD	15	12	M	76	83	63,00	1	1	0	3	1	2	2	1	1
C13	Boxer	10	26	M	56	66	94,70	1	1	2	2	1	1	1	0	1
C14	SRD	15	16	F	76	83	82,40	0	1	0	3	2	1	1	0	1
C15	SRD	14	19	M	72	78	87,60	1	2	0	1	1	2	1	1	1
C16	SRD	16	25	M	80	87	90,90	0	1	0	3	1	1	2	1	1
C17	SRD	14	26	M	72	88	90,20	0	2	1	2	1	2	1	2	0
C18	SRD	13	9	M	68	68	64,00	0	1	0	2	1	2	1	0	0
C19	Caniche	12	5	F	64	64	58,50	1	2	1	2	2	1	1	0	1
C20	Caniche	13	8	M	68	68	59,10	1	1	0	2	0	1	1	2	0
C21	Pincher	15	7	M	76	76	48,70	1	1	0	2	0	2	1	0	0
C22	SRD	5	6,5	M	36	36	53,20	0	1	0	1	1	0	1	0	0
C23	Pequinês	13	7	M	68	68	51,80	0	1	0	2	0	1	1	1	0
C24	SRD	10	8	M	56	56	66,90	0	1	0	2	1	1	1	0	0
C25	SRD	10	10	M	56	56	72,80	1	0	1	2	0	1	1	1	0
C26	SRD	12	9	M	64	64	70,40	1	1	1	2	2	2	1	1	0
C27	SRD	1	9	M	15	15	70,90	0	0	2	0	0	0	0	0	0
C28	Pastor Alemão	16	20	F	80	87	90,90	1	1	0	2	2	1	2	2	0
C29	Caniche	17	5,5	F	84	84	50,40	0	1	0	2	2	2	2	0	0
C30	Caniche	16	5,5	F	80	80	48,50	1	2	1	1	2	1	2	0	0
C31	Rottweiler	9	30	F	52	61	94,00	1	1	1	2	1	1	2	0	0
C32	Boxer	7	28	M	44	50	115,10	2	1	1	2	2	2	1	0	0
C33	SRD	11	30	M	60	72	94,40	0	2	0	2	1	0	1	2	0
C34	Caniche	12	16	M	64	69	71,20	1	2	1	2	1	1	1	0	0
C35	Pastor Alemão	13	31	M	68	82	97,40	1	2	1	2	1	0	1	0	0
C36	Boxer	10	26	M	56	66	96,30	2	3	0	1	1	1	1	0	0

Cão nº	Raça	Idade	Peso(kg)	Sexo	Idade Lebeau	Idade/peso*	Peso encéfalo(g)	Dil.Ventr.	Fibro.Men.	Calcif.	Hial.Vasc.	Hemorr.	Satelitose	Lipofuscina	C.Amilác.	Esferói.
C37	Pequinês	14	5	F	72	72	53,40	0	1	1	1	1	2	2	0	0
C38	Boxer	12,5	19	F	64	69	92,50	1	2	1	2	2	0	2	0	0
C39	Caniche	14	4	F	72	72	49,30	0	1	0	1	2	2	1	0	0
C40	Rottweiler	8	53	M	48	64	111,20	0	3	0	1	2	0	1	0	0
C41	Perdigueiro	13	26	M	68	82	99,60	0	2	0	1	0	0	2	0	1
C42	SRD	16	4	M	80	80	64,30	2	1	1	1	0	1	1	0	0
C43	SRD	17	6	M	84	84	63,20	2	3	0	2	1	2	1	0	0
C44	Caniche	13	3	M	68	68	54,80	1	0	0	2	2	1	1	0	0
C45	SRD	12	9	F	64	64	58,60	1	1	0	1	3	2	2	1	1
C46	SRD	10	9	M	56	56	63,90	0	1	0	1	1	1	1	0	0
C47	Caniche	9	11	M	52	56	74,20	1	1	0	1	2	2	2	0	1
C48	Caniche	10	8	M	56	56	55,30	1	2	1	1	0	1	2	0	0
C49	Pastor Alemão	10	30	F	56	66	99,60	1	3	2	2	0	1	2	0	0
C50	Pequinês	13	6	M	68	68	54,00	0	1	1	2	0	1	1	1	0
C51	SRD	15	12	M	76	83	75,10	1	2	3	1	1	2	1	1	0
C52	Pequinês	18	4	M	88	88	52,50	1	2	1	1	1	1	1	1	0
C53	Pequinês	12	4	F	64	64	56,40	0	1	3	1	1	2	1	1	0
C54	Boxer	13	23	M	68	74	98,40	3	1	0	2	1	0	1	0	1
C55	Pincher	16	4,5	M	80	80	54,20	0	1	0	2	0	2	2	0	0
C56	Caniche	13	9	M	68	68	68,80	0	1	0	2	0	1	2	2	0
C57	Caniche	12	7	F	64	64	60,30	2	2	0	2	1	0	1	0	0
C58	Pastor Alemão	15	20	M	76	83	91,70	1	2	1	1	1	0	1	1	1
C59	Pincher	3	2	M	28	28	44,60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C60	SRD	5	8	M	36	36	64,50	1	0	0	1	0	1	0	0	0
C61	SRD	2	15	M	24	24	65,30	0	1	0	0	2	1	0	0	0
C62	Rottweiler	2	49	M	24	24	95,90	0	2	1	0	0	0	0	0	0
C63	Boxer	5	30	M	36	40	102,60	0	2	0	0	1	0	1	0	0
C64	Caniche	5	7	M	36	36	74,00	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C65	SRD	1	4	F	15	15	52,80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C66	SRD	6	28	F	40	45	80,80	0	0	0	1	1	1	1	0	0
C67	SRD	4,5	35	M	36	40	108,40	1	0	0	1	1	0	0	0	0
C68	SRD	1	10	M	15	15	58,00	0	0	0	0	1	0	0	0	0
C69	SRD	2	7	F	24	24	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C70	Malamute	7	55	M	44	56	100,00	na	1	0	2	2	1	1	0	0

M-Macho (0)=(-)- ausente; (2)=(++)- evidente/frequente
F-Fêmea (1)=(+)-pouco evidente/ pouco frequente; (3)=(+++)-muito evidente/muito frequente
na- não avaliado

Tabela V- Resultados Gerais de Imunohistoquímica

Cão nº	Raça	Idade	Peso(kg)	Sexo	Aβ-lept.	Aβ-córtex	Placas Aβ	GFAP-córtex	GFAP-SB	Ubiquit. neuronal	Ubiquit. SB	*Tau*
C1	SRD	10	10	F	0	0	0	2	2	0	0	0
C2	SRD	10	11	F	1	2	0	3	2	0	2	0
C3	SRD	15	7	F	2	1	1	2	2	0	1	0
C4	Pastor Alemão	9	33	F	1	2	0	2	2	0	1	0
C5	Caniche	7	7	F	0	0	0	1	2	0	0	0
C6	Caniche	13	8	F	2	2	1	2	2	0	1	0
C7	Pastor Alemão	10	33	M	1	0	0	2	1	0	1	0
C8	SRD	14	15	M	1	1	1	2	2	0	1	0
C9	SRD	10	6	F	1	0	0	2	2	1	1	0
C10	Perdigueiro	14	20	F	1	0	0	2	2	0	2	0
C11	SRD	10	19	F	1	0	0	2	2	1	2	0
C12	SRD	15	12	M	2	0	0	1	2	0	2	1
C13	Boxer	10	26	M	1	0	0	2	2	0	1	0
C14	SRD	15	16	F	0	0	0	1	1	0	1	0
C15	SRD	14	19	M	1	1	1	3	1	0	2	1
C16	SRD	16	25	M	3	2	0	2	2	0	2	1
C17	SRD	14	26	M	1	0	0	2	2	0	2	0
C18	SRD	13	9	M	3	1	1	1	1	0	na	0
C19	Caniche	12	5	F	1	1	0	2	1	1	2	0
C20	Caniche	13	8	M	1	1	1	1	2	0	1	0
C21	Pincher	15	7	M	0	0	0	2	1	0	2	0
C22	SRD	5	6,5	M	0	0	0	2	2	1	0	0
C23	Pequinês	13	7	M	1	0	2	2	3	0	2	0
C24	SRD	10	8	M	1	2	2	1	2	0	1	0
C25	SRD	10	10	M	0	1	0	2	2	0	1	0
C26	SRD	12	9	M	2	2	0	2	1	0	3	0
C27	SRD	1	9	M	0	0	0	1	1	0	1	1
C28	Pastor Alemão	16	20	F	2	1	0	2	2	0	2	0
C29	Caniche	17	5,5	F	2	1	1	2	2	0	1	0
C30	Caniche	16	5,5	F	1	1	1	2	2	0	1	0
C31	Rottweiler	9	30	F	0	0	0	2	2	0	1	0
C32	Boxer	7	28	M	0	0	0	1	2	0	1	0
C33	SRD	11	30	M	0	0	0	2	2	0	1	0
C34	Caniche	12	16	M	1	1	1	1	1	0	1	0
C35	Pastor Alemão	13	31	M	0	0	0	1	1	0	1	0
C36	Boxer	10	26	M	0	0	0	2	2	0	1	0

Cão nº	Raça	Idade	Peso(kg)	Sexo	Aβ-lept.	Aβ-cortex	Placas Aβ	GFAP-cortex	GFAP-SB	Ubiquit. neuronal	Ubiquit. SB	*Tau*
C37	Pequinês	14	5	F	1	2	0	2	2	0	2	1
C38	Boxer	12,5	19	F	2	2	0	1	1	0	1	0
C39	Caniche	14	4	F	1	0	0	1	2	0	3	1
C40	Rottweiler	8	53	M	0	0	0	1	1	0	1	1
C41	Perdigueiro	13	26	M	0	0	0	1	1	1	1	0
C42	SRD	16	4	M	1	0	0	2	2	0	1	0
C43	SRD	17	6	M	1	1	1	2	0	0	1	0
C44	Caniche	13	3	M	0	0	0	2	2	0	3	0
C45	SRD	12	9	F	1	2	1	2	2	1	1	1
C46	SRD	10	9	M	0	0	0	2	2	0	1	0
C47	Caniche	9	11	M	0	0	0	2	2	0	2	0
C48	Caniche	10	8	M	2	2	0	1	2	1	2	1
C49	Pastor Alemão	10	30	F	2	2	1	2	1	0	2	1
C50	Pequinês	13	6	M	1	2	0	1	1	0	1	0
C51	SRD	15	12	M	3	2	2	3	1	0	3	1
C52	Pequinês	18	4	M	1	1	1	2	1	0	1	1
C53	Pequinês	12	4	F	0	3	1	3	3	1	2	0
C54	Boxer	13	23	M	1	1	1	2	2	0	1	0
C55	Pincher	16	4,5	M	1	1	1	2	2	0	2	1
C56	Caniche	13	9	M	1	2	1	2	1	0	2	1
C57	Caniche	12	7	F	3	3	3	2	1	0	1	1
C58	Pastor Alemão	15	20	M	1	2	1	2	1	1	1	0
C59	Pincher	3	2	M	0	0	0	1	1	0	0	0
C60	SRD	5	8	M	0	0	0	1	1	0	1	0
C61	SRD	2	15	M	0	0	0	1	1	0	0	0
C62	Rottweiler	2	49	M	0	0	0	na	1	0	1	0
C63	Boxer	5	30	M	0	0	0	1	1	0	0	1
C64	Caniche	5	7	M	0	0	0	1	2	0	0	0
C65	SRD	1	4	F	0	0	0	1	2	0	0	0
C66	SRD	6	28	F	0	0	0	2	1	0	1	1
C67	SRD	4,5	35	M	0	0	0	0	1	0	0	0
C68	SRD	1	10	M	0	0	0	0	1	0	1	0
C69	SRD	2	7	F	0	0	0	2	1	0	0	1
C70	Malamute	7	55	M	0	0	0	1	2	0	1	0

M-Macho (0)=(-)-marcação ausente; (2)=(++)- marcação positiva
F-Fêmea (1)=(+)-marcação moderadamente positiva; (3)=(+++)-marcação muito positiva
na- não avaliado
SB-Substância branca