

## UTILIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO CANINO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MENINGOENCEFALOMIELITIS DE ORIGEN DESCONOCIDO

Utility of acute phase proteins in canine cerebrospinal fluid for the diagnosis of meningoencephalomyelitis of unknown origin

**Verdú-Serrano, M. E.<sup>1\*</sup>; Muñoz-Prieto, A.<sup>2</sup>; Mateo-Pampliega, I.<sup>3</sup>; García-Martínez, J. D.<sup>2</sup>**

1. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Murcia, 30100, España.
2. Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Murcia, 30100, España.
3. Hospital Clínico Veterinario Vetsia, C/ Galileo 3, Leganés, Madrid, 28914, España.

**Autor de correspondencia:** Verdú-Serrano, M. E., mariaelena.verdu@um.es

Tipo de artículo: Originales

Enviado: 22/03/2023

Aceptado: 19/12/2023

### RESUMEN

El sistema inmunitario facilita la defensa de los seres vivos, que se desencadena a través de la respuesta de fase aguda, generándose las proteínas de fase aguda. Estas proteínas, medidas en suero, resultan de utilidad. El uso de biomarcadores para el diagnóstico precoz de enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC), está en auge en medicina humana. En el caso de las meningoencefalomielitis de origen desconocido (MOD), no hay estudios con una información relevante que sea capaz de solventar el gran inconveniente de no poder obtener un diagnóstico definitivo, que no sea de manera postmortem. La medición de proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva (CRP) y la haptoglobina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) podría ayudar a solventar este problema. El objetivo de esta investigación es valorar si estas proteínas se pueden detectar en el LCR, mediante un analizador bioquímico automatizado y estudiar la existencia de alteraciones

en animales con MOD. Para ello, los animales incluidos en el estudio se dividieron en un grupo control, compuesto por perros sin MOD y un grupo problema, subdividido en perros con MOD y perros con MOD tratados con corticoides. Para la medición de estos parámetros se utilizó el analizador Olympus AU600®. Para realizar el estudio comparativo entre grupos se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. La CRP no mostró variaciones estadísticamente significativas, mientras que la haptoglobina no se pudo detectar en el LCR, por lo que se debería valorar su medición con técnicas más sensibles que permitan su cuantificación.

**Palabras clave:** Sistema Nervioso Central, proteína C-reactiva, haptoglobina, perro, enfermedades inflamatorias, meninges, encéfalo, biomarcadores, biofluidos.

## ABSTRACT

The immune system facilitates the defense of living beings, which is triggered through the acute phase response, generating acute phase proteins. These proteins, measured in serum, are useful. The use of biomarkers for the early diagnosis of inflammatory diseases of the central nervous system (CNS) is booming in human medicine. In the case of meningoencephalomyelitis of unknown origin (MOD), there are no studies with relevant information capable of solving the major drawback of not being able to obtain a definitive diagnosis, except postmortem. The measurement of acute phase proteins, such as C-reactive protein (CRP) and haptoglobin in cerebrospinal fluid (CSF) could help to solve this problem. The aim of this research is to assess whether these proteins can be detected in CSF using an automated biochemical analyzer and to study the existence of alterations in MOD animals. For this purpose, the animals included in the study were divided into a control group, composed of dogs without MOD, and a problem group, subdivided into dogs with MOD and dogs with MOD treated with corticoids. The Olympus AU600® analyzer was used to measure these parameters. To perform the comparative study between groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test was applied, followed by Dunn's test for multiple comparisons. CRP did not show statistically significant variations, while haptoglobin could not be detected in CSF, so its measurement should be evaluated with more sensitive techniques that allow its quantification.

**Keywords:** Central Nervous System, C-reactive protein, haptoglobin, dog, inflammatory diseases, meninges, brain, biomarkers, biofluids.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El sistema inmunológico y la respuesta de fase aguda

El sistema inmunitario es el mecanismo por el cual los seres vivos luchan contra las infecciones para protegerse de los agentes infecciosos que entran en el organismo antes de que causen daño. Para realizar esta función, el sistema inmunitario tiene la capacidad de discriminar lo propio de lo ajeno. Está formado por el sistema innato, que es la primera línea de defensa inespecífica contra organismos invasores, y el sistema adaptativo, que actúa como la segunda línea de defensa, ya más específica, que ofrece protección frente a reexposiciones

al mismo patógeno. Para la realización de esta tarea el sistema inmunológico cuenta con unos componentes celulares y humorales. (Meyer & Harvey, 2007).

La respuesta de fase aguda forma parte del sistema inmunitario innato y es la reacción que se produce en el animal como respuesta a disturbios de la homeostasia causados por: infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (Kushner et al.,1981). Esta respuesta es, por lo tanto, inespecífica. Las principales funciones de esta respuesta sistémica son (Whicher & Westacott, 1992):

- Proporcionar energía y sustrato para la lucha frente a los patógenos invasores.
- Evitar la transferencia de metabolitos necesarios para los patógenos.

- Limitar el daño causado por los patógenos y/o eliminar el tejido dañado o infectado, y restaurar el tejido sano.

La respuesta de fase aguda se inicia con una reacción local, caracterizada por una gran cantidad de mecanismos entre los que se encuentran: la agregación plaquetaria, formación del coágulo, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, así como la activación de los granulocitos y las células mononucleares que van a producir la liberación de diversos mediadores inflamatorios como las citoquinas (Cerón et al., 2005). Estos mediadores van a actuar sobre sus receptores, situados en diversas células del organismo, ocasionando una respuesta sistémica caracterizada por: fiebre, leucocitosis, aumento de la velocidad de sedimentación eritrocitaria, aumento de la secreción de la hormona ACTH y glucocorticoides, activación del complemento y de la cascada de la coagulación, disminución de los niveles de hierro y zinc; y cambios en las concentraciones plasmáticas de las proteínas de fase aguda (PFAs) (Heinrich et al., 1990). La producción y liberación de estas proteínas por parte del hígado constituye una parte fundamental de la respuesta de fase aguda (Martínez-Subiela et al., 2001). La magnitud del incremento en la concentración de las PFAs varía en función de la proteína y de la especie animal (Pannen & Robotham, 1995).

## 1.2. Las proteínas de fase aguda

Las PFAs se clasifican dependiendo de la variación de sus niveles ante un estímulo en:

- **Proteínas de fase aguda negativas:** son aquellas cuyas concentraciones en sangre disminuyen cuando se produce la respuesta de fase aguda, como son: la albúmina y la transferrina (Heinrich et al., 1990).
- **Proteínas de fase aguda positivas:** son aquellas cuyas concentraciones en sangre aumentan en cuando se produce la

respuesta de fase aguda, como son la proteína C reactiva (CRP), el fibrinógeno, la haptoglobina, la ceruloplasmina, el seromucoide y el amiloide sérico A. Estas, a su vez, se suelen dividir en tres subgrupos (Kushner & Mackiewicz, 1993):

- Aquellas cuyas concentraciones se ven aumentadas en un 50% (ceruloplasmina y fibrinógeno).
- Aquellas que presentan un incremento de 2 o 3 veces superior a su concentración normal (haptoglobina y seromucoide).
- Aquellas que presentan aumentos rápidos de hasta 1000 veces superior a su concentración normal (proteína C reactiva y amiloide sérico A).

Según su función biológica, las PFAs se diferencian en (Kushner & Mackiewicz, 1993):

- **Proteínas de Fase aguda que intervienen en la defensa del hospedador:** Intervienen en la adaptación o defensa del organismo hospedador frente al patógeno. Dentro de este grupo se encuentran:
  - Proteína C reactiva.
  - Amiloide A sérico.
  - Fibrinógeno
- **Proteínas transportadoras con actividad antioxidante:** Protegen los tejidos del hospedador de los metabolitos del oxígeno que son liberados por parte de las células fagocíticas durante la inflamación. En este grupo se encuadran:
  - Ceruloplasmina.
  - Haptoglobina.

En general la síntesis de las PFAs se ve estimulada entre 6 y 8 horas después de iniciarse la reacción inflamatoria y llegan a un pico en sus concentraciones tras 2-5 días (Jain, 1989). Numerosos estudios demuestran que las PFAs presentan diferente comportamiento según las distintas especies animales (Martínez-Subiela et al., 2001).

En el perro las PFAs que presentan mayor utilidad clínica son: la CRP y la haptoglobina. Se trata de PFA positivas que incrementa su concentración en suero de forma rápida en perros con inflamación sistémica debida a: cirugías, traumatismos, infecciones o neoplasias (Eckersall & Bell, 2010; Méndez et al., 2015).

Debido a la gran cantidad de bibliografía que hay sobre las PFAs y su utilidad en gran número de patologías de carácter inflamatorio, hay grandes perspectivas de futuro sobre su uso clínico (Cerón et al., 2005).

### 1.3. La proteína C reactiva

La CRP se denominó así por su capacidad de unirse a la fracción C del polisacárido de los neumococos (Briles et al., 1989). Es una proteína perteneciente a la familia de las pentraxinas y está formada por cinco subunidades idénticas unidas por enlaces no covalentes (Black et al., 2004). Al contrario que la CRP del humano y del caballo, que no son glicoproteínas, dos de las cinco subunidades de la CRP del perro están glucosiladas (Waritani et al., 2020). Además de unirse a las membranas de algunos agentes infecciosos, la CRP parece promover la activación del complemento y puede unirse a la cromatina nuclear de las células dañadas (Szalai et al., 2000).

La CRP es un parámetro de inflamación ampliamente usado, correlacionándose su aumento con el riesgo y severidad de dicho proceso inflamatorio (Selting et al., 2015). De hecho, mayores aumentos en sus concentraciones indican una mayor gravedad de la enfermedad (Kocaturk et al., 2015). Por esta razón, se ha estudiado como biomarcador de la inflamación sistémica en diversas enfermedades (Nakamura et al., 2008). Así, se ha analizado su comportamiento en diferentes procesos: erlichiosis (Rikihisa et al., 1994) enteritis bacteriana y hemorrágica por parvovirus (Kocaturk et al., 2015), infecciones bacterianas (leptospirosis) (Buser

et al., 2019), en infecciones experimentales con *Bordetella bronchiseptica* (Yamamoto et al., 1994), en la leishmaniosis canina, para evaluar los diferentes estadios clínicos de la enfermedad (Pardo-Marin et al., 2020) y en perros con *Dirofilaria immitis*, antes y después de administrar un tratamiento adulticida, para determinar el daño vascular que han sufrido (Falcón-Cordón et al., 2022; Méndez et al., 2015) También se han descrito intensos aumentos de la proteína C reactiva en respuesta a estímulos como cirugías (Yamamoto et al., 1993) e inyección de agentes inertes (caseína, turpentina), pudiendo ser esta respuesta incluso más rápida que en el ser humano (Caspi et al., 1987).

Además, esta proteína se ha usado para predecir, en perros, el pronóstico de determinados procesos como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y/o sepsis. En este sentido, se ha comprobado que los cambios en las concentraciones de CRP en suero, durante 3 días, predijeron correctamente la supervivencia del 94% de los perros y la muerte del 30% de los animales enfermos (Gebhart et al., 2009).

También se han descrito aumentos de esta proteína en el suero de perros de trineo tras la participación en una carrera (Fergestad et al., 2016) o en perros con fallo cardíaco congestivo (Reimann et al., 2016) (Polizopoulou et al., 2015).

Finalmente, la CRP se midió en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de perros con diferentes trastornos inflamatorios, siendo más elevada en estos animales que en los que presentaban compresión medular o epilepsia idiopática (Martínez-Subiela et al., 2011).

### 1.4. La haptoglobina

Es una proteína de fase aguda, en concreto, una glicoproteína que existe en forma de dímero y de polímero. La lisis de los eritrocitos en la circulación (hemólisis intravascular) libera

hemoglobina libre hacia el plasma, y los tetrámeros de hemoglobina se disocian de forma espontánea en  $\alpha$ - $\beta$  dímeros que son unidos por la haptoglobina (Shih et al., 2014) Cada monómero de haptoglobina puede unir de forma irreversible un dímero  $\alpha$ - $\beta$ , evitando parte de la pérdida de hemoglobina (y por ello pérdida de hierro) en la orina tras la hemólisis intravascular (Makimura & Suzuki, 1982).

El complejo hemoglobina-haptoglobina es eliminado del plasma por los hepatocitos y macrófagos, y la presencia de una baja concentración plasmática de haptoglobina en perros, gatos y caballos sugiere que existe hemólisis intravascular reciente o actual (Andersen et al., 2017).

Por el contrario, la medición de concentraciones aumentadas en el plasma facilita evidencias de inflamación (Melgar et al., 2005) o infección (Kasvosve et al., 2010) en todos los animales domésticos examinados, aunque los valores aumentados también pueden ser resultado de la administración de glucocorticoides en algunas especies (perros y vacas) (Solter et al., 1991).

La haptoglobina tiene una importante función protegiendo a los tejidos del hospedador de los metabolitos del oxígeno, que son liberados por parte de las células fagocíticas durante la inflamación (Kushner & Mackiewicz, 1993) y por las lesiones oxidativas originadas por la hemoglobina. Por tanto, la haptoglobina funciona como un antioxidante (di Masi et al., 2020).

Además, sirve para la protección frente a infecciones bacterianas, debido a que es capaz de unirse a la hemoglobina libre en los tejidos infectados, limitando la disponibilidad de hierro para el crecimiento bacteriano (Eaton et al., 1982). También se ha descrito que inhibe varias funciones de los neutrófilos (Oh et al., 1990).

Finalmente, la CRP y la haptoglobina, junto a otras PFAs, se han detectado en el LCR de perros con hernias discales, ocurridas de manera natural, midiéndose la concentración de estas

proteínas antes y después del daño producido a nivel del sistema nervioso central (SNC) y encontrándose cambios significativos en el LCR, por lo que parece que procesos muy dolorosos pueden aumentar su concentración (Anderson et al., 2015).

Concretamente, la haptoglobina ha demostrado ser de gran utilidad en procesos inflamatorios del sistema nervioso central, especialmente en meningitis bacterianas, donde sus niveles se mantuvieron elevados durante un tiempo más prolongado que otras proteínas de fase aguda. Por lo tanto, se puede considerar un marcador con potencial aplicación también en la especie canina (Paradowski et al., 1995).

### **1.5. La meningoencefalomielitis de origen desconocido (MOD) y sus subtipos**

Las meningoencefalomielitis de origen desconocido (MOD) constituyen un conjunto de enfermedades inflamatorias no supurativas, que se caracterizan por un infiltrado perivascular de células reticuloendoteliales con una ausencia de agentes infecciosos como responsables de las mismas. Estas MOD presentan una serie de aspectos clínicos y de imagen comunes a todas ellas (Morales & Montoliu, 2012).

Suelen presentar un inicio agudo y un curso progresivo, aunque en ocasiones también aparecen de una forma más crónica. La distribución de las lesiones puede ser multifocal o difusa, y frecuentemente asimétrica (Cynthia & Kahn, 2007).

Los signos clínicos que se suelen observar son fiebre, hiperestesia, rigidez y dolor cervical, y contracciones musculares paraespinales (Cornelis et al., 2019). Las manifestaciones neurológicas específicas reflejan la localización de los focos inflamatorios en el interior del sistema nervioso, observándose desde depresión a coma, ceguera, paresia progresiva, ataxia cerebelosa o vestibular, opistótonos, déficits de los nervios craneales y convulsiones (Cynthia & Kahn, 2007).

La etiología de estas enfermedades se desconoce, por lo que, el diagnóstico clínico suele ser presuntivo y el definitivo se realiza post-mortem mediante histopatología del encéfalo (Granger et al., 2010).

La resonancia magnética (RM) sirve de ayuda en la evaluación de las afecciones inflamatorias, pero el diagnóstico clínico basado en las imágenes no siempre es posible debido a que muchas enfermedades inflamatorias y no inflamatorias (neoplasias) tienen apariencia similar (Pellegrino et al., 2003).

El análisis del LCR es la prueba diagnóstica de elección en pacientes que presentan un diagnóstico presuntivo de una enfermedad inflamatoria del SNC. En el caso de las MOD, la aparición de una pleocitosis mononuclear o, en ocasiones, mixta, así como un aumento de las proteínas es un hallazgo característico de estas patologías, una vez descartadas las etiologías infecciosas. (Lowrie et al., 2013).

Tanto la RM como el análisis del LCR son pruebas de utilidad para valorar el pronóstico de estos animales: mortalidad, recaídas y resultado del tratamiento a largo plazo (Lowrie et al., 2013).

Las MOD se subdividen en: meningoencefalomielitis granulomatosa (GME), meningoencefalomielitis necrotizante (MEN) y leucoencefalitis necrotizante (LEN) (Nessler et al., 2021).

La GME es una enfermedad inflamatoria no supurativa de origen desconocido que afecta al sistema nervioso central de los perros y que se caracteriza por un acúmulo de células inflamatorias alrededor de los vasos sanguíneos. En base a la localización y distribución de las lesiones, la GME se clasifica en tres formas morfológicas: diseminada, focal y ocular. La forma ocular puede aparecer junto a la forma focal o a la diseminada en un mismo animal (Cloquell & Pampliega, 2010). Los signos clínicos van a depender de la zona afectada. La hematología y la bioquímica sanguínea suelen ser normales. La RM es la prueba de imagen de elección para identificar y tipificar

las lesiones (Oliphant et al., 2017). El LCR es atípico en la mayoría de los pacientes, con ligera a marcada pleocitosis e incremento de las proteínas. Las recaídas son comunes y muchos animales son finalmente eutanasiados a causa de los desórdenes neurológicos (Platt & Olby, 2008).

La MEN se describió inicialmente en los perros de raza Carlino, pero afecta a todas las razas, entre los 6 meses y 7 años (Schatzberg, 2010). La enfermedad puede tener un curso agudo o crónico. La hematología y la bioquímica sanguínea son normales. El análisis de LCR muestra una marcada elevación en el recuento de leucocitos y un incremento de la concentración de las proteínas. Las pruebas de imagen y de forma más específica la RM, son muy útiles en el diagnóstico de esta patología, posibilitando la identificación de áreas focales de necrosis. El pronóstico a largo plazo es desfavorable, por ser una enfermedad progresiva, a pesar de la instauración de un tratamiento apropiado (Pellegrino et al., 2003).

La LEN es un proceso de encefalitis necrotizante que se describió inicialmente en los perros de raza Yorkshire terrier y afecta de forma más frecuente a esta raza, aunque puede afectar a cualquier raza (Lezmi et al., 2007). La hematología y la bioquímica sanguínea suelen ser normales. Las alteraciones en el LCR son inespecíficas y similares a las anteriores (Cloquell & Pampliega, 2014).

El tratamiento de las MOD consiste en corticosteroides a dosis inmunosupresoras, por lo general prednisolona (1-2 mg/kg cada 24h) hasta la resolución de los signos, con disminución gradual de la dosis hasta establecer la dosis mínima efectiva. Además de los corticoides, se han utilizado otros fármacos inmunomoduladores, como por ejemplo la citarabina (citosina arabinosa) y la procarbina (Adamo et al., 2007).

Actualmente, el tratamiento más ampliamente aceptado es el protocolo que combina la prednisolona junto con ciclos de citarabina

(Morales & Montoliu, 2012).

### 1.6. Utilidad del líquido cefalorraquídeo

En patologías que afectan al SNC como las MOD, se observan alteraciones en las estructuras encefálicas y en el LCR, motivo por el cual es tan importante el estudio de este último y conocer las características de un LCR normal, para poder diferenciar entre muestras de animales sanos y animales que presentan este tipo de patologías (de Risio et al., 2015).

La correcta actividad neuronal está íntimamente ligada al flujo sanguíneo cerebral, por lo que en las patologías del SNC, una reducción en el aporte sanguíneo provocará un déficit de nutrientes en este sistema y una alteración del metabolismo glucídico oxidativo, lo que provocará la sintomatología neurológica que se observa en estas patologías. Como consecuencia de esto, las neuronas se verán obligadas a emplear rutas metabólicas alternativas que van a producir metabolitos detectables en el LCR (Satoh et al., 2007).

En la última década se han realizado grandes esfuerzos en el descubrimiento y validación de marcadores biológicos para enfermedades neurodegenerativas, como biomarcadores basados en biofluidos tales como la sangre o el LCR (Jeromin & Bowser, 2017).

Actualmente, en medicina humana, la búsqueda de biomarcadores en el LCR se está convirtiendo en una tendencia, lo que lleva a pensar que estos marcadores también podrían ser de utilidad en medicina veterinaria (Bielekova & Pranzatelli, 2017). En este sentido, la medición de biomarcadores en el LCR ha resultado de utilidad en patologías como el Alzheimer (Olsson et al., 2016; Blennow & Zetterberg, 2018) y la enfermedad de Parkinson (Kwon et al., 2022).

En la esclerosis múltiple, la medición de los niveles de la cadena ligera de neurofilamentos (NfL), una proteína citoesquelética de neuronas expresada en axones se ha convertido en un

nuevo biomarcador potencial para predecir la actividad y progresión de la enfermedad. Los axones dañados del SNC liberan NfL en el LCR y la sangre (Yang et al., 2022).

En medicina veterinaria se realizó un estudio para identificar el potencial de NfL como una herramienta de apoyo para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las MOD en perros. Las concentraciones de NfL en suero y LCR se midieron utilizando una técnica de matriz de molécula única. La concentración de NfL mostró una disminución significativa en el grupo de buena respuesta al tratamiento y un aumento significativo en el grupo de mala respuesta al tratamiento; por este motivo la cadena ligera del neurofilamento se puede considerar un biomarcador potencial para el diagnóstico de las MOD y evaluar la respuesta al tratamiento (Gaetani et al., 2019).

Sin embargo, a excepción del estudio citado anteriormente, y del trabajo sobre el papel de la proteína chaperona en trastornos crónicos de la médula espinal de perros (Shafie et al., 2014), existen pocos artículos que relacionen las alteraciones en las concentraciones de neurotransmisores, enzimas y sustratos metabólicos neuronales con diferentes patologías del SNC.

En resumen, los resultados del análisis del LCR proporcionan rápidamente información que puede ser de utilidad para la elección del tratamiento, el pronóstico o indicativa de la necesidad de realizar más pruebas diagnósticas (Andersen-Ranberg et al., 2021). Sin embargo, los resultados pueden ser normales incluso en presencia de alteraciones significativas del SNC. Además, en contadas ocasiones el análisis del LCR por sí mismo proporciona un diagnóstico definitivo. Por estas razones, los hallazgos del LCR deben ser interpretados en el contexto de una historia clínica, unos signos clínicos y otras pruebas diagnósticas complementarias (Karlsson et al., 2015).

El objetivo de esta investigación es valorar si las proteínas de fase aguda CRP y haptoglobina pueden detectarse en el LCR y evaluar si

dichas proteínas presentan variaciones en los animales que padecen MOD.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Población utilizada para el estudio

El muestreo que se utilizó para nuestro estudio provenía de alícuotas sobrantes de muestras de LCR, que habían sido recogidas y utilizadas con finalidad diagnóstica, contando con la autorización del Comité de Bioseguridad y Experimentación (CBE) con código 335/2020.

Dichas muestras provenían de perros enfermos que llegaron a la consulta de Medicina Interna (Neurología) del Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia y al Servicio de Neurología del Hospital Veterinario Vetsia de Madrid por problemas neurológicos de neurolocalización intracraneal entre los años 2019-2022. El protocolo diagnóstico incluyó la realización de una resonancia magnética (RM) y extracción de LCR para intentar llegar a un diagnóstico y aplicar un tratamiento. Aquellas muestras de LCR provenientes de animales cuyo diagnóstico clínico era de una meningoencefalomielitis de origen desconocido, en lugar de ser desechadas según la legislación vigente, fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su reutilización en este estudio.

El grupo control estuvo formado por muestras de animales que acudieron a la consulta de Neurología por presentar convulsiones y que reunían los criterios señalados por la IVETF-2015 con un nivel de significación Tier II para un diagnóstico clínico de epilepsia idiopática o de origen genético (de Risio et al., 2015). Brevemente estos criterios implican que estos animales no presentan una lesión estructural subyacente en el encéfalo, el inicio de la primera crisis se presenta entre los 6 meses y los 6 años de edad. Además, presentan un examen neurológico interictal, una RM y unos valores de ácidos biliares pre

y postprandiales normales. El grupo control estuvo formado por animales que presentaban esta patología, ya que, los riesgos que conlleva la extracción de LCR no justifican el uso de pacientes sanos como grupo control desde un punto de vista ético (Martínez-Subiela et al., 2011).

### 2.2. Criterios de inclusión

Para que los animales pudieran formar parte de este estudio clínico debían cumplir los siguientes criterios específicos:

- Tener una historia clínica completa y detallada con: reseña, motivo de consulta, anamnesis y; exámenes físicos y neurológicos completos.
- Hemograma y bioquímica sanguínea completa antes de empezar el tratamiento.
- Examen de LCR completo con: diferenciación celular y concentración de proteínas, teniendo que ser esta última superior a 25 mg/dl; además, el número de células debería ser superior a 5 células/ $\mu\text{l}$  y con una población predominantemente mononuclear.
- Animales mayores de 6 meses de edad.
- Animales negativos a meningoencefalomielitis de origen infeccioso: con pruebas negativas, bien serológicas o de PCR en LCR, frente a *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans* y moquillo.
- Pruebas de imagen: perros que presentaron una RM con una o múltiples lesiones hiperintensas en T2 compatibles con una RM según los criterios establecidos (Granger et al., 2010).

### 2.3. Criterios de exclusión

Los animales que presentaban alguna de las características que se describen a continuación no pudieron formar parte del estudio:



- Animales que sólo presentaban neuritis óptica como signo neurológico.
- Animales con reticulosis neoplásica.
- Animales con meningoencefalomielitis infecciosa.
- Animales con historiales clínicos incompletos.

#### 2.4. Técnicas y tipos de ensayo para la medición

Para la medición de los parámetros que forman parte de este estudio se utilizó el analizador automático de bioquímica Olympus AU600® (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). La técnica utilizada para la determinación de las PFA en el LCR canino fue la prueba inmunturbidimétrica, variando el reactivo para cada una de estas proteínas.

Para la determinación de la CRP se utilizó el reactivo OSR6147®. Al mezclar una muestra con solución amortiguadora y solución de antisuero, la CRP reacciona específicamente con los anticuerpos de CRP antihumana, produciendo complejos insolubles. La absorbancia de estos complejos es proporcional a la concentración de CRP en la muestra (Dati et al., 1996).

Para la determinación de la haptoglobina se utilizó el reactivo OSR6165®. Al mezclar una muestra con solución amortiguadora y solución de antisuero, la haptoglobina humana reacciona específicamente con los anticuerpos de haptoglobina antihumana, produciendo complejos insolubles. La absorbancia de estos complejos es proporcional a la concentración de haptoglobina en la muestra (Dati et al., 1996).

#### 2.5. Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un estudio de normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk tras la que se observó una distribución no paramétrica de los mismos.

Para realizar el estudio comparativo entre grupos (grupo control, grupo problema y grupo problema con corticoides) se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples.

Los valores fueron corregidos mediante el test de Tukey. Los valores se indican como medianas y rangos. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de  $p$  que fueron menores de 0.05. Los diferentes análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad® para Mac (Versión 8.1).

### 3. RESULTADOS

Con todas las muestras que formaron parte del estudio clínico se hicieron tres grupos:

- Grupo control: Integrado por animales con epilepsia idiopática, con un total de 9 muestras.
- Grupo problema sin corticoides: Compuesto por animales con MOD, con un total de 10 muestras.
- Grupo problema con corticoides: Formado por animales con MOD, a los que se les había administrado previamente a la extracción de LCR alguna dosis de corticoides, que supusieron un total de 7 muestras.

Los niveles de CRP fueron detectados en el LCR de los tres grupos de animales incluidos en este estudio. Aunque se observó una tendencia de aumento en el grupo problema, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.619$ ), entre el grupo control (mediana: 1.3  $\mu\text{g/ml}$ , rango: 0.9-1.8  $\mu\text{g/ml}$ ), grupo problema (mediana: 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , rango: 0.8-3.1  $\mu\text{g/ml}$ ) y el grupo problema con corticoides (mediana: 1.35  $\mu\text{g/ml}$ , rango: 1-1.9  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tabla 1).

Los niveles de haptoglobina estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica en las muestras analizadas de LCR de los tres grupos analizados que formaban parte de este estudio (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros individuales de proteína C-reactiva y haptoglobina en los grupos de estudio.

	Raza	Sexo	Edad	Peso (Kg)	CRP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Haptoglobina (mg/dl)
<b>A. Grupo control</b>	Común Europeo	Hembra	6 años	5,7	1,4	DLD*
	Border Collie	Hembra	7 años	18	1,3	DLD*
	Mestiza	Hembra	8 meses	13,5	1,2	DLD*
	Am. Staff. Terrier	Hembra	7 años	18,7	0,9	DLD*
	Mestizo	Macho	3 años	21,7	1,6	DLD*
	Beagle	Hembra	5 años	19,2	1,5	DLD*
	Angora	Hembra	11 años	4	1,8	DLD*
	Chihuahua	Macho	4 años	3,1	1,3	DLD*
	Golden Retriever	Macho	6 años	35,8	1,2	DLD*
<b>B. Grupo problema</b>	Weimaraner	Macho	8 años	32	1,4	DLD*
	Mestizo	Macho	6 años	6,4	1,9	DLD*
	Bichón maltés	Macho	3 años	4,3	1,0	DLD*
	Papillon	Macho	2 años	4	1,4	DLD*
	Yorkshire terrier	Macho	1 años	2,4	1,6	DLD*
	Bulldog francés	Macho	7 años	18	1,8	DLD*
	Mestiza	Hembra	4 años	11,2	2,2	4,4138
	Mestizo	Macho	7 años	N/D	0,8	DLD*
	Chihuahua	Macho	2 años	2,2	1,0	DLD*
	Pomerania	Macho	4 años	3,7	3,1	DLD*
<b>C. Grupo problema con corticoides</b>	Bichón maltés	Hembra	2 años	2,4	1,2	DLD*
	Yorkshire terrier	Macho	9 años	2,1	1,0	DLD*
	Yorkshire terrier	Macho	3 años	3,1	1,4	DLD*
	Bichón maltés	Hembra	5 años	4,9	1,9	DLD*
	Mestiza	Hembra	6 años	8	1,4	DLD*
	Perro de Aguas	Macho	8 meses	21	9,2	1,4540
	Bichón maltés	Hembra	9 años	5	1,3	DLD*

\*DLD: Por debajo del límite de detección.

#### 4. DISCUSIÓN

Los valores de CRP detectados en el LCR de los perros analizados en nuestro estudio no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los dos grupos problema. Sin embargo, son numerosos los estudios que encuentran elevaciones de la CRP, en el suero, en diferentes enfermedades de tipo inflamatorio, como, por ejemplo: piometra, páncreatitis aguda, poliartritis, sepsis,

anemia hemolítica inmunomediada y neoplasias (Malin & Witkowska-Piłaszewicz, 2022).

Esta proteína se ha encontrado incrementada en el LCR de perros con trastornos inflamatorios, en comparación con perros que presentaban compresión de la médula espinal o epilepsia idiopática (Martínez-Subiela et al., 2011). En el presente estudio se ha observado un incremento de la CRP en perros con MOD y en aquellos con MOD tratados con corticoides respecto al grupo control, aunque los resultados no fueron

estadísticamente significativos. Esta circunstancia podría deberse al hecho de que la técnica de ensayo realizada por los mencionados autores para la medición de LCR fue diferente a la usada en nuestro estudio. En concreto, la cuantificación de la CRP en el LCR en el estudio de Martínez-Subiela et al (2011) fue utilizando un ensayo inmunofluorimétrico de resolución temporal adaptado (TR-IFMA), mientras que la técnica utilizada en nuestro trabajo fue la prueba inmunoturbidimétrica. En esta técnica, los coeficientes de variación son mucho menores (2,81% dentro de la serie y 5,99% total) que en la prueba TR-IFMA (9,91% dentro de la serie y 14,5% total) (Dati et al., 1996). Esta diferencia en los resultados obtenidos en nuestro estudio en relación a los obtenidos por Martínez-Subiela et al (2011) también podría estar influenciada por el escaso número de muestras de nuestro estudio. Por ello, sería recomendable determinar la CRP en el LCR en un número mayor de perros con un diagnóstico de MOD para concretar la tendencia observada en nuestro trabajo.

En cuanto a la concentración de haptoglobina en el LCR, no se ha detectado esta proteína en ninguno de los tres grupos estudiados. Este hecho podría ser debido a que esta proteína no se detecta mediante un analizador automático de bioquímica (Chamoun et al., 2001; Martín-Vaquero et al, 2016), o bien debido al escaso número de muestras de nuestro estudio.

La haptoglobina se ha encontrado incrementada en el LCR de perros con hernias discales (Anderson et al., 2015), por lo que hipotéticamente podría esperarse un aumento en otras patologías inflamatorias como las MODs. El hecho de no haber detectado esta proteína en el LCR de los perros incluidos en este estudio podría ser debido a que la técnica de ensayo realizada por estos autores para la medición de LCR fue más sensible al utilizar un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (kit comercial ELISA), mientras que en nuestro trabajo la técnica utilizada para cuantificar la concentración de la haptoglobina ha sido una prueba

automatizada inmunoturbidimétrica (Kim et al., 2012). Por lo tanto, a pesar de la ventaja inherente de las pruebas automatizadas, si los valores de haptoglobina son mucho más bajos que los encontrados en suero, no podrían ser detectados mediante esta técnica. Por esta razón, se debería valorar la opción de realizar la medición de este parámetro en LCR utilizando otras técnicas analíticas más sensibles que permitan su cuantificación.

Por otro lado, los resultados de haptoglobina pueden verse incrementados en el suero de animales que están bajo tratamiento con glucocorticoides (Solter et al., 1991). Mediante los resultados obtenidos en este estudio no se puede concretar esta circunstancia, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados observados en el grupo problema y el grupo problema con corticoides, aunque los valores en este último eran más bajos que en el grupo problema.

## 5. LIMITACIONES

Para una correcta interpretación de los resultados debe de tenerse en cuenta que el número de muestras del estudio es limitado.

## 6. CONCLUSIONES

La CRP es un analito detectable en LCR canino, mediante un método automatizado, lo que puede ayudar al estudio de diferentes patologías inflamatorias en este fluido.

La haptoglobina no pudo detectarse mediante un método automatizado en ninguno de los animales incluidos en este estudio.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Universidad de Murcia, en colaboración con el Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria y el Servicio de Neurología del Hospital Veterinario Vetsia de Madrid.

## 8. REFERENCIAS

- Adamo, P. F., Adams, W. M., & Steinberg, H. (2007). Granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs. *Compendium (Yardley, PA)*, 29(11), 678–690.
- Andersen, C. B. F., Stødkilde, K., Sæderup, K. L., Kuhlee, A., Raunser, S., Graversen, J. H., & Moestrup, S. K. (2017). Haptoglobin. *Antioxidants and Redox Signaling*, 26(14), 814–831. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6793>
- Andersen-Ranberg, E., Berendt, M., & Gredal, H. (2021). Biomarkers of non-infectious inflammatory CNS diseases in dogs — Where are we now? Part I: Meningoencephalitis of unknown origin. *Veterinary Journal*, 273, 105678. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105678>
- Anderson, K. M., Welsh, C. J., Young, C., Levine, G. J., Kerwin, S. C., Boudreau, C. E., Reyes, I., Mondragon, A., Griffin, J. F., Cohen, N. D., & Levine, J. M. (2015). Acute Phase Proteins in Cerebrospinal Fluid from Dogs with Naturally-Occurring Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma*, 32(21), 1658–1665. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.3895>
- Bielekova, B., & Pranzatelli, M. R. (2017). Promise, Progress, and Pitfalls in the Search for Central Nervous System Biomarkers in Neuroimmunological Diseases: A Role for Cerebrospinal Fluid Immunophenotyping. *Seminars in Pediatric Neurology*, 24(3), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2017.08.001>
- Black, S., Kushner, I., & Samols, D. (2004). C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48487–48490. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400025200>
- Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>
- Briles, D. E., Forman, C., Horowitz, J. C., Volanakis, J. E., Benjamin, W. H., McDaniel, L. S., Eldridge, J., & Brooks, J. (1989). Antipneumococcal effects of C-reactive protein and monoclonal antibodies to pneumococcal cell wall and capsular antigens. *Infection and Immunity*, 57(5), 1457–1464. <https://doi.org/10.1128/iai.57.5.1457-1464.1989>
- Buser, F. C., Schweighauser, A., im Hof-Gut, M., Bigler, B., Marti, E., Mirkovitch, J., & Francey, T. (2019). Evaluation of C-reactive protein and its kinetics as a prognostic indicator in canine leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice*, 60(8), 477–485. <https://doi.org/10.1111/jsap.13004>
- Caspi, D.; Snel, F. W. J. J.; Batt Bennet, D.; Rutteman, G. R.; Hartman, E. G.; Baltz, M. L.; Gruys, E.; Pepys, B. M. (1987). C reactive protein in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 48, 919–921.
- Cerón, J. J., Eckersall, P. D., & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85–99. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>
- Chamoun, V., Zeman, A., Blennow, K., Fredman, P., Wallin, A., Keir, G., Giovannoni, G., & Thompson, E. J. (2001). Haptoglobins as markers of blood-CSF barrier dysfunction: The findings in normal CSF. *Journal of the Neurological Sciences*, 182(2), 117–121. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(00\)00461-5](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(00)00461-5)
- Cloquell M., Ana; Pampliega, Isidro M. (2010). Meningoencefalitis de origen desconocido en el perro. *Revista Médica de Chile*, 129, 647–652. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-221X2015000300013](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-221X2015000300013)
- Cornelis, I., van Ham, L., Gielen, I., de Decker, S., & Bhatti, S. F. M. (2019). Clinical presentation, diagnostic findings, prognostic factors, treatment and outcome in dogs with meningoencephalomyelitis of unknown ori-

- gin: A review. *Veterinary Journal*, 244, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.007>
- Cynthia, M.; Kahn, B. A. (2007). *Manual Merck de Veterinaria* (E. Océano, Ed.; 6° Edición).
- Dati, F., Schumann, G., Thomas, L., Aguzzi, F., Baudner, S., Bienvenu, J., Blaabjerg, O., Blirup-Jensen, S., Carlström, A., Petersen, P. H., Johnson, A. M., Milford-Ward, A., Ritchie, R. F., Svendsen, P. J., & Whicher, J. (1996). Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). International Federation of Cl. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry : Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(6), 517–520.
- de Riso, L., Bhatti, S., Muñana, K., Penderis, J., Stein, V., Tipold, A., Berendt, M., Farquhar, R., Fischer, A., Long, S., Mandigers, P. J. J., Matiasek, K., Packer, R. M. A., Pakozdy, A., Patterson, N., Platt, S., Podell, M., Potschka, H., Batlle, M. P., ... Volk, H. A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus proposal: Diagnostic approach to epilepsy in dogs. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0462-1>
- di Masi, A., de Simone, G., Ciaccio, C., D'Orso, S., Coletta, M., & Ascenzi, P. (2020). Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 73(March), 100851. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100851>
- Eaton, J. W., Brandt, P., Mahoney, J. R., & Lee, J. T. (1982). Haptoglobin: A natural bacteriostat. *Science*, 215(4533), 691–693. <https://doi.org/10.1126/science.7036344>
- Eckersall, P. D., & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal*, 185(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>
- Falcón-Cordón, Y., Tvarijonaviciute, A., Montoya-Alonso, J. A., Muñoz-Prieto, A., Caro-Vadillo, A., & Carretón, E. (2022). Evaluation of acute phase proteins, adiponectin and endothelin-1 to determine vascular damage in dogs with heartworm disease (*Dirofilaria immitis*), before and after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*, 309, 109759. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2022.109759>
- Fergestad, M. E.; Johr, T. H.; Krontreit, R. I.; Skancke, E. (2016). Serum concentration of gastrin, cortisol and C-reactive protein in a group of Norwegian sled dogs during training and after endurance racing: a prospective cohort study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(24).
- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 1–12. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320106>
- Gebhart, C.; Hirschberger, J.; Rau, S.; Arndt, G.; Kramer, K.; Schweigert, F. J.; Brunnberg, L.; Kaspers, B.; Kohn, B. (2009). Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(5), 450–458.
- Granger, N., Smith, P. M., & Jeffery, N. D. (2010). Clinical findings and treatment of non-infectious meningoencephalomyelitis in dogs: A systematic review of 457 published cases from 1962 to 2008. *Veterinary Journal*, 184(3), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.031>
- Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Aandus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265, 621–636.
- Jain, N. C. (1989). Acute phase proteins. En: Current veterinary Therapy X: Small animal practice. *W B Saunders, Philadelphia.*, 468–471.

- Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Södersten, F., & Wernersson, S. (2015). Multiplex cytokine analyses in dogs with pyometra suggest involvement of KC-like chemokine in canine bacterial sepsis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 170, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.005>
- Kasvosve, I., Speeckaert, M. M., Speeckaert, R., Masukume, G., & Delanghe, J. R. (2010). Haptoglobin Polymorphism and Infection. *Advances in Clinical Chemistry*, 50(10), 23–46. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(10\)50002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(10)50002-7)
- Kim, J., Otto, N., Conti, C. J., Gimenz-Conti, I. B., & Walker, C. L. (2012). ELISA. Methods and Protocols. Springer Protocols. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 821). [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-430-8_12)
- Kocaturk, M.; Tvarijonariciute, A.; Martinez-Subiela, S.; Tecles, F.; Eralp, O.; Yilmaz, Z.; Ceron, J. J. (2015). Inflammatory and aoxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 56(2), 119–124.
- Kushner, I.; Gewurz, H.; Benson, M. D. (1981). C-reactive protein and the acute phase response. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 97, 739–749.
- Kushner, I.; Mackiewicz, A. (1993). Acute Phase Response: an overview En: Acute Phase Protein. Molecular biology, biochemistry and clinical applications pp. *CRC Press London*, 3(19).
- Kwon, E. H., Tennagels, S., Gold, R., Gerwert, K., Beyer, L., & Tönges, L. (2022). Update on CSF Biomarkers in Parkinson's Disease. *Biomolecules*, 12(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom12020329>
- Lezmi, S., Toussaint, Y., Prata, D., Lejeune, T., Ferreira-Neves, P., Rakotovo, F., Fontaine, J. J., Marchal, T., & Cordonnier, N. (2007). Severe necrotizing encephalitis in a Yorkshire terrier: Topographic and immunohistochemical study. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 54(4), 186–190. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00925.x>
- Lowrie, M., Smith, P. M., & Garosi, L. (2013). Meningoencephalitis of unknown origin: investigation of prognostic factors and outcome using a standard treatment protocol. *Veterinary Record*, 172(20), 527. <https://doi.org/10.1136/vr.101431>
- Makimura, S. y Suzuki, N. (1982). Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Japanese Journal Veterinary Science*, 44, 15–21.
- Malin, K., & Witkowska-Piłaszewicz, O. (2022). C-Reactive Protein as a Diagnostic Marker in Dogs: A Review *Animals*, 12(20). <https://doi.org/10.3390/ani12202888>
- Martínez-Subiela, S., Caldin, M., Parra, M. D., Ottolini, N., Bertolini, G., Bernal, L. J., García-Martínez, J. D., & Cerón, J. J. (2011). Canine C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid by a time-resolved immunofluorimetric assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 63–67. <https://doi.org/10.1177/104063871102300109>
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M. D., & Cerón, J. J. (2001). Proteínas De Fase Aguda: Conceptos Básicos Y Principales Aplicaciones Clínicas En Medicina Veterinaria. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 97(17), 114.
- Martin-Vaquero, P.; C. da Costa, R.; j. Allen, M.; A. Moore, S.; K. Keirse, J. and B. Green, K. (2016). Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid in Canine Cervical Spondylomyelopathy. *Spine*, 40(9), 601–612. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000000831>. Proteomic
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: Correlation between

- symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6 51-6), 1328–1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>
- Méndez, J. C., Carretón, E., Martínez-Subiela, S., Tvarijonavičiute, A., Cerón, J. J., & Montoya-Alonso, J. A. (2015). Acute phase protein response in heartworm-infected dogs after adulticide treatment. *Veterinary Parasitology*, 209(3–4), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.036>
- Meyer, D. J.; Harvey, J. W. (2007). *Medicina Laboratorial Veterinaria, Interpretación y diagnosis* (Elsevier, Ed.; 3o Edición).
- Morales, C., & Montoliu, P. (2012). *Neurología Canina y Felina* (M. E. Veterinarias, Ed.; 1o Edición).
- Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., & Tsujimoto, H. (2008). C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(2), 127–131. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.127>
- Nessler, J. N., Jo, W. K., Osterhaus, A. D. M. E., Ludlow, M., & Tipold, A. (2021). Canine Meningoencephalitis of Unknown Origin—The Search for Infectious Agents in the Cerebrospinal Fluid via Deep Sequencing. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.645517>
- Oh, S. K., Pavlotsky, N., & Tauber, A. I. (1990). Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *Journal of Leukocyte Biology*, 47(2), 142–148. <https://doi.org/10.1002/jlb.47.2.142>
- Oliphant, B. J., Barnes Heller, H. L., & White, J. M. (2017). Retrospective Study Evaluating Associations Between Midline Brain Shift on Magnetic Resonance Imaging and Survival in Dogs Diagnosed With Meningoencephalitis of Unknown Etiology. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 58(1), 38–43. <https://doi.org/10.1111/vru.12434>
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15(7), 673–684. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00070-3)
- Pannen, B. H. J.; Robotham, J. L. (1995). The acute-phase response. *New Horizons*, 3, 183–197.
- Pardo-Marin, L., Ceron, J. J., Tecles, F., Baneth, G., & Martínez-Subiela, S. (2020). Comparison of acute phase proteins in different clinical classification systems for canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109958>
- Pellegrino, F.; Suraniti, A.; Garibaldi, L. (2003). *El libro de la Neurología para la Práctica clínica* (E. Intermédica, Ed.; 1o Edición).
- Polizopoulou, Z. S.; Koutinas, C. K.; Ceron, J. J.; Tvarijonavičiute, A.; Martínez-Subiela, S.; Dasopoulou, A.; York, M. J.; Roman, I. F.; Gandhi, M.; Patel, S.; O'Brien, P. J. (2015). Correlation of serum cardiac troponin I and acute phase protein concentrations with clinical staging in dogs with degenerative mitral valve disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(3), 397–404.
- Portero F., M. (2018). *Biomarcadores en líquido cefalorraquídeo en perros con meningoencefalitis de origen desconocido. Valor pronóstico*. 295. <https://eprints.ucm.es/49911/1/T40547.pdf>
- R. Platt, Simon y J. Olby, Natasha. (2008). *Manual de Neurología en pequeños animales* (E. S, Ed.; 2o Edición).
- Reimann, M J, Ljunguall, I.; Hillstrom, A; Moller, J. E.; Hogman, R.; Falk, T.; Hogland, K.; Haggstrom, J.; Olsen, L. H. (2016). Increases serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart fail-

- ure due to myxomatous mitral valve disease. *Veterinary Journal*, 209, 113–118.
- Rikihisa, Y.; Yamamoto, S.; Kwak, I.; Iqbal, Z.; Kociba, G.; Mott, J.; Chichanasiriwithaya, W. (1994). C-reactive protein and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 912–917.
- Satoh, H., Yamato, O., Asano, T., Yonemura, M., Yamauchi, T., Hasegawa, D., Orima, H., Arai, T., Yamasaki, M., & Maede, Y. (2007). Cerebrospinal fluid biomarkers showing neurodegeneration in dogs with GM1 gangliosidosis: Possible use for assessment of a therapeutic regimen. *Brain Research*, 1133(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.039>
- Schatzberg, S. J. (2010). Idiopathic Granulomatous and Necrotizing Inflammatory Disorders of the Canine Central Nervous System. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(1), 101–120. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.09.003>
- Selting, K. A.; Sharp, C. R.; Ringold, R.; Knouse, J. (2015). Serum thymidine kinase 1 and C-reactive protein as biomarkers for screening clinically healthy dogs for occult disease. *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(4), 373–384.
- Shafie, I. N. F., McLaughlin, M., Burchmore, R., Lim, M. A. A., Montague, P., Johnston, P. E. J., Penderis, J., & Anderson, T. J. (2014). The chaperone protein clusterin may serve as a cerebrospinal fluid biomarker for chronic spinal cord disorders in the dog. *Cell Stress and Chaperones*, 19(3), 311–320. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0457-4>
- Shih, A. W. Y., Mcfarlane, A., & Verhovsek, M. (2014). Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *American Journal of Hematology*, 89(4), 443–447. <https://doi.org/10.1002/ajh.23623>
- Solter, P.; Hoffmann, W. E.; Hungerford; L. L.; Siegel, J. P. ; S., & Denis, S. H.; Dorner, J. L. (1991). Haptoglobin and Ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 1738–1742.
- Szalai, A. J., van Ginkel, F. W., Wang, Y., McGhee, J. R., & Volanakis, J. E. (2000). Complement-Dependent Acute-Phase Expression of C-Reactive Protein and Serum Amyloid P-Component. *The Journal of Immunology*, 165(2), 1030–1035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.1030>
- Waritani, T., Cutler, D., & Chang, J. (2020). Development of canine C-reactive protein assays. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 10–14. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00549-9>
- Whicher J. T. y Westacott, C. I. (1992). The acute phase response. En: *Biochemistry of Inflammation*. *Kluwer Academic Londres.*, 243–271.
- Yamamoto, S.; Shida, T.; Honda, M.; Ashida, Y.; Rikihisa, Y.; Odakura, M.; Hayashi, S.; Nomura, M.; Isayama, Y. (1994). Serum C-reactive protein and immuneresponses in dogs inoculated with bordetellabronchiseptica (phase-i cells). *Veterinary Research Communications*, 18, 347–357.
- Yamamoto, S.; Shida, T.; Miyaji, H.; Santsuka, H.; Fujise, H.; Mukawa, K.; Furukawa, E.; Nagae, T.; Naiki, M. (1993). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17, 85–93.
- Yang, J., Hamade, M., Wu, Q., Wang, Q., Axtehl, R., Giri, S., & Mao-Draayer, Y. (2022). Current and Future Biomarkers in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms23115877>