



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Diagnóstico Laboratorial em Animais de Companhia

Joana Margarida Beirão Isidoro

Orientação científica

Orientação interna| Professora Doutora Maria Cristina Calhau Queiroga

Orientação externa| Professora Doutora Josefina Maria Costa Parreira Cruz Coucelo

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área de especialização| *Análises laboratoriais de apoio a diagnóstico em Medicina Veterinária*

Relatório de Estágio Curricular

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Diagnóstico Laboratorial em Animais de Companhia

Joana Margarida Beirão Isidoro

Orientação científica

Orientação interna| Professora Doutora Maria Cristina Calhau Queiroga

Orientação externa| Professora Doutora Josefina Maria Costa Parreira Cruz Coucelo

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área de especialização| *Análises laboratoriais de apoio a diagnóstico em Medicina Veterinária*

Relatório de Estágio Curricular

Évora, 2018



Agradecimentos

Uma vez chegado o culminar deste longo percurso académico marcado pela elaboração e ulterior apresentação deste presente trabalho final de mestrado cumpre-me humildemente, prestar um agradecimento especial a todas as pessoas que sendo merecedoras da minha gratidão, tiveram em algum momento um papel basilar, ao longo do meu desenvolvimento pessoal e da minha formação académica.

*Primeiramente, começo por dirigir as minhas palavras de sentido agradecimento às docentes orientadoras. À **Sr^a Professora Doutora Cristina Queiroga**, minha orientadora interna da Universidade de Évora (UE), por me ter aceitado como sua orientanda, pelo acompanhamento prestado nas horas de desespero, pela disponibilidade exímia, peculiar paciência e compreensão mostradas desde sempre. Será sempre uma fonte de inspiração e modelo exímio de profissionalismo, a seguir no exercício da minha futura vida profissional. À **Sr^a Professora Doutora Josefina Coucelo**, minha orientadora externa do HVPT, por ter aceitado a minha orientação enquanto estagiária no seu laboratório e me ter possibilitado usufruir de todos os recursos disponíveis no campo de estágio, principalmente, por me ter permitido explorar as potencialidades do seu imprescindível microscópio ótico, bem como, pelos dados e material de estudo, gentilmente facultados para a elaboração deste trabalho.*

*À **Sr^a Dr.^a Michelle Paralta** e ao **Sr. Dr. Pedro Coucelo** por me terem possibilitado a realização do estágio e por me terem integrado desde início na sua equipa do Hospital Veterinário de Portimão (HVPT) permitido também, acompanhar diariamente a rotina hospitalar no contexto da sua prática clínica. Muito obrigada, pela simpatia, aprendizagem diária e pelo acolhedor acolhimento concedido durante estes últimos meses. A toda a **equipa do HVPT**, incluindo, os meus queridos colegas estagiários, pela forma como me receberam desde o primeiro dia, pela paciência demonstrada por todos, pela troca de conhecimentos, constante aprendizagem e momentos de verdadeiro bom humor que me proporcionaram.*

*Aos colegas **Carolina Gregório, Dr. Cláudio Grou, Dr.^a Carolina Rocha, Dr.^a Telma Gomes e Dr. Miguel Rodrigues** e à querida **Sara Moreira** agradeço imenso a vossa preciosa colaboração, pela cedência de algum material imprescindível e pelas bases científicas que me facultaram, que foram determinantes para a delimitação e arranque do trabalho desenvolvido.*

*Aos **colegas** e amigos de curso que me apoiaram e acompanharam durante todo este trajeto.*

*Ao meu **núcleo familiar** que me edificou, que é o cerne da minha vida: aos Pais, irmãs, cunhado e aos dois pequenos sobrinhos, Lara e Afonso (meus raios de luz), a quem dedico este trabalho académico. Indubitavelmente, não é passível de ser transmitido apenas por palavras todo o apoio que me concederam ao longo do meu ciclo de estudos, todas as condições que me proporcionaram o alcance dos objetivos traçados, toda a paciência e compreensão nos momentos de maior desalento. Por último, não de somenos relevância, ao meu amigo **Dr. Jorge Gasalho** pelo vital apoio demonstrado durante o término desta etapa e pela motivação inculcada.*

Resumo

Diagnóstico laboratorial em animais de companhia

O presente relatório visa a descrição das atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular no âmbito do diagnóstico laboratorial em animais de companhia, realizado no Hospital Veterinário de Portimão. O mesmo encontra-se dividido em três partes principais: a primeira expõe a casuística observada durante o estágio, sendo apresentada uma descrição estatística dos procedimentos acompanhados e realizados pela autora. A segunda parte abrange uma revisão bibliográfica subordinada ao tema exame citológico no diagnóstico de neoplasias: aplicação em dermatologia oncológica. A terceira parte, apresenta o relato e discussão de um estudo de caso sobre cistoadenoma das glândulas apócrinas observado num paciente canino durante o período de estágio. A análise citológica em Medicina Veterinária tem mostrado ser um dos mais preciosos auxiliares de diagnóstico oncológico na prática clínica de animais de companhia. Porém, o recurso a outras técnicas coadjuvantes, frequentemente, revela-se crucial para a obtenção de um diagnóstico definitivo.

Palavras-chave: diagnóstico laboratorial; animais de companhia; citologia; dermatologia oncológica; cistoadenoma das glândulas apócrinas.

Abstract

Laboratory diagnosis in companion animals

This report aims to describe the activities carried out during the traineeship in the scope of laboratory diagnosis in companion animals which took place at Hospital Veterinário de Portimão. The report is divided in three main parts: the first one addresses the casuistry observed during the traineeship, presenting a statistical description of the procedures followed and performed by the author. The second part concerns a bibliographical review subordinated to the theme cytological exam in the diagnosis of neoplasias: application in oncological dermatology. The third part is the report and discussion of a case study on apocrine gland cystadenoma, observed in a canine patient during the internship period.

Cytological analysis in Veterinary Medicine has shown to be one of the most valuable oncological diagnosis aids in the clinical practice of companion animals. However, the use of other coadjuvant techniques often proves to be crucial for a definitive diagnosis.

Keywords: laboratory diagnosis; companion animals; cytology; oncological dermatology; apocrine gland cystadenoma.

Índice geral

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract - Laboratory diagnosis in small animal.....	II
Índice geral	III
Índice de figuras	V
Índice de gráficos	VII
Índice de quadros	VII
Índice de tabelas.....	VIII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	VIII
Introdução geral.....	1
Parte 1. Relatório descritivo do estágio	2
1.1. Apresentação do local de estágio	2
1.2. Enquadramento das atividades diárias desenvolvidas	4
1.2.1. <i>Objetivos do estágio</i>	4
1.2.2. Descrição das atividades contempladas no estágio	5
1.3. Casuística.....	7
1.3.1. Análise global da casuística acompanhada	8
1.3.2. Casuística distribuída por diferentes exames auxiliares de diagnóstico e por espécie animal.....	9
1.3.2.1. <i>Análises hematológicas</i>	9
1.3.2.2. <i>Bioquímica sérica</i>	14
1.3.2.3. <i>Testes rápidos de imunocromatografia</i>	18
1.3.2.4. <i>Testes dermatológicos</i>	19
1.3.2.5. <i>Urianálise</i>	22
1.3.2.6. <i>Análises parasitológicas</i>	25
1.3.2.7. <i>Análises citológicas</i>	29
1.3.2.8. <i>Testes imunológicos</i>	32
1.3.2.9. <i>Análises microbiológicas</i>	33
1.3.2.10. <i>Análises histopatológicas</i>	36
1.3.2.11. <i>Análises endocrinológicas</i>	39
1.3.2.12. <i>Testes de diagnóstico molecular</i>	41
1.3.2.13. <i>Provas de coagulação sanguínea</i>	42
1.3.2.14. <i>Outros exames complementares de diagnóstico</i>	44
1.3.3. Casuística relativa às neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas durante o estágio com o auxílio do exame citológico.....	47

Parte 2. Exame citológico no diagnóstico de neoplasias: Aplicação em dermatologia oncológica.....	51
2.1. Introdução à dermatologia oncológica	51
2.2. Revisão anatômica e histológica da pele e anexos cutâneos	52
2.3. Descrição das alterações macroscópicas da pele no estabelecimento de diagnósticos diferenciais	55
2.4. Classificação histológica das neoplasias cutâneas e subcutâneas.....	56
2.4.1. Origem celular e tipo histológico das lesões neoplásicas da pele	56
2.4.2. Características citológicas gerais dos distintos tipos tumorais	58
2.4.2.1. Neoplasias com origem epitelial.....	55
2.4.2.2. Neoplasias com origem nas estruturas anexas à pele.....	59
2.4.2.2.1. Neoplasias com origem no folículo piloso.....	59
2.4.2.2.2. Neoplasias com origem nas glândulas anexas.....	60
2.4.2.3. Neoplasias com origem em glândulas especializadas	61
2.4.2.4. Neoplasias com origem mesenquimatosa.....	62
2.4.2.5. Neoplasias com origem em células redondas.....	63
2.4.2.6. Neoplasias com origem melanocítica.....	65
2.4.3. Lesões cutâneas que mimetizam nódulos cutâneos tumorais	66
2.4.3.1. Lesões não neoplásicas cutâneas com caráter nodular	66
2.4.4. Lesões cutâneas de caráter inflamatório	66
2.5. O exame citológico como meio auxiliar de diagnóstico em neoplasias cutâneas	67
2.5.1. Diretrizes gerais no diagnóstico citopatológico	68
2.5.2. Padrões arquitetónicos celulares e aspetos histológicos	70
2.5.3. Avaliação e interpretação citológica de lesões neoplásicas	71
2.5.3.1. Critérios citológicos de malignidade celular	72
2.5.4. Técnicas de colheita e processamento de amostras biológicas para análise citológica.....	74
2.5.4.1. Técnica de impressão ou aposição	74
2.5.4.2. Técnica de Punção por Agulha Fina	75
2.5.4.2.1. Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)	76
2.5.4.2.2. Técnica não aspirativa.....	77
2.5.4.3. Técnicas de esfregaços para análise citológica.....	77
2.5.4.3.1. Técnica do esmagamento ou <i>squash</i>	78
2.5.4.3.2. Técnica do esfregaço sanguíneo.....	79
2.5.5. Fixação e coloração específica de preparações citológicas	79
2.5.6. Preservação definitiva das amostras citológicas em lâmina.....	77
2.5.7. Metodologia de envio de amostras para exame citopatológico	82
2.5.8. Principais erros técnicos em citologia oncológica veterinária	83
2.5.9. Vantagens e limitações diagnósticas da análise citológica.....	84

2.5.10. Relatório citológico: considerações relevantes	85
2.5.11. Aplicação clínica do diagnóstico citopatológico e do estadiamento tumoral na classificação de neoplasias cutâneas	86
2.5.11.1. Valor diagnóstico do exame citológico em oncologia veterinária.....	86
2.5.11.2. Estadiamento clínico das neoplasias cutâneas.....	87
2.5.11.2.1. <i>Sistema de estadiamento tumoral de tumores malignos</i>	88
2.6. Outros métodos de diagnóstico complementares à citologia oncológica	90
2.6.1. <i>A Análise histopatológica (AH)</i>	90
2.6.2. <i>O Citobloco (CB)</i>	92
2.6.3. <i>A Imunocitoquímica (ICQ) e a Imunohistoquímica (IHQ)</i>	94
Parte 3. A propósito de um estudo de caso: Abordagem diagnóstica	96
3.1. Relato de caso clínico: <i>Cistoadenoma das glândulas apócrinas (CGA)</i>	96
3.2. Discussão e considerações finais	99
Conclusão	104
Perspetivas futuras	105
Bibliografia	105

Índice de figuras

Figura 1. Hospital Veterinário de Portimão.	2
Figura 2. Laboratório do Hospital Veterinário de Portimão.	4
Figura 3. Equipamento e materiais usados para realização de análises bioquímicas, centrifugação de fluídos e urianálise	4
Figura 4. Atividades desenvolvidas pela estagiária	5
Figura 5. Hemocítmetro (câmara de Neubauer modificada)	12
Figura 6. Tubos de microhematócrito após centrifugação	12
Figura 7. Esfregaço sanguíneo	13
Figura 8. Alterações morfológicas eritrocitárias e leucocitárias detetadas em esfregaços de sangue periférico de canídeos e felídeos	14
Figura 9. Amostras de sangue centrifugado de felídeo.	17
Figura 10. Diversos testes rápidos de imunocromatografia utilizados no HVPT	18
Figura 11. Técnica de rolamento da zaragatoa para extensão de material sobre uma lâmina de vidro	21
Figura 12. Tipos de análises urinárias	24
Figura 13. Fotomicrografias de sedimentos urinários realizados no HVPT	24
Figura 14. Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos com presença de hemoparasitas.....	27
Figura 15. Técnica de raspagem cutânea profunda para exame parasitológico	28
Figura 16. Fotomicrografias de ectoparasitas diagnosticados por raspagem cutânea.....	29

Figura 17. Imagens microscópicas de citologias realizadas no HVPT	30
Figura 18. Fotomicrografias de citologias de efusões cavitárias	31
Figura 19. Quilotórax drenado de pulmão de um canídeo adulto	31
Figura 20. Cultura para diagnóstico de dermatofitose	34
Figura 21. Morfologia característica dos fungos dermatófitos	35
Figura 22. Biópsia excisional de um nódulo cutâneo ulcerado	37
Figura 23. Principais técnicas de biópsias cutâneas realizadas em dermatologia veterinária..	38
Figura 24. Equipamento portátil para avaliação dos tempos de coagulação	44
Figura 25. Necrópsia de felídeo	46
Figura 26. Imagem microscópica de uma preparação citológica por aposição	46
Figura 27. Imagens de preparações citológicas realizadas no HVPT	49
Figura 28. Composição anatómica da pele de canídeo	53
Figura 29. Lesões típicas de lúpus eritematoso discóide num canídeo geriátrico.....	55
Figura 30. Imagem ilustrativa dos diferentes tipos celulares	57
Figura 31. Alguns tipos de neoplasias epiteliais	58
Figura 32. Imagem citológica ilustrativa de células neoplásicas de um Tricoblastoma.....	60
Figura 33. Imagem citológica ilustrativa de um adenoma sebáceo	61
Figura 34. Imagem de citologia aspirativa de um adenoma de glândula perianal em canídeo..	62
Figura 35. Imagens citológicas ilustrativas de alguns tipos de neoplasias mesenquimatosas..	63
Figura 36. Representação esquemática dos cinco tipos de neoplasias com origem em células redondas.....	64
Figura 37. Imagens citológicas ilustrativas dos cinco tipos de neoplasias das células redondas	64
Figura 38. Imagens citológicas de aspirados de dois tipos de melanomas	66
Figura 39. Diretrizes orientadoras na avaliação citológica.....	69
Figura 40. Imagens ilustrativas de diferenciados aspetos morfológicos celulares	70
Figura 41. Aspeto microscópico das células em citologia e histopatologia	71
Figura 42. Exemplos de padrões arquitetónicos celulares.....	71
Figura 43. Principais critérios de malignidade celular	73
Figura 44. Ilustração de uma preparação citológica pela técnica de impressão	75
Figura 45. Técnicas de PAF não aspirativas e aspirativas	76
Figura 46. Técnicas de preparação citológica.....	78
Figura 47. Método de coloração por <i>Diff -Quik</i> ®.....	79
Figura 48. Etapas basilares da técnica de coloração <i>Diff- Quik</i> ®.....	81
Figura 49. Diferentes tipos de caixas de plástico para acondicionamento de lâminas citológicas destinadas a expedição.....	83
Figura 50. Representação esquemática das etapas do método agar para preparação de CB.....	93
Figura 51. Imagens citológicas da lesão obtidas por PAAF	98

Figura 52. Peça cirúrgica extirpada da região cervical dorsal do canídeo, conservada em formalina.....	99
---	----

Índice de gráficos

Gráfico 1. Áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas durante o estágio	8
Gráfico 2. Análises hematológicas assistidas	10
Gráfico 3. Análises bioquímicas observadas durante o estágio	15
Gráfico 4. Análises bioquímicas observadas em função da espécie animal	15
Gráfico 5. Testes rápidos de imunocromatografia realizados distribuídos por espécie animal.....	18
Gráfico 6. Análises citológicas acompanhadas, em função da espécie animal	29
Gráfico 7. Testes imunológicos observados	33
Gráfico 8. Tipos de biópsias cutâneas realizados no HVPT durante o período de estágio.....	36
Gráfico 9. Biópsias cutâneas realizados no HVPT em função da espécie animal	36
Gráfico 10. Testes de biologia molecular observados	41
Gráfico 11. Outros exames auxiliares de diagnóstico observados	45
Gráfico 12. Neoplasias cutâneas benignas e malignas diagnosticadas em canídeos	48
Gráfico 13. Neoplasias cutâneas benignas e malignas diagnosticadas em felídeos	48
Gráfico 14. Distribuição das neoplasias em raças puras ou cruzadas	50
Gráfico 15. Distribuição das neoplasias por sexo	50

Índice de quadros

Quadro 1. Objetivos específicos da realização do estágio em laboratório interno hospitalar ..	5
Quadro 2. Principais análises requeridas pelo HVPT ao laboratório externo DNAtch durante o período de estágio.....	7
Quadro 3. Algumas das alterações hematológicas observadas num esfregaço sanguíneo	14
Quadro 4. Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à origem das efusões.....	30
Quadro 5. Interpretação diagnóstica de uma placa de DTM do <i>kit</i> Uranovet® Dermatofitos.....	35
Quadro 6. Diferenças entre os principais tipos de métodos usados em biópsia cutânea	38
Quadro 7. Interpretação dos resultados esperados em diferentes provas de coagulação sanguínea em alguns distúrbios hemostáticos mais frequentes	44
Quadro 8. Principais objetivos da realização de uma necrópsia a um animal.....	45
Quadro 9. Interpretação geral das características citológicas	69
Quadro 10. Vantagens dos corantes do tipo Romanowsky	80
Quadro 11. Colorações específicas usadas em citologia	81
Quadro 12. Vantagens e limitações da análise citológica.....	85
Quadro 13. Estruturação de um relatório citológico	86

Quadro 14. Aspetos histológicos avaliados por análise histopatológica.....	91
Quadro 15. Principais vantagens e limitações diagnósticas do método de citobloco em citologia.....	94

Índice de tabelas

Tabela 1. Testes dermatológicos realizados	20
Tabela 2. Contagens obtidas por campo com Obj. x40 de células epiteliais, bactérias, leveduras e neutrófilos em situação normal e em existência de otite	22
Tabela 3. Análises de urina e de cálculos urinários realizadas	22
Tabela 4. Análises parasitológicas realizadas.....	26
Tabela 5. Classificação das efusões cavitárias quanto às suas características principais.....	32
Tabela 6. Análises microbiológicas observadas.....	33
Tabela 7. Análises endocrinológicas realizadas.....	39
Tabela 8. Provas de coagulação sanguínea realizadas.....	42
Tabela 9. Principais tipos de neoplasias cutâneas diagnosticadas quanto à sua classificação histológica.....	48
Tabela 10. Distribuição das faixas etárias dos pacientes diagnosticados com neoplasias cutâneas no HVPT	50
Tabela 11. Características citológicas das neoplasias de células redondas	65
Tabela 12. Critérios de malignidade celular	72
Tabela 13. Classificação TNM dos tumores cutâneos (OMS).....	89

Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

AAP- Adenoma apócrino	AMYL - Amilase
ACGA- Adenocarcinoma das glândulas apócrinas	APTT - <i>Activated partial thromboplastin time</i> (Tempo de tromboplastina parcial ativada)
Ac- Anticorpo	AST- Aspartato aminotransferase
ACSA - Adenocarcinoma dos sacos anais	BC - Biópsia cutânea
ACTH - <i>Adrenocorticotropic Hormone</i> (Hormona adrenocorticotrófica)	BUN - <i>Blood Urea Nitrogen</i> (Ureia no sangue)
ADA - Adenoma ductal apócrino	Ca - Cálcio
ADS - Adenoma sebáceo	CAMV- Centro de atendimento médico veterinário
Ag- Antígeno	CB - <i>Cell block</i> (Citobloco)
AH- Análise histopatológica	CBC - <i>Complete blood count</i> (Hemograma)
ALB- Albumina	Céls. - Células
ALB/GLOB- Rácio albumina/ globulina	
ALT - Alanina aminotransferase	

CGA - Cistoadenoma das glândulas apócrinas	Fr - Frequência relativa
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média	FvW - Fator de Von Willebrand
CID - Coagulação intravascular disseminada	G - Gauge
CI - Cloro	GGT - Gama glutamil transferase
CK - <i>Creatinine kinase</i> (Creatinina quinase)	gls. - Glândulas
cPLI - <i>Canine Lipase Immunoreactivity</i> (Imunorreatividade à lipase pancreática canina)	GLI - Glicose
CPN - Coloração de Papanicolau	GLOB - Globulinas
CREA - Creatinina	GMS - Coloração de Giemsa
DH - Desordens hemostáticas	HCM - Hemoglobina corpuscular média
DQ - Coloração <i>Diff - Quik</i>	HCO₃⁻ - Bicarbonato
DTM - <i>Dermatophyte test medium</i> (meio de teste para dermatófitos)	Hct - Hematócrito
EDTA - <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilendiamino tetra-acético)	HE - Hematoxilina e Eosina
ELISA - <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)	Hgb - Hemoglobina
EP - Epitelioma sebáceo	HTC - Histiocitoma cutâneo
ESP - Esfregaço de sangue periférico	HVPT - Hospital Veterinário de Portimão
FA - Fosfatase alcalina	IC - Insuficiência cardíaca
FeLV - <i>Feline Leukemia Virus</i> (vírus da leucemia felina)	ICQ - Imunocitoquímica
fL - Fentolítro	IF - Imunofluorescência
Fi - Frequência absoluta	IgE - Imunoglobulina E
Fip - Frequências absolutas parciais	IH - Insuficiência hepática
FIV - <i>Feline immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência felina)	IHC - Imunohistoquímica
FIV-FeLV - Síndrome de imunodeficiência felina e leucemia felina	K - Potássio
fPLI - <i>Feline Pancreatic Lipase Immunoreactivity</i> (Imunorreatividade à lipase pancreática felina)	LAC - Lactato
FPV - <i>Feline Panleukopenia Virus</i> (Vírus da Panleucopénia felina)	LC - Linfoma cutâneo
	LCR - Líquido cefalorraquidiano
	LDH - Lactato desidrogenase
	LIPA - Lipase
	Lnn. - Linfonodos
	Mg - Magnésio
	MTC - Mastocitoma cutâneo
	n - Número total de casos assistidos
	Na - Sódio
	Na/K - Rácio Sódio: Potássio
	N:C - Rácio Núcleo:citoplasma
	NH₃ - Amónia
	OMS - Organização Mundial de Saúde
	P - Fósforo
	PAF - Punção por agulha fina
	PAAF - Punção aspirativa por agulha fina

PB- Perfis bioquímicos	(Anticorpos contra tiroglobulina)
PCR- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de polimerase em cadeia)	TNM - Tumor-Node-Metastasis <i>Classification</i> (Classificação internacional Tumor-Linfonodos-Metástases)
PET/TC - Positron Emission <i>Tomography/Computed Tomography</i> (Tomografia por Emissão de Positrões)	TP- <i>Prothrombin time</i> (Tempo de protrombina)
pg- Picograma	TSA- Teste de sensibilidade a antibióticos
PMC- Plasmocitoma cutâneo	TSH - Thyroid-stimulating hormone (Hormona tiroestimulante)
PGE - Polietilenoglicol	TVT- <i>Transmissible Venereal Tumor</i> (Tumor venéreo transmissível)
PT- Proteínas totais	UA - Ácido úrico
RC- Raspagem cutânea	UAn - Urianálise
RDW- <i>Red cell distribution width</i> (Índice de variação do tamanho dos eritrócitos)	UÉ- Universidade de Évora
rpm - Rotações por minuto	UPC- <i>Urine protein creatinine</i> (Rácio proteína urinária/creatinina urinária)
SCC - Squamous cell carcinoma (Carcinoma das células escamosas)	URE - Ureia
STS - Soft Tissue Sarcomas (Sarcomas dos tecidos moles)	USG - Urine specific gravity (Densidade urinária específica)
TAC- Tomografia axial computadorizada	VCM - Volume corpuscular médio
TBIL- Bilirrubina total	vDW - Doença de Von Willebrand
TCA- Tempo de coagulação ativada	VPM - Volume plaquetário médio
TD- Testes dermatológicos	
TgAA- <i>Antibodies against thyroglobulin</i>	

Introdução geral

O presente relatório resulta da realização do estágio curricular inerente ao décimo primeiro semestre do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora (UÉ), tendo sido orientado pela Professora Doutora Cristina Queiroga. O estágio decorreu na região do Algarve, no laboratório do Hospital Veterinário de Portimão (HVPT), sob orientação científica da Professora Doutora Josefina Coucelo, na área de diagnóstico laboratorial em clínica de animais de companhia. A duração do estágio foi de quatro meses com início no dia 24 de Outubro de 2016 e término a 24 de Fevereiro de 2017, tendo sido efetuado num horário diário rotativo, incluindo períodos diurnos, noturnos, fins-de-semana e feriados.

O objetivo central do estágio realizado em contexto hospitalar consistiu sumariamente, na aplicação orientada de conhecimentos teóricos de análises laboratoriais de apoio ao diagnóstico clínico, obtidos durante todo o mestrado, através da integração num Centro de Atendimento Médico Veterinário (CAMV) com laboratório próprio. A elaboração do presente relatório de estágio constitui o resultado final da aquisição e consolidação de competências teórico-práticas, bem como, da integração de novos conhecimentos que puderam ser assimilados, resultando da reunião de todos os dados e informação clínica, que foram sendo recolhidos, ao longo de quatro meses de trabalho.

Este relatório encontra-se dividido em três partes fundamentais. A primeira parte do relatório reflete de uma forma objetiva, todas as atividades realizadas englobando a descrição geral das instalações do local de estágio elegido, uma análise global da casuística acompanhada nas diferentes áreas de diagnóstico laboratorial assistidas, bem como, uma análise estatística geral das neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas com o auxílio do exame citológico, durante o estágio. A segunda parte do trabalho, integrada na área de especialização elegida, apresenta um enquadramento teórico e uma revisão de literatura atualizada, focada no tema “*Exame citológico no diagnóstico de neoplasias: Aplicação em dermatologia oncológica*”. Por fim, a terceira e última parte apresenta a abordagem diagnóstica e discussão de um relato de caso clínico seguido no HVPT, enquadrado no tema de revisão bibliográfica.

Em suma, procura-se com este trabalho académico evidenciar a importância clínica da análise citológica enquanto uma ferramenta indispensável para o diagnóstico oncológico, no domínio da Medicina Veterinária, bem como, enfatizar o recurso a outras técnicas de diagnóstico coadjuvantes, para a obtenção de um diagnóstico definitivo em processos neoplásicos na pele e anexos cutâneos, nomeadamente, a análise histopatológica (AH), o citobloco (CB), a imunocitoquímica (ICQ) e a imunohistoquímica (IHQ), as quais têm providenciado um grande contributo na área da Oncologia Veterinária.

Parte 1. Relatório descritivo do estágio

1.1. Apresentação do local de estágio

I. Hospital Veterinário de Portimão (HVPT)

O HVPT surgiu há cerca de três anos na cidade de Portimão e caracteriza-se por ser o primeiro Hospital Veterinário do Barlavento Algarvio, o qual foi criado a pensar nas diversas lacunas existentes na área da Medicina Veterinária, na região do Algarve. Foi fundado em Janeiro de 2015 pela colaboração de três sócios-gerentes, que também desempenham função de Médicos Veterinários nesta empresa, a Doutora Josefina Coucelo (atual diretora clínica), o Dr. Pedro Coucelo e a Dr.^a Michelle Paralta.

O Hospital encontra-se sediado na Avenida Dom Afonso Henriques, nº 28, junto à zona ribeirinha de Portimão, em Portugal (**Figura 1**).



Figura 1 | Hospital Veterinário de Portimão – (A) exterior do Hospital e (B) sala de receção (In: <https://www.hospitalveterinariodeportimao.com/>).

Sendo atualmente um CAMV muito solicitado na região do Algarve, encontra-se aberto permanentemente durante 24 horas por dia, todos os dias do ano, fornecendo serviços médico-veterinários especializados, maioritariamente a animais de companhia (canídeos e felídeos), como também a animais exóticos, abrangendo diversas áreas clínicas. Para além disso, é um hospital que recebe com muita frequência animais em caráter de urgência médico-veterinária, em qualquer hora do dia, acolhendo ainda, vários casos referenciados de algumas clínicas veterinárias da região do Algarve.

A sua equipa pluridisciplinar é atualmente composta por nove Médicos Veterinários, três enfermeiras veterinárias, duas auxiliares veterinárias e duas rececionistas que asseguram o atendimento diário desde as nove às 21 horas, horário a partir do qual se inicia o serviço de urgência, o qual é assegurado sempre por, pelo menos, um Médico Veterinário interno, uma enfermeira e um estagiário de Medicina Veterinária, escalonado durante esse período.

No que concerne às instalações do HVPT, estas são compostas por dois pisos. No primeiro piso encontram-se três consultórios para cães e gatos separadamente, destinados à

medicina geral e de especialidades (um consultório para gatos, um para cães de médio e pequeno porte e um terceiro consultório, para cães de grande porte).

O HVPT dispõe de instalações apropriadas para acolher animais em regime de internamento, pré- e pós-cirúrgico, apresentando uma vasta área destinada a esse fim, funcionando como local de receção dos animais e recobro, a qual contempla uma área de internamentos para cães; uma área apenas para internamento de gatos, separada de uma área específica para internamento de pacientes com doenças infetocontagiosas e parasitárias; uma área de cuidados intensivos; uma sala de cirurgia (local onde também se praticam técnicas de mínima invasão, tais como a endoscopia flexível); uma sala de radiografia digital, dispondo também, de dois ecógrafos com *doppler* (portáteis) e de uma recente sala reservada exclusivamente para a realização de tomografia axial computadorizada (TAC). Para além disso, no segundo piso dispõe de uma sala de banhos e tosquiagem, bem como, de um laboratório próprio, local onde são realizadas todas as análises clínicas laboratoriais auxiliares de diagnóstico.

O Hospital possui também algumas áreas de apoio a toda a equipa, *i.e.*, uma ampla sala de receção e sala de espera, uma sala de reunião/ formação, também de refeições, bem como um quarto para médicos/enfermeiros/estagiários e auxiliares residentes. No que diz respeito à gestão de dados gerais, historial clínico dos pacientes e registo atualizado, efetuado durante as consultas de medicina interna, o HVPT dispõe de um sistema informático de gestão de dados, muito utilizado na área veterinária - o QVET® - o qual reúne toda a informação disponível relativa ao agendamento das consultas gerais e de especialidades, bem como, o registo de todas as cirurgias marcadas e respetivos procedimentos realizados por ordem cronológica.

II. Laboratório de análises clínicas do HVPT

Dado que o campo elegido para realização do estágio foi o laboratório do HVPT, de seguida será feita uma descrição sucinta das suas instalações e materiais de que dispõe, para assegurar a realização diária de análises clínicas de apoio à prática de medicina interna.

O **laboratório próprio do HVPT** encontra-se localizado no segundo piso do Hospital, estando espacialmente dividido em três áreas principais:

1. Uma **área de análises clínicas**, onde são efetuadas as análises sanguíneas, bioquímicas séricas e algumas análises endocrinológicas;
2. Uma **área reservada à realização de fixação e coloração** de todas as preparações citológicas para observação microscópica;
3. Uma **área de observação microscópica**, reservada à visualização de preparações citológicas em microscópio ótico composto (**Figura 2**).

É também, neste espaço que se encontram equipamentos e materiais essenciais para efetuar urianálise (*e.g.* tiras reativas de urina e refratómetro) e uma centrífuga destinada à realização de centrifugação de efusões corporais, sangue, urina, entre outros fluídos colhidos a partir dos pacientes internados ou em ambulatório (**Figura 3**).



Figura 2| Laboratório do HVPT. À esquerda (A), encontra-se a área reservada às análises bioquímicas e hemograma, ao centro (B), a área de preparação citológica e de urianálise e à direita (C), a área de observação microscópica (Cortesia de HVPT).



Figura 3| Equipamento e materiais usados para realização de análises bioquímicas, centrifugação de fluídos e urianálise - (A) analisador bioquímico IDEXX Catalyst® One™, (B) Centrífuga Pro-Vet® e (C) Refractómetro e tiras reativas de urina (Cortesia de HVPT).

1.2. Enquadramento das atividades diárias desenvolvidas

Esta primeira parte do relatório descritivo visa sobretudo relatar de uma forma clara, todas as atividades que a aluna estagiária acompanhou ou desempenhou, ao longo dos quatro meses de estágio no laboratório do HVPT.

Primeiramente, revela-se justificável identificar quais os principais objetivos a alcançar com a realização do estágio curricular, nesta fase final do mestrado.

1.2.1. Objetivos do estágio

O trabalho desenvolvido durante o estágio curricular teve como **principais objetivos** delineados, os seguintes: (i) o acompanhamento de todas as atividades ocorridas no quotidiano do laboratório do HVPT, sob orientação superior; (ii) a aplicação prática de vários meios laboratoriais complementares estudados no decorrer do mestrado integrado e que são rotineiramente usados como apoio ao diagnóstico em medicina interna de animais de companhia e de animais exóticos, efetuados em diferentes áreas de diagnóstico laboratorial veterinário, nomeadamente, em hematologia, parasitologia, citopatologia, urianálise, microbiologia e anatomopatologia.

Os **objetivos específicos** inicialmente traçados para a realização de um estágio de índole laboratorial na área da Medicina Veterinária, em contexto hospitalar foram os seguintes (**Quadro 1**).

Quadro 1 // Objetivos específicos da realização do estágio em laboratório interno hospitalar

Objetivos específicos

- I. Aprendizagem orientada da realização de análises clínicas;
- II. Observação e aplicação prática de diferentes técnicas de colheita de amostras para processamento e análise microscópica;
- III. Aprendizagem orientada dos princípios gerais de realização e interpretação de análises citológicas;
- IV. Compreensão e aplicação prática da execução das diferentes técnicas de preparação de esfregaços para análise citológica;
- V. Execução de técnicas de fixação e coloração específica de esfregaços citológicos;
- VI. Observação e execução de exames parasitológicos;
- VII. Visualização microscópica e realização de testes dermatológicos;
- VIII. Realização de análises de urina (tipo I e tipo II) e citologias urinárias;
- IX. Execução de técnicas de esfregaço sanguíneo, coloração específica, observação microscópica e posterior, interpretação diagnóstica das alterações morfológicas observadas;
- X. Realização de provas específicas de hematologia, tais como, provas de coagulação sanguínea e de tipificação sanguínea;
- XI. Realização de testes imunológicos rápidos de imunocromatografia e posterior, interpretação diagnóstica.

1.2.2. Descrição das atividades contempladas no estágio

No decorrer do estágio, a estagiária pode acompanhar o trabalho diário efetuado pelos clínicos internos e principalmente, o trabalho diário desempenhado pela sua orientadora de estágio – *Prof^a Doutora Josefina Coucelo*, enquanto responsável pelo laboratório do Hospital, no que diz respeito à colheita de amostras para análise, à sua preparação e processamento, conservação e metodologias adotadas. Tal permitiu à aluna estagiária observar diferentes formas de abordagem prática e, desta forma, chegar à conclusão de que existem vários métodos que podem ser utilizados para se obter um diagnóstico final.



Figura 4| Atividades desenvolvidas pela estagiária:
(A) Realização de análises bioquímicas e hemograma e (B) observação microscópica de preparação citológica. (Cortesia de Cláudio Grou, HVPT).

Deverá ser salientado que, sempre que se tornava necessário, a estagiária realizava um total de horas diárias algumas vezes superior ao estipulado, atendendo às solicitações de trabalho a desempenhar no momento ou por outro lado, sempre que esta considerasse de seu interesse, o acompanhamento de alguns casos clínicos relacionados com a sua área de estágio. À medida que a estagiária já se encontrava mais integrada no contexto de trabalho prático, teve a possibilidade de desenvolver mais a sua autonomia, no que concerne à realização de colheita

de sangue para análise hematológica e bioquímica sérica; à realização de esfregaços sanguíneos e outras preparações citológicas; à coloração específica para a sua observação microscópica e interpretação clínica permitindo estabelecer possíveis diagnósticos diferenciais (**Figura 4**) e diagnósticos presuntivos, o que se revelou indubitavelmente, bastante enriquecedor.

Não obstante, nos períodos do dia em que não existia muito trabalho laboratorial, a aluna estagiária acompanhava as consultas de medicina interna e prestava assistência no internamento dos pacientes hospitalizados. Deste modo, foi possível observar os quadros lesionais dos pacientes antes de proceder à colheita e realização de qualquer análise, o que permitiu criar uma enriquecedora ponte entre os achados clínicos e os achados a nível de diagnóstico laboratorial.

O recurso imprescindível a manuais de Patologia clínica que o HVPT dispunha, bem como o conhecimento transmitido pela orientadora e pelos clínicos Veterinários, foram essenciais para a integração de novos conhecimentos e reconhecimento de alguns erros práticos realizados. Ainda durante o estágio foi concedida a possibilidade de estimular a pesquisa científica por parte dos estagiários residentes, para formação pessoal e troca de conhecimentos teórico-práticos com a equipa do HVPT, através da apresentação de trabalhos, tendo a estagiária elaborado um trabalho subordinado ao tema: *“Contribuição das provas de coagulação sanguínea no diagnóstico de distúrbios hemostáticos em animais de companhia”*. O objetivo da realização deste trabalho prendeu-se com a aquisição de um conhecimento mais aprofundado, acerca das provas de coagulação sanguínea utilizadas como auxiliares no diagnóstico de afeções inerentes aos distintos mecanismos de hemostase, bem como à revisão das principais desordens hemostáticas que acometem os felídeos e os canídeos.

Os dados clínicos (*i.e.*, história clínica global do animal, sintomatologia manifestada, entre outras considerações relevantes para definição de um diagnóstico definitivo) obtidos acerca dos pacientes submetidos à realização de análises clínicas eram, previamente, transmitidos pelo clínico responsável de serviço ou, em algumas situações, recolhidos diariamente pela própria estagiária, a partir da ficha clínica dos animais em internamento no Hospital ou, em última instância, através de consulta da informação clínica, registada no QVET®. É importante salientar que para suprir algumas lacunas que o HVPT apresenta quanto à realização de alguns tipos de análises laboratoriais específicas, que não podem ser realizadas no local (por falta de meios apropriados para tal e devido às solicitações regulares deste tipo de análises), são semanalmente requeridas análises a laboratórios de referência, nomeadamente ao laboratório externo DNAtch (laboratório ao qual o HVPT recorre maioritariamente) e ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), este último especialmente para realização de titulações de anticorpos vacinais neutralizantes antirrábicos. De entre as análises requeridas ao DNAtch com maior frequência, destacam-se as apresentadas no **quadro 2**. Não obstante, deverá ser frisado que, sempre que possível eram realizados no HVPT todos os exames possíveis como primeira linha de diagnóstico, face aos meios disponíveis, não só para assegurar uma resposta rápida como, também, para permitir a emissão de um diagnóstico, muitas vezes,

presuntivo (visto não raras vezes, ser necessário recorrer a solicitação de uma segunda análise a laboratório externo, para confirmação mais rigorosa de um diagnóstico).

Quadro 2 Principais análises requeridas pelo HVPT ao laboratório externo DNAtch durante o período de estágio.	
Análises requisitadas ao DNAtch	
<ul style="list-style-type: none"> → Análises histopatológicas (e.g. biópsias cutâneas, de órgãos internos e biópsias de três fragmentos); → Provas endocrinológicas específicas (e.g. teste de supressão de dexametasona e doseamento sérico de cortisol, de ACTH e de TSH); → Análises microbiológicas (e.g. Culturas bacteriológicas para aeróbios e anaeróbios, testes de sensibilidade a antibióticos - TSA, urocultura e culturas micológicas); → Citologia geral (e.g. citologias de efusões, urinárias e de gânglios linfáticos; análise qualitativa de cálculos urinários e citologias de flutuação (exames de coprologia); 	<ul style="list-style-type: none"> → Testes imunológicos e de biologia molecular; → Provas de alergologia (e.g., <i>Screening</i> por <i>E-screen</i>, para pesquisa de imunoglobulina E (IgE) específica contra alérgenos ambientais); → Perfis analíticos específicos (e.g. perfil felino, perfil canino e perfil geriátrico); → Provas específicas de coagulação sanguínea (e.g. doseamento sérico de Fator de Von Willebrand – FvW e D- Dímero); → Algumas provas bioquímicas séricas específicas (e.g. doseamento de ácidos biliares pré- e pós-pandriais; doseamento de amónia e de colesterol; ionograma e proteinograma) incluindo, determinados parâmetros bioquímicos individuais.

Legenda: ACTH - Hormona adrenocorticotrófica ou corticotrofina; TSH - Hormona tiroestimulante ou tirotrófina.

1.3. Casuística

Nesta primeira secção do presente relatório de estágio será apresentada a casuística referente somente às atividades acompanhadas pela estagiária, durante as 20 semanas de estágio de índole laboratorial decorrido no HVPT, a qual é representativa do total de análises e outros procedimentos auxiliares de diagnóstico que foram efetuados diariamente, durante o horário de estágio. Inicialmente será exposta uma análise geral da casuística que foi observada, a qual integra todos os procedimentos práticos observados/efetuados pela estagiária, organizados por áreas de diagnóstico veterinário. Posteriormente, para uma melhor compreensão e categorização das diferentes áreas de intervenção assistidas ou realizadas procedeu-se a uma divisão da casuística em duas categorias principais: 1) *casuística alusiva aos diferentes exames auxiliares de diagnóstico acompanhados, distribuída por espécie animal* e 2) *casuística relativa às neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas com o auxílio do exame citológico durante o estágio, estando distribuída por espécie animal, idade, raça e sexo*.

No sentido de possibilitar uma apresentação clara do estudo estatístico, que se traduziu numa análise descritiva dos dados, estes estão apresentados em tabelas e gráficos e cada categoria foi subdividida, sendo que os resultados da casuística atinente a cada procedimento realizado são expressos através de **frequências absolutas (Fi)** que correspondem à totalidade de análises realizadas, **frequências absolutas parciais (Fip)** referentes a cada espécie animal (canídeos, felídeos e animais exóticos) e as respetivas **frequências relativas [Fr (%)]**, que expressam o valor percentual de análises observado em função do total de análises efetuado e o **número total de casos assistidos (n)**. Deverá ser salientado que o número total de casos assistidos se refere à totalidade da casuística observada (i.e. ao número de procedimentos/ análises realizados ou observados) e não representa o número de pacientes aos quais foram

realizadas análises clínicas, já que, poderão ter sido efetuados simultaneamente, vários exames de diagnóstico ao mesmo paciente, pelo que este poderá ter sido alvo de contabilização várias vezes, em cada subcategoria diagnóstica.

1.3.1. Análise global da casuística acompanhada

O número total de análises laboratoriais que constituíram um apoio auxiliar no diagnóstico em clínica de animais de companhia no HVPT, durante o período referido, correspondeu a um total de sensivelmente $n=3491$, tendo estas sido agrupadas por diferentes subcategorias diagnósticas, conforme é ilustrado no **gráfico 1**.

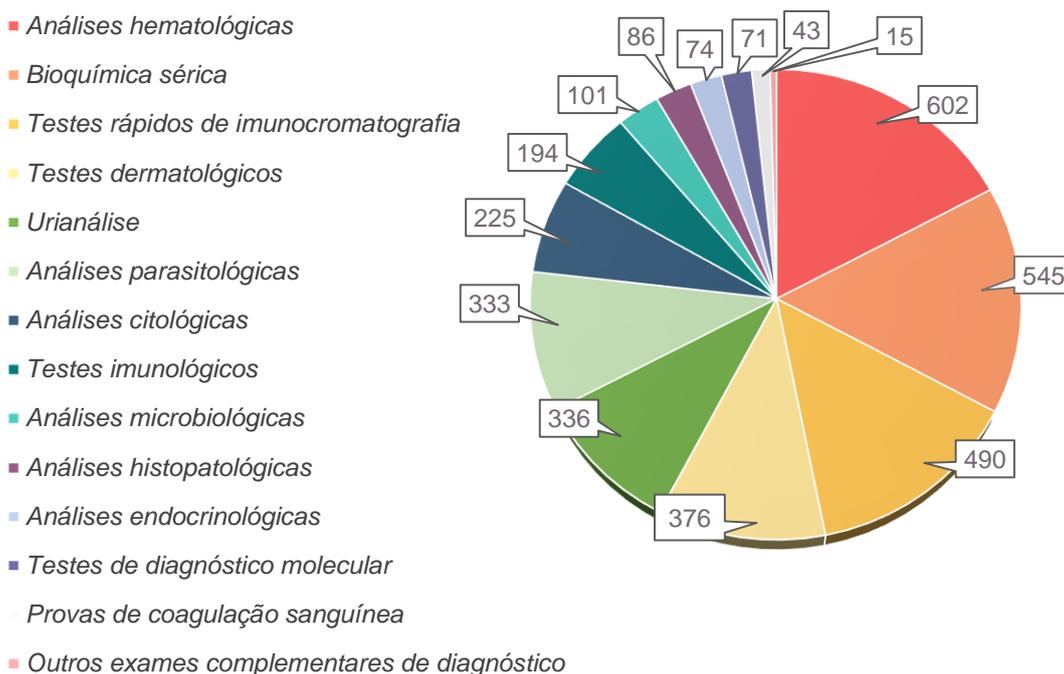


Gráfico 1. Áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas durante o estágio ($n=3491$).

Deverá ser enfatizado que todas as análises que foram requeridas a laboratórios externos e que a autora integrou na casuística aqui apresentada, ainda que algumas delas, não tenham sido realizadas efetivamente no local de estágio, a estagiária tomou parte integrante no processo de colheita, processamento, bem como na conservação das amostras biológicas, tendo como tal considerado pertinente ter procedido à sua contabilização no total de casos assistidos. Através da análise do **gráfico 1**, pode constatar-se que as áreas de diagnóstico laboratorial mais acompanhadas pela estagiária foram as de hematologia e de bioquímica sérica, as quais representaram 602 análises hematológicas ($Fr=17,24\%$) e 545 análises bioquímicas ($Fr=15,61\%$), respetivamente, do total da casuística relatada ($n=3491$). Estas duas áreas de diagnóstico apresentaram grande representatividade em relação às restantes análises acompanhadas, o que em termos práticos expressa uma grande percentagem do trabalho que é desenvolvido diariamente, num laboratório veterinário hospitalar, visto que, diariamente, são

colhidas dezenas de amostras de sangue aos animais em regime ambulatorio e aos que se encontram em regime de internamento. Deverá ser salientado o facto de que, ainda que tenham sido áreas muito acompanhadas durante o estágio, por preferência pessoal da autora, estas não serviram de objeto de investigação a ser explorado, no que concerne ao tema da monografia a ser apresentado.

1.3.2. Casuística distribuída por diferentes exames auxiliares de diagnóstico e por espécie animal

Nesta primeira categoria do relatório de casuística são apresentados os variados meios de diagnóstico acompanhados e também, realizados pela estagiária sob supervisão da orientadora ou de um Médico Veterinário de serviço, sendo exibida a sua distribuição por espécie animal *i.e.*: **canídeos** (*Canis lupus familiaris*); **felídeos** (*Felis catus*) e animais **exóticos** (que abrangem répteis, aves e pequenos mamíferos). As diferentes áreas de diagnóstico laboratorial encontram-se ordenadas e são relatadas de acordo com o grau de representatividade que denotaram.

Posteriormente, apresentar-se-á uma descrição sumária de alguns meios auxiliares de diagnóstico, a qual é sustentada por uma breve revisão bibliográfica, que representa uma fundamentação teórica para cada uma das subcategorias laboratoriais descritas. Não obstante, deverá ainda ser referido que algumas áreas de diagnóstico não serão explanadas em detalhe, em virtude da reduzida representatividade que evidenciaram, nomeadamente, as que não eram enquadráveis nas restantes subcategorias principais que serão abordadas, tendo sido por este motivo, integradas na subcategoria designada por “*Outros exames complementares de diagnóstico*”.

1.3.2.1. Análises hematológicas

As análises hematológicas integram a avaliação quantitativa e morfológica das células presentes no sangue periférico, através da realização de um hemograma ou *Complete blood count* (CBC) e da avaliação de um esfregaço sanguíneo, bem como contemplam a realização de provas hematológicas específicas, tais como a determinação do grupo sanguíneo por tipificação sanguínea (Kerr, 2002; Rosenfeld & Dial, 2010). Uma vez que os canídeos e os felídeos normalmente, apresentam um vasto leque de enfermidades em relação às outras espécies animais, o diagnóstico hematológico revela-se especialmente relevante na prática de medicina interna de pequenos animais (Torrance, 2000). Os principais procedimentos hematológicos realizados num laboratório veterinário intra-hospitalar são os seguintes: a realização de hemograma através de analisador hematológico; a determinação de hematócrito (Hct) por centrifugação e posterior avaliação; a mensuração das proteínas plasmáticas (PT) por refratómetro, bem como a preparação e exame microscópico de esfregaços de sangue periférico (ESP) (Weiser, 2015a).

Durante todo o estágio, a área da Hematologia foi uma das áreas de diagnóstico mais acompanhadas pela estagiária. Nesta componente de diagnóstico, o total de análises hematológicas registado durante o período de estágio, perfizeram aproximadamente, uma Fr=17% (n=602) do conjunto total de meios de diagnósticos assistidos, representando-se a sua distribuição no **gráfico 2**.

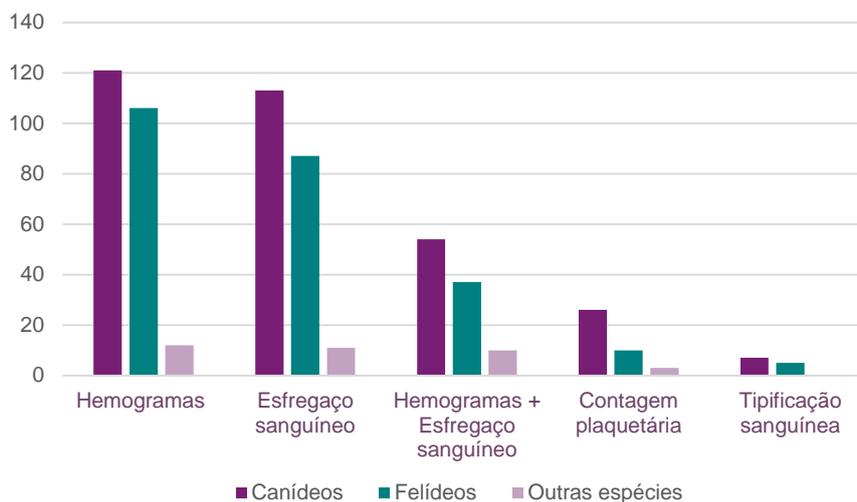


Gráfico 2. Análises hematológicas assistidas (n=602).

O conjunto de atividades alusivas à área da hematologia clínica, não só abrangeu a realização e interpretação de hemogramas, esfregaços sanguíneos, contagem plaquetária, como também a execução de testes rápidos de tipificação sanguínea, maioritariamente, em canídeos e felídeos. Não obstante, também foram efetuadas análises sanguíneas em “*outras espécies*” as quais incluíram aves, leporídeos, bem como outros animais exóticos.

Observando os dados representados no **gráfico 2** é claramente perceptível que de entre o total de análises hematológicas que foram realizadas no HVPT no período de estágio, a subcategoria “*hemogramas*” representou a análise mais efetuada, possuindo uma frequência relativa de 39,70% (n=239), seguida da subcategoria “*esfregaço sanguíneo*”, denotando uma frequência relativa de 34,88% (n=210). Ambas constituíram os dois meios auxiliares de diagnóstico hematológico com notória representatividade. Tal facto está intimamente associado à elevada prática destes meios de diagnóstico na rotina laboratorial e no exercício da prática clínica diária. Durante as atividades laboratoriais inerentes ao diagnóstico hematológico, a estagiária pode observar que, sempre que algum clínico interno solicitava a realização de um hemograma eram executados pelo menos dois esfregaços sanguíneos, tendo previamente especial atenção em proceder à colheita de uma amostra de sangue que fosse suficiente para poder efetuar essas duas análises simultaneamente.

Hemograma (Complete blood count – CBC) e esfregaço sanguíneo (avaliação da morfologia celular)

O CBC representa um meio de diagnóstico através do qual os componentes celulares sanguíneos são avaliados quantitativa e qualitativamente no seu todo, permitindo ao clínico Veterinário, aferir a mensuração analítica de forma automatizada de um conjunto específico de parâmetros hematológicos, de entre os quais, os eritrócitos, os leucócitos, as plaquetas em circulação sanguínea, bem como, a concentração de proteínas plasmáticas do paciente testado (Rosenfeld & Dial, 2010; Wellman & Radin, 2014). O CBC é composto por duas partes essenciais: (i) o eritrograma (integra os parâmetros que avaliam a linha eritrocitária) e (ii) o leucograma (parte do hemograma que contempla os parâmetros de avaliação da linha leucocitária) (Rosenfeld & Dial, 2010). Este perfil hematológico possibilita a deteção de algumas anomalias nas linhas celulares vermelha (eritrocitária) e branca (leucocitária), bem como de alterações plaquetárias associadas, muitas vezes, a defeitos ao nível da medula óssea vermelha. Para além de permitir diagnosticar condições patológicas como é o caso de anemias, leucemias, entre outras doenças sistémicas (Weiser, 2015b). A realização de um hemograma completo é um imprescindível elemento de diagnóstico para avaliação clínica, monitorização pré-anestésica ou como *check-up* de rotina de pacientes doentes, em caráter de urgência ou geriátricos, especialmente nos que são sintomáticos. Este exame pode indicar alterações sugestivas da existência de neoplasia subjacente, processo inflamatório em curso, stress, reação de hipersensibilidade, como também, de uma infeção parasitária ou processo de índole infecciosa, que possam estar presentes.

Tradicionalmente, a grande generalidade dos analisadores hematológicos possibilita a mensuração dos seguintes índices hematimétricos através de citometria de fluxo *i.e.*: a contagem total de eritrócitos (células/ μ L); o hematócrito (Hct) que representa o volume de eritrócitos (%) presentes no sangue; o volume corpuscular médio (VCM) mensurado em femtolitro (fL); a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) mensurada em grama por decilitro de eritrócitos (g/dL); a concentração de hemoglobina (Hgb) presente no interior dos eritrócitos em g/dL de sangue; a hemoglobina corpuscular média (HCM) em picograma (pg); o índice de variação que descreve o tamanho dos eritrócitos (RDW- *Red cell distribution width*) em %; a contagem relativa (em %) e absoluta de reticulócitos (células/ μ L); o número total de plaquetas (células/ μ L); o volume plaquetário médio (VPM) em fL, bem como, a contagem diferencial dos vários leucócitos (*i.e.* basófilos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) em % e em células/ μ L (contagem total absoluta) (Rosenfeld & Dial, 2010; Ruiz-Argüelles, 2014; Wellman & Radin, 2014).

A interpretação clínica dos resultados obtidos num hemograma completo é realizada, a partir de um registo numérico e gráfico, obtido através do analisador hematológico utilizado para o teste. As representações gráficas (histogramas) presentes no hemograma permitem avaliar visualmente a contagem de células sanguíneas completa, quer da linha vermelha quer da linha branca. O registo gráfico das contagens celulares é bastante útil para proceder à interpretação e

verificação dos resultados de modo rápido, comparativamente com os resultados numéricos padronizados, segundo um intervalo de referência distinto para cada espécie animal. O conjunto de informações obtidas através de uma avaliação sistemática do CBC proporciona uma visão global do estado geral de saúde do paciente. Deste modo, a identificação de anomalias nos resultados do CBC deve constituir um dos primeiros procedimentos a efetuar, bem como a posterior denominação e descrição científica adequada dessas alterações hematológicas. Sendo assim, é possível aferir se os resultados se encontram dentro dos valores de referência para a espécie em questão e, caso estejam acima ou abaixo desse intervalo, são considerados anormais (Weiss & Tvedten, 2004).

Uma vez que, algumas espécies animais (e.g. a generalidade das aves e dos répteis), denotam particularidades peculiares quanto à morfologia dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas (*i.e.*, apresentam nucleação destas células), as contagens celulares habitualmente, não são realizadas através de analisadores hematológicos. Para tal, recorre-se à execução de um hemograma manual para avaliação quantitativa do número de leucócitos e de eritrócitos por campo observados microscopicamente, utilizando o denominado **hemocitómetro** ou **câmara de Neubauer (Figura 5)**, pois estas células, não raras vezes, não são distinguidas pelos sistemas automáticos analíticos (Harvey, 2001; Weiser, 2015a). O hemocitómetro encontra-se dividido em duas partes, as quais deverão ser preenchidas com uma porção da amostra diluída.

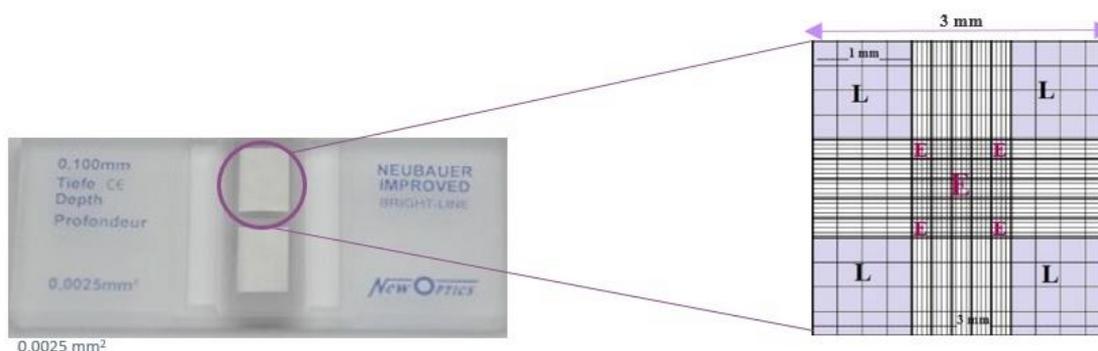


Figura 5| Hemocitómetro (câmara de Neubauer modificada) evidenciando a representação esquemática de uma porção da sua divisão, onde são efetuadas as contagens celulares sanguíneas: L - leucócitos; E - eritrócitos (Fotografia de autora).

De salientar que o número de hemogramas manuais realizado durante o estágio (n= 9), nomeadamente em aves, foi integrado na contabilização total de hemogramas efetuados. Um dos parâmetros hematológicos que também pode ser avaliado manualmente é o Hct constituindo esta determinação o denominado microhematócrito. O Hct manual é estimado através de uma escala de medição, após realização de centrifugação da amostra de sangue em anticoagulante, contida num tubo capilar de vidro, por forma a permitir a separação do plasma dos elementos figurados do sangue (Weiss & Tvedten, 2004; Weiser, 2015a). Após centrifugado, surgem três regiões distintas no tubo de microhematócrito, *i.e.*: o plasma, o *buffy coat* (linha branca formada pela deposição por gradiente de concentração, das plaquetas e dos leucócitos) e um agregado

de eritrócitos. Este método é fácil de realizar e providencia informação clínica muito útil, através da avaliação macroscópica do plasma a partir do tubo de microhematócrito. Algumas alterações comumente detetadas encontram-se ilustradas na **figura 6**, tais como, a lipémia, a hemólise e a icterícia (Weiss & Tvedten, 2004; Weiser, 2015a). Posteriormente, à determinação do Hct, pode proceder-se à mensuração das proteínas totais através de refratómetro, a partir de uma gota da coluna de plasma, obtida do tubo de microhematócrito previamente partido, abaixo da linha formada pelo *buffy coat* (Weiser, 2015a).

O ESP, também denominado de citologia de sangue periférico (**Figura 7**) é um exame basilar no diagnóstico em

hematologia, já que constitui uma parte determinante para proceder à contagem de células sanguíneas e à avaliação da morfologia celular (Rosenfeld & Dial, 2010), devendo ser preparado o mais rapidamente possível após a colheita da amostra de sangue e ser seco ao ar, para preservar a morfologia das células a observar (Weiss & Tvedten, 2004; Weiser, 2015a). Através



Figura 7 Esfregaço sanguíneo (Fotografia da autora).

do exame microscópico de um esfregaço sanguíneo corado por uma coloração do tipo Romanowsky, é possível proceder à contagem do número de plaquetas por campo, à identificação de agregados plaquetários, à contagem de reticulócitos e, fundamentalmente, à avaliação da morfologia leucocitária, eritrocitária e plaquetária, a fim de detetar possíveis alterações hematológicas que possam estar relacionadas com afeções sistémicas mascaradas (Kroft, 2002; Allison & Meinkoth, 2007; Rizzi *et al.*, 2010). Segundo a ótica dos autores, a realização rotineira deste exame de diagnóstico deveria constituir sempre um meio coadjuvante de um hemograma, já que é através dele que, muito frequentemente, conseguimos detetar alterações no número, morfologia e cromasia celulares que não são passíveis de serem detetados pela generalidade dos analisadores hematológicos utilizados em laboratório. De entre algumas alterações hematológicas que podem ser detetadas com recurso à avaliação microscópica de um esfregaço sanguíneo, destacam-se as evidenciadas na **figura 8** e referidas no **quadro 3**.



Figura 6 | Tubos de microhematócrito após centrifugação: (A) plasma hemolisado com leucocitose; (B) icterícia; (C) e D) hemólise; (E) lipémia (Imagem adaptada de Harvey, 2001)

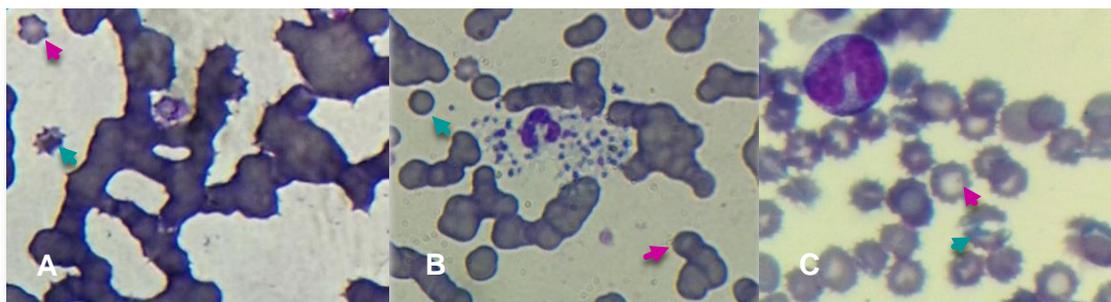


Figura 8| Alterações morfológicas eritrocitárias e leucocitárias detetadas em esfregaços de sangue periférico de canídeos e felídeos: (A) Equinócitos (seta rosa) e acantócitos (seta azul); (B) formações de rouleaux (seta rosa) e esferócitos (seta azul); (C) neutrófilo tóxico, acantócitos com hipocromasia (seta rosa) e esquizócitos (seta azul). DQ, x1000 (Cortesia de HVPT).

Quadro 3| Algumas das alterações hematológicas observadas num esfregaço sanguíneo
(Harvey, 2001; Weiss & Tvedten, 2004; Allison & Meinkoth, 2007)

Alterações hematológicas mais comuns

- a. **Policromasia** (aumento no número de policromatófilos visíveis no esfregaço)
- b. **Poiquilocitose** (aumento na variação da forma dos eritrócitos);
- c. **Hipocromasia** (aumento de palidez central nos eritrócitos);
- d. **Anisocitose** (variação no diâmetro dos eritrócitos);
- e. **Acantocitose** (aumento no número de eritrócitos com algumas espículas alongadas e espaçadas na superfície celular)
- f. **Esferocitose** (aumento no número de eritrócitos de reduzido diâmetro com forma esférica);
- g. **Equinocitose** (aumento no número de eritrócitos com forma espiculada à superfície, com espaçamento regular das projeções);
- h. **Esquizócitos** (fragmentos de eritrócitos consequentes de trauma intravascular);
- i. **Formações de Rouleaux** (formação de eritrócitos dispostos em forma de “pilha de moedas”);
- j. **Corpos ou corpúsculos de Howell-Jolly** (inclusões intra-eritrocitárias que são pequenos fragmentos nucleares esféricos e basófilicos) e **Corpos de Heinz** (inclusões intra-eritrocitárias marginais que consistem em precipitados de hemoglobina resultantes de lesão oxidativa);
- l. **Neutrófilos tóxicos** (neutrófilos com algumas alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas, associadas a defeitos na maturação, e.g. granulação tóxica e vacuolização tóxica).

1.3.2.2. Bioquímica sérica

As provas ou perfis bioquímicos (PB), quando empregues rotineiramente na prática clínica, são meios auxiliares de diagnóstico que nos transmitem informações cruciais acerca do estado de funcionalidade da generalidade dos vários sistemas orgânicos dos animais (Bellwood & Andrasik- Catton, 2014; Santa-Ana & Gómez, 2015). Num sentido lato, as análises bioquímicas baseiam-se na mensuração sérica de alguns grupos de parâmetros químicos (geralmente, denominados na prática, por painéis ou perfis analíticos), cujo nível sanguíneo observado é posteriormente, comparado com o intervalo de referência normal para cada espécie animal, a fim de determinar a possível existência de anomalias (e.g. disfunção na regulação de alguns eletrólitos ou de vários metabolitos). As alterações séricas detetadas poderão repercutir-se sistemicamente e alterar o equilíbrio interno do paciente (Bellwood & Andrasik-Cattón, 2014; Radin & Wellman, 2014).

Tal como pode ser observado no **gráfico 1**, do total de análises realizadas no laboratório do HVPT, a segunda área de diagnóstico mais acompanhada no decorrer do estágio curricular foi a área das análises bioquímicas séricas. No **gráfico 3** estão representados os principais perfis

que foram observados durante o estágio. No **gráfico 4**, encontra-se representada a distribuição das análises bioquímicas em função da espécie animal, constatando-se que a espécie canina foi a que apresentou maior representatividade nesta área de diagnóstico, face às restantes espécies animais. De entre as amostras de sangue analisadas, provenientes de “*outras espécies*”, incluíram-se os leporídeos (coelho-comum: *Oryctolagus cuniculus* e lebre-comum: *Lepus europaeus*), as gaivotas (*Larus michahellis*), os hamsters (*Cricetus cricetus*) e os porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*). A determinação dos perfis bioquímicos no HVPT é efetuada rotineiramente com um analisador bioquímico (Catalyst one™ da IDEXX Laboratories®), cujo método analítico se baseia no uso de uma abrangente gama de clips/slides de provas bioquímicas pré-carregadas, para posterior análise de vários parâmetros bioquímicos em conjunto ou de forma isolada. É possível proceder à realização de análise individualizada de mais de 30 parâmetros distintos.

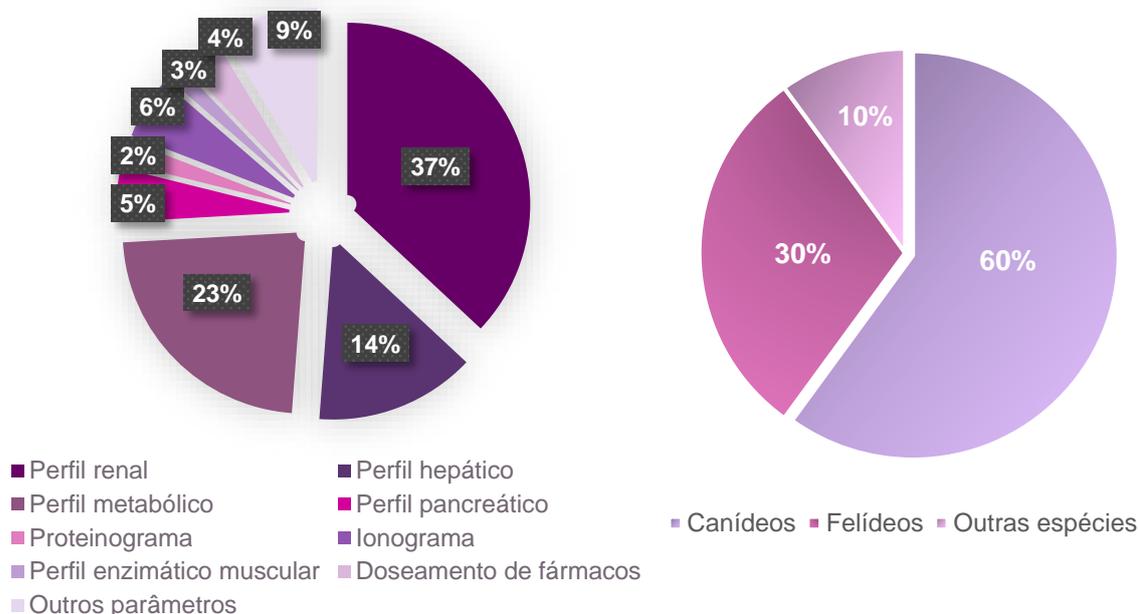


Gráfico 3| Análises bioquímicas observadas durante o estágio (n = 545).

Gráfico 4| Análises bioquímicas observadas em função da espécie animal (n=545).

Os PB expressos no **gráfico 3** foram categorizados da seguinte forma:

- **Perfil hepático** → Integra a análise de enzimas hepáticas, tais como a alanina aminotransferase (ALT); a fosfatase alcalina (FA); a aspartato aminotransferase (AST); a gama glutamyl transferase (GGT) e a lactato desidrogenase (LDH);
- **Perfil renal** → Inclui a mensuração de ureia no sangue (BUN - *Blood Urea Nitrogen*), a creatinina (CREA) e o fósforo (P);
- **Perfil pancreático** → Compreende a mensuração das enzimas pancreáticas, como a lipase pancreática (LIPA) e a amilase pancreática (AMYL);

- **Proteinograma** → Abrange a mensuração das proteínas plasmáticas por eletroforese, tais como, as globulinas (GLOB); as albuminas (ALB) – alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 e gama; o fibrinogénio; o rácio Albumina/ Globulina (ALB/GLOB), a par de outras proteínas específicas.
- **Perfil enzimático muscular** → Integra a mensuração sérica da enzima creatinina quinase (CK-do inglês *Creatinine Kinase*);
- **Perfil metabólico** → Abrange o doseamento sérico de variados metabolitos circulantes, *i.e.*, a bilirrubina total (TBIL); a ureia (URE); a amónia (NH₃); o ácido úrico (UA); o lactato (LAC) e o bicarbonato (HCO₃⁻);
- **Ionograma** → Envolve o doseamento sérico dos principais eletrólitos, tais como, o cloro (Cl); o potássio (K); o sódio (Na); o rácio sódio/ potássio (Na/K); o magnésio (Mg) e o cálcio (Ca);
- **Outros parâmetros especiais** em que foram integrados outros compostos específicos, não integráveis nos perfis mencionados, a referir: a glicose (GLI); os triglicéridos; o colesterol; os ácidos biliares pré- e pós-prandiais; os folatos; a cobalamina; a frutossamina e alguns testes endocrinológicos específicos;
- **Doseamento sérico de fármacos** → Integra geralmente a determinação da concentração sanguínea de determinados fármacos correntemente usados em terapêuticas clínicas, *e.g.*: Fenobarbital, Leviteracetam, bem como de fármacos anti-inflamatórios não esteróides.

Da observação do **gráfico 3**, depreendemos que os perfis bioquímicos mais realizados durante o estágio foram o perfil renal (Fr=37%, n=545) seguido do perfil metabólico (Fr=23%, n=545) e por fim, o perfil hepático (Fr=14%, n=545).

A amostra de sangue destinada para provas bioquímicas é colocada num tubo apropriado, geralmente, num tubo que não contém anticoagulante, sendo esta deixada a repousar à temperatura ambiente, até que se forme um coágulo de fibrina como resultado da conversão do fibrinogénio em fibrina, obtendo-se assim o soro. Posteriormente, é necessária a realização prévia de uma separação do plasma (fração líquida do sangue), dos elementos figurados sanguíneos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), para que se possa determinar a concentração sérica de determinados parâmetros específicos com precisão. Caso depois da colheita da amostra sanguínea, se utilize um tubo contendo um anticoagulante como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou a heparina, após centrifugada a amostra, obtém-se o plasma (fração líquida que possui fibrinogénio) (Juste de Santa-Ana & Gómez, 2015). Em alguns laboratórios desprovidos de analisadores bioquímicos, esta separação é efetuada com recurso a uma centrífuga, que efetua a centrifugação da amostra a 3000rpm, durante aproximadamente cinco minutos (Carretón & Juste,2015).

Para tal, na maioria dos testes bioquímicos a realizar é usado vulgarmente, o soro no qual são efetuadas todas as mensurações de parâmetros bioquímicos específicos (Bellwood e Andrasik- Catton, 2014).

Após a centrifugação da amostra de sangue, o tubo centrifugado deverá ser avaliado macroscopicamente quanto ao seu aspeto, à sua turvação e à sua coloração, por forma a aferir se há presença de artefactos, que possam comprometer a interpretação dos resultados da análise. A existência de artefactos que podem falsear as determinações bioquímicas são mais expetáveis no caso de existir lipémia, hemólise ou hiperbilirrubinémia (Thomas, 2004). No caso de existir lipémia ou lipidémia, o soro ou plasma denotam uma notória opacificação, apresentando marcada turvação, estando associada a elevada concentração de triglicéridos no sangue (**Figura 9**). Esta situação pode estar associada a uma desordem metabólica lipídica subjacente ou pode, geralmente, ser decorrente de uma colheita não efetuada em jejum (*i.e.* pós-pandrial) (Thomas, 2004; Weiser, 2015a). Não é raro que a lipémia conduza a erros analíticos, tais como o incremento na mensuração sérica das PT, da ALB, da GLOB, da TBIL, da GLI, do Ca, da ALT, da AST e da AMYL (Alleman, 1990, referido por Thomas, 2004). Como tal, sempre que suspeitamos da presença de um artefacto na amostra processada deveremos procurar determinar se este foi resultado de algum problema pré-analítico (*e.g.* devido ao uso de anticoagulante errado ou a presença de substâncias que interferem na amostra, *etc.*) ou consequente de um erro analítico (*e.g.* associado a um problema do reagente usado ou a um simples erro operativo, *etc.*), por forma a tentar corrigi-lo se tal for exequível (Thomas, 2004). De acordo com Weiser (2015a), para se obterem resultados mais fidedignos, no caso de se pretender determinar a atividade enzimática no soro da amostra, a análise deverá ser efetuada rapidamente, nas primeiras 24 horas após a colheita de sangue. Por outro lado, o mesmo autor enfatiza que para mensurar a enzima CK, essa mensuração deverá ser efetuada o mais célere possível, independentemente das condições de acondicionamento da amostra de soro ou plasma, já que esta enzima vai perdendo a sua atividade a partir das 24 horas após a colheita da amostra. Atendendo ao tipo de doseamento sérico a efetuar, deverá ter-se especial cuidado na eleição apropriada do tubo para acondicionamento da amostra de sangue (*e.g.* para determinação dos níveis de NH_3^- , lítio e de Na no soro, o uso do tubo de heparina é inadequado e o tubo contendo EDTA não é recomendado para mensuração sérica de iões divalentes como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} , pois este anticoagulante é um quelante desses iões (Carretón & Juste, 2015).



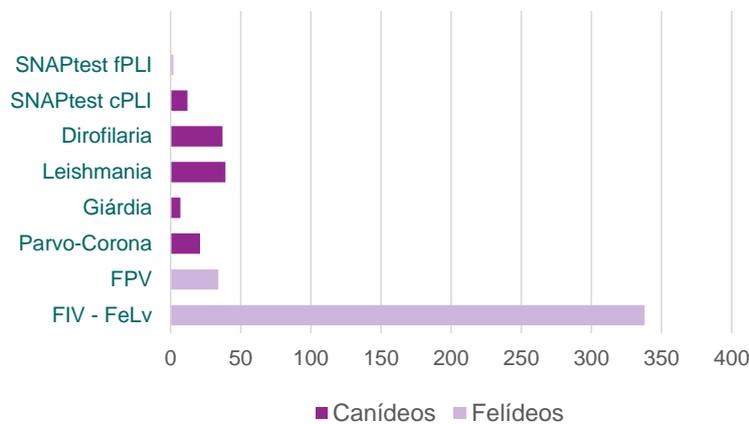
Figura 9| Amostras de sangue centrifugado de felídeo: (A) plasma revelando lipémia; (B) plasma com coloração normal (Cortesia de Dr.^a Telma Gomes).

Todavia, posteriormente à amostra sanguínea ser centrifugada, podem surgir alguns erros interpretativos inerentes ao manuseamento da amostra, devido à aplicação de técnicas incorretas. Uma separação tardia do soro, em relação aos componentes celulares sanguíneos pode originar a dispersão das células presentes no sangue, a metabolização de determinados componentes do soro por essas células, bem como a alteração sérica de eletrólitos (*e.g.* K, P, Mg) ou de enzimas hepáticas como a AST e a LDH, podendo conduzir a um falso incremento das suas concentrações séricas mensuradas. Não raras vezes, origina o consumo de glicose do

sangue, conduzindo conseqüentemente, a um decréscimo do seu valor sérico (MacWilliams & Thomas, 1992, referido por Thomas, 2004). A fim de evitar o consumo de glicose presente na amostra sanguínea, esta pode ser colocada num tubo com anticoagulante fluoreto de sódio ou oxalato de potássio, os quais possuem um efeito inibidor da glicólise, sendo usados para a determinação sérica deste composto (Carretón & Juste, 2015; Weiser, 2015a). Para além disso, é importante que a separação entre o soro e o coágulo formado seja efetuada o mais celeremente possível, já que o coágulo que se originou poderá romper aquando do manuseamento do tubo e originar soro hemolisado (que surge com uma coloração avermelhada) (Carretón & Juste, 2015).

1.3.2.3. Testes rápidos de imunocromatografia

No que diz respeito à subcategoria “Testes rápidos de imunocromatografia”, se atentarmos ao **gráfico 5**, é notória a representatividade que os testes de diagnóstico rápido da síndrome de imunodeficiência felina e de leucemia felina (FIV-FeLv) tiveram na espécie felina, em relação a outros testes de imunoensaio, contemplando um total de 338 testes efetuados, com uma Fr= 68,98% (n = 490), seguidos dos testes de Panleucopénia felina (FPV) com, aproximadamente, 6,94% de Fr. A maior representatividade destes testes na população felina esteve intimamente ligada ao facto de ter ocorrido um surto desta doença no início do outono, quer em animais em ambulatório, quer em animais em regime de internamento no Hospital (**Figura 10**).



Legenda: fPLI- Feline Pancreatic Lipase Immunoreactivity (Imunorreatividade à lipase pancreática felina); cPLI - Canine Pancreatic Lipase Immunoreactivity (Imunorreatividade à lipase pancreática canina); FPV- Feline Panleukopenia virus (Vírus da Panleucopénia Felina); FIV-FeLv - Síndrome de imunodeficiência felina e de leucemia felina.

Gráfico 5. Testes rápidos de imunocromatografia realizados distribuídos por espécie animal (n=490).

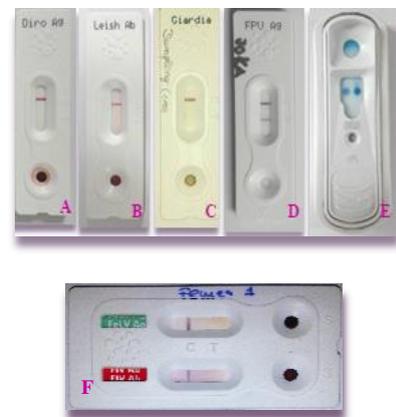


Figura 10| Diversos testes rápidos de imunocromatografia utilizados no HVPT (Fotografia de autora).

O elevado número de testes de FIV-FeLv observado está, também, relacionado com o facto de diariamente serem realizados estes testes, não só aos felídeos que se apresentam a consulta, como, também, a gatos de rua que são acolhidos por associações de defesa dos animais da região de Portimão que, quase diariamente são esterilizados no HVPT. Na espécie

canina, de entre o total de testes rápidos de diagnóstico realizados, os testes de *Dirofilaria* spp., apresentaram uma maior expressão, com uma Fr=7,96%, seguidos dos testes de *Leishmania* spp. com uma Fr=7,55%.

A representatividade destes dois testes está intimamente associada à elevada prevalência destas entidades clínicas na região do Algarve, sendo de extrema importância o despiste de dirofilariose e leishmaniose na espécie canina, nesta região com carácter endémico. O teste menos realizado foi o teste de deteção de *Giardia* spp. com uma Fr de 2%. Estes testes de diagnóstico de doenças infetocontagiosas e parasitárias, atualmente muito usados na rotina veterinária, são baseados em ensaios imunocromatográficos que visam a deteção de antigénios ou anticorpos específicos do agente patogénico a testar, de um modo célere. Este método *dipstick* veio possibilitar a obtenção de resultados mais rápidos, pouco dispendiosos, de simples interpretação e de uma forma qualitativa (Cavalcanti *et al.*, 2008). A *American Association of Feline Practitioners* recomenda que todos os gatos sejam testados pelo menos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) (Nicholson *et al.*, 2016).

1.3.2.4. Testes dermatológicos

A área da Dermatologia é uma das especialidades clínicas em que, na prática, geralmente, se verifica maior registo de ocorrências no exercício da clínica de animais de companhia. Por este motivo, o recurso à realização de testes dermatológicos (TD) auxiliares no diagnóstico de afeções cutâneas tem-se demonstrado cada vez mais imprescindível, para conduzir o clínico a um diagnóstico presuntivo e o orientar no estabelecimento de uma terapêutica dirigida de modo célere (Patel & Forsythe, 2010). Variados TD poderão ser necessários para se chegar a um diagnóstico definitivo, já que as doenças cutâneas podem ser causadas por uma grande variedade de outras afeções subjacentes. Acresce a este facto, muitas doenças distintas poderem apresentar sintomatologia clínica semelhante, pelo que é relevante usar sempre uma abordagem sistemática em animais com doença de pele, para se alcançar um diagnóstico com maior sucesso (Muller *et al.*, 2013).

Os TD foram um dos tipos de meios complementares de diagnóstico que demonstraram relevante representatividade, evidenciando a crescente incidência de casos de índole dermatológica tanto em canídeos e felídeos, como em espécies exóticas, tal como se observa na **Tabela 1**.

Tabela 1 Testes dermatológicos realizados

Testes dermatológicos	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fip Exóticos	Fi	Fr (%)
Citologia auricular	39	26	7	72	19,15
Citologia por PAAF	46	12	5	63	16,75
Citologia por aposição	24	17	9	50	13,30
Teste de fita-adesiva transparente	29	13	8	50	13,30
Biópsia cutânea	35	13	-	48	12,76
Tricograma	14	19	5	38	10,11
Citologia interdigital	27	8	-	35	9,31
Citologia cutânea	13	4	3	20	5,32
TOTAL				376	100

Legenda: PAAF - Punção Aspirativa por Agulha Fina

Se atentarmos à análise da **tabela 1**, constatamos que, no período de estágio, um dos testes dermatológicos mais realizado rotineiramente foi a citologia auricular (Fr=19,75%, n=376), seguido da realização de citologias cutâneas por técnica aspirativa (PAAF) (Fr=16,75%, n=376) e, não de somenos representatividade, o teste de fita-adesiva transparente (Fr=13,30%, n=376). Pelo que, a área da Dermatologia foi uma das especialidades médicas sobre a qual a autora incidiu mais o seu foco de interesse.

Uma citologia auricular é um meio de diagnóstico muito vantajoso para percebermos se um canal auditivo, com aparência normal, apresenta exsudado em locais mais profundos do pavilhão auricular, sendo considerado o método mais indicado e eficaz para proceder à colheita de detritos do canal auditivo externo e à identificação posterior de microrganismos presentes (Besingor & Germain, 2009). Uma das afeições auriculares frequentes em pequenos animais é a otite externa que consiste num processo inflamatório do canal auditivo, o qual envolve não só o pavilhão auricular, como também, pode comprometer o ouvido médio. Patel & Forseythe (2010) consideram que sempre que se observe a existência de uma otite externa, se deve realizar uma “*exploração citológica do ouvido*”, a qual permitirá, posteriormente, decidir qual o melhor tratamento a utilizar, bem como aferir quanto à resposta à terapêutica instituída. A realização de uma colheita auricular com uma zaragatoa estéril deve, regra geral, ser efetuada após observação primária do ouvido com recurso a um otoscópio (Besingor & Germain, 2009; Marcos & Santos, 2011). A zaragatoa é introduzida diretamente até à porção horizontal do canal auditivo (método que permite obter amostras com maior riqueza celular, pelo que possui maior valor de diagnóstico) ou através do cone do otoscópio (Marcos & Santos, 2011). De acordo com estes autores, as amostras obtidas a partir da porção vertical do canal auditivo são menos fidedignas em termos clínicos, do que as que são colhidas na porção horizontal (local onde a maioria das infeções bacterianas tem lugar). De acordo com a literatura inerente à otologia clínica e citologia auricular, mesmo que só existam sinais clínicos unilaterais, preconiza-se a realização de duas zaragatoas correspondentes a cada ouvido, o que nos fornece importantes informações quanto ao tipo de processo subjacente que possa existir bilateralmente, possibilitando uma comparação

dos dois ouvidos quanto à avaliação de sinais inflamatórios (presença de células inflamatórias – e.g. neutrófilos), número de células epiteliais queratinizadas e presença de ectoparasitas, que possam ser compatíveis com a sintomatologia manifestada pelo animal.

Nesta técnica citológica esfoliativa, a zaragatoa estéril pode ser previamente humedecida com soro fisiológico ou parafina líquida (caso a lesão não seja exsudativa), o que ajudará na adesão do material à zaragatoa, permitindo diminuir a destruição das células durante a sua colheita e também, auxiliar na dispersão e montagem da amostra na lâmina, tornando mais facilitada a realização da preparação citológica (Littlewood, 2002; Marcos & Santos, 2011). Posteriormente à colheita da amostra do canal auditivo, a zaragatoa é rolada suavemente sobre uma lâmina de vidro numa única direção, estendendo unidireccionalmente a amostra recolhida (**Figura 11**).

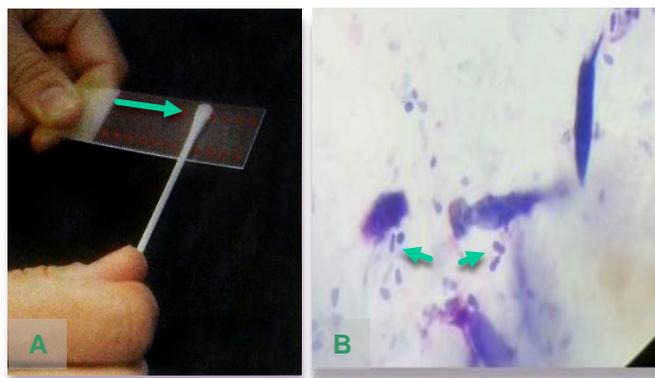


Figura 11| Técnica de rolamento da zaragatoa para extensão de material sobre uma lâmina de vidro (A) e (B) imagem de observação microscópica de uma preparação citológica por zaragatoa auricular, de um canídeo evidenciando presença de *Malassezia* spp. (setas azúis), bactérias (cocos) e células epiteliais, DQ, x1000 (adaptado de Marcos & Santos, 2011 e fotomicrografia da autora).

É muito relevante que na execução deste processo de rolamento da zaragatoa, se evite

esfregá-la sobre a lâmina, por forma a não romper as células presentes na amostra, devendo assegurar-se que toda a extremidade do algodão da zaragatoa fique em contato íntimo com a lâmina (Marcos & Santos, 2011). As amostras colhidas de ambos os ouvidos podem ser colocadas na mesma lâmina (devidamente identificada), para posterior observação e devem ser representativas do cerúmen existente nas porções mais profundas do canal auditivo (Patel & Forsythe, 2010; Rosenkrantz, 2016). As lâminas de vidro contendo a amostra de cerúmen recolhido podem opcionalmente, ser fixadas pela ação de calor e posteriormente, ser coradas por um método de coloração do tipo Romanowsky (coloração que produz bons detalhes citoplasmáticos e dos microrganismos presentes) (Rosenkrantz, 2016).

Podem ser habitualmente observados microscopicamente numa citologia auricular: bactérias, ectoparasitas, fungos (e.g. leveduras), células inflamatórias (e.g. leucócitos, tais como os neutrófilos) e células epiteliais (Silveira *et al.*, 2008). Fisiologicamente o canal auditivo externo de cães e gatos possui um revestimento epitelial que contém uma flora comensal, estando colonizado por um escasso número de bactérias (e.g. *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.), de leveduras (e.g. *Malassezia* spp. e *Candida* spp.), bem como por ácaros da espécie *Otodectes cynotis* (Besingor & Germain, 2009; Peleteiro *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2013; Rosenkrantz, 2016). Caso se desenvolva uma otite, ocorre, não raras vezes, o sobrecrecimento destes microrganismos e o número de células epiteliais observadas no exame citológico apresenta-se regra geral, aumentado tal como demonstra a **tabela 2**. De acordo com

Rosenkrantz (2016), a existência de células infamatórias (e.g. neutrófilos) numa citologia auricular é altamente sugestiva de uma infeção secundária subjacente.

Tabela 2| Contagens obtidas por campo com Obj. x40 de células epiteliais, bactérias, leveduras e neutrófilos em situação normal e em existência de otite (adaptado de Peleteiro et al., 2011).

Achado citológico	Ouvido normal		Ouvido com otite	
	Cão	Gato	Cão	Gato
Células epiteliais	≤ 22	≤ 25	= ou ↑	= ou ↑
Bactérias	≤ 5	≤ 4	≥ 25	≥ 15
<i>Malassezia</i> spp.	≤ 2	≤ 2	≥ 5	≥ 12
Neutrófilos	0	0	≥ 1	≥ 1

A observação microscópica de *Otodectes cynotis* e *Demodex* spp. na amostra de cerúmen, normalmente é conseguida usando uma baixa ampliação de x40 (Bensignor & Germain, 2009; Marcos & Santos, 2011; Hnilica, 2012). Todavia, Hnilica (2012) refere que para proceder à identificação de bactérias e leveduras do género *Malassezia* spp. presentes no cerúmen devemos usar uma ampliação de x400 e de x1000 (com óleo de imersão), já que são mais facilmente observáveis as suas características morfológicas, usando ampliações superiores.

1.3.2.4. Urianálise

A urianálise (UAN) foi a terceira área de diagnóstico laboratorial mais acompanhada ao longo do estágio, a seguir às análises hematológicas e bioquímicas. De acordo com a **tabela 3**, é possível constatar que o tipo de exame de urina predominante foi a “*urianálise Tipo I*” com 69,94% de Fr, apresentando maior representatividade na espécie canina, seguida da subcategoria “*urianálise Tipo II*” com 29,76%, a qual se realizou com maior frequência na espécie felina. De sublinhar que as culturas bacteriológicas de urina (uroculturas) foram integradas na subcategoria “*Análises microbiológicas*”, pelo que a sua contabilização não se encontra patente na tabela subsequente.

Tabela 3| Análises de urina e de cálculos urinários realizadas

Análises de urina	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fip Exóticos	Fi	Fr (%)
Urianálise Tipo I	122	83	30	235	69,94
Urianálise Tipo II	83	81	10	100	29,76
Avaliação de cálculos urinários	1	-	-	1	0,30
TOTAL	174	110	40	336	100

A UAN ou exame de urina constitui um dos meios de avaliação laboratorial considerado como uma ferramenta indispensável para avaliar o estado geral de saúde dos animais, sendo de elevada relevância em pacientes que apresentam sinais clínicos relacionados com o trato urinário, bem como em pacientes doentes, aos quais tenha sido instituído algum tratamento

específico para a doença de trato urinário em causa, sendo esta usada como meio de monitorização da resposta a essa terapêutica (Rosenfeld & Dial, 2010). A UAn integra, habitualmente, o leque dos três principais exames complementares de diagnóstico a incluir numa base de dados mínimos do paciente, a par da realização de análises bioquímicas e de um CBC (Rosenfeld & Dial, 2010; Rizzi, 2014a). A interpretação dos resultados de uma UAn completa providencia-nos informação relevante acerca do estado fisiológico do sistema urinário (Sink & Weinstein, 2012), permitindo identificar, precocemente, alterações na função renal, no estado de formação de urina, no equilíbrio ácido-base e diagnosticar a existência de doença renal subjacente, bem como de outros sistemas de órgãos (Rosenfeld & Dial, 2010; Rizzi, 2014a; Vap & Shropshire, 2017).

Segundo Barsanti *et al.* (2004) e Sink & Weinstein (2012), a UAn é um exame rapidamente exequível e pouco dispendioso, fundamental em animais que apresentam afeções sistémicas e outras enfermidades de índole não urinária subjacentes (e.g. endocrinopatias, como a Diabetes Mellitus) fornecendo informação clínica precisa, acerca do estado de hidratação e, em alguns casos, da possível existência de nefrotoxicidade. Segundo a opinião de Planellas (2015), a UAn tem-se mostrado um procedimento de diagnóstico essencial, especialmente na espécie felina, já que os gatos tendem a apresentar maior tendência em desenvolver infeções do trato urinário inferior e obstrução urinária do que outras espécies animais, sendo estas as principais causas de disúria (dificuldade na micção) nestes pacientes. Algumas indicações clínicas em que está recomendada a realização da UAn como um essencial meio auxiliar de diagnóstico, são as seguintes: em caso de azotémia, hematuria, pigmentúria, polaquiúria, estrangúria/disúria, poliúria/polidipsia, bem como em casos de incontinência urinária (Rizzi, 2014a).

A UAn tipo I e tipo II compreende a avaliação laboratorial da amostra de urina colhida, primeiramente a nível macroscópico, a fim de examinar as propriedades físicas e químicas da urina e posteriormente, é efetuada uma avaliação microscópica. A UAn do tipo I engloba a avaliação das características físicas gerais da amostra de urina, efetuada por inspeção visual, em que um dos primeiros parâmetros físicos a ser avaliado é a sua cor (normal – pálida, amarelada ou amarelo-alaranjado; patológica – cor vermelha, indicativa de hematuria; acastanhada – evidenciando mioglobinúria; esbranquiçada; esverdeada ou azulada), seguindo-se o seu aspeto (turvação e sedimentação), a avaliação da sua consistência (fluída ou viscosa); o odor (fétido/pútrido, acre ou a cetona); o seu volume (normal – 20mL a 40 mL/kg/dia) e a determinação da densidade urinária específica (USG) mensurada por refractómetro. A análise química da urina integra também, a UA do tipo I, a qual visa efetuar o exame semi-quantitativo das propriedades químicas da amostra de urina, através de uma tira reativa com reagentes colorimétricos (*dipstick* ou tira *Multistix*®), a qual é posteriormente comparada com uma escala colorimétrica. Os parâmetros químicos avaliados por este método são: o pH (concentração hidrogeniónica), glicose, proteína urinária, corpos cetónicos, bilirrubina, sangue (hemoglobina), urobilinogénio, nitritos e leucócitos (Sink & Weinstein, 2012; Rizzi, 2014a) (**Figura 12**). Sabe-se que apesar de ser utilizada rotineiramente, dada a sua eficácia e obtenção de rápidos resultados, a tira reativa

de urina não é considerada um método fidedigno para a avaliação da presença de leucócitos, na urina de pacientes felinos (Planellas *et al.*, 2015).

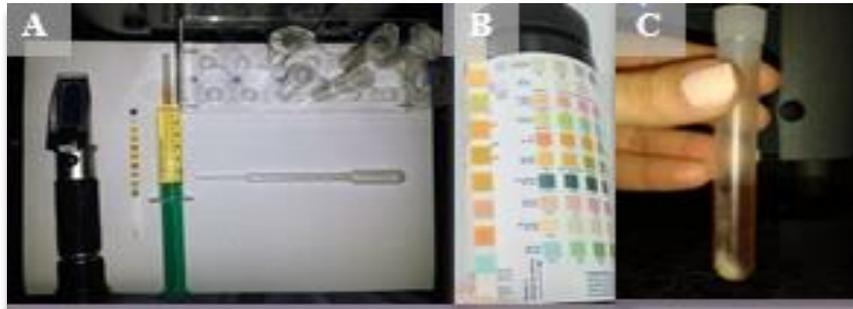


Figura 12| Tipos de análises urinárias: (A) urianálise tipo I; (B) avaliação química por tira reativa de urina e (C) urianálise tipo II- exame sedimento urinário (Fotografias de autora).

O último procedimento de diagnóstico laboratorial a efetuar, deverá ser um exame microscópico do sedimento urinário, utilizando para tal a amostra de urina previamente centrifugada, desprezando o sobrenadante e utilizando o sedimento remanescente para avaliação (Rizzi, 2014a) (**Figura 13**). Esta avaliação compõe a UAn do tipo II, a qual visa proceder à identificação e contabilização de partículas insolúveis (e.g. gordura, presença de células atípicas, cilindros, microrganismos e presença de parasitas) – exame de sedimento orgânico, bem como à identificação de cristais – exame de sedimento inorgânico. Quanto ao tipo de células que pode ser observado mais frequentemente, destacam-se as células epiteliais, os espermatozoides, os leucócitos e eritrócitos. Relativamente aos microrganismos que geralmente, são identificados em amostras de sedimento urinário referem-se as leveduras, os fungos e bactérias (cocos e cocobacilos).

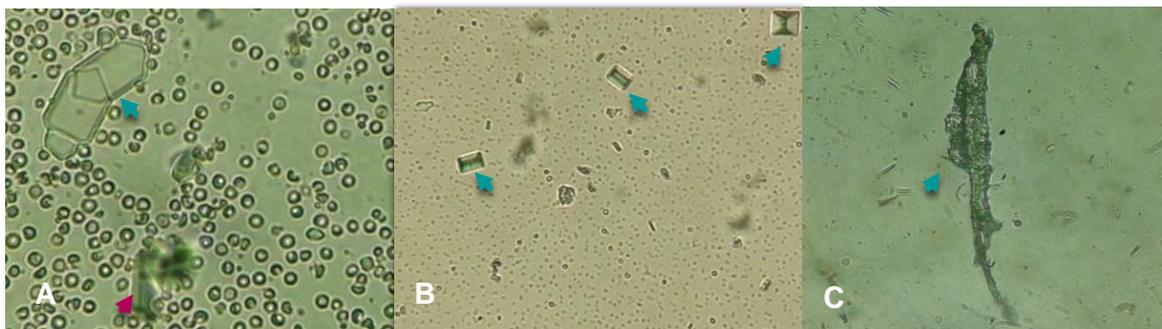


Figura 13| Fotomicrografias de três sedimentos urinários realizados no HVPT: (A) sedimento urinário de um felídeo evidenciando a presença de múltiplos eritrócitos (seta rosa), cristais de oxalato de cálcio monohidratado (seta rosa claro) e cristais compatíveis com os de cistina (seta azul); (B) sedimento urinário de canídeo evidenciando múltiplos cristais de estruvite (em forma de "tampa de caixão" (seta azul) e de cristais de oxalato de cálcio dihidratado (seta rosa) e (c) sedimento urinário de uma fêmea leporídeo denotando a presença de um cilindro granular (seta azul); x400 (Fotografias originais, HVPT).

Existem variados tipos de cilindros que podem ser facilmente detetáveis recorrendo-se ao uso de uma objetiva de maior ampliação (x40) e utilizando sempre o condensador baixo, para permitir maior contraste dos componentes observados (Sink & Weinstein, 2012; Rizzi, 2014a). Os cilindros urinários podem ser celulares epiteliais, céreos, lipídicos, granulados, hialinos,

leucocitários, hemáticos, calcáreos, mucosos e de uratos. Já no que concerne à presença de cristais na urina (cristalúria), tal é um achado microscópico muito comum, em urinas provenientes de gatos. A natureza dos cristais está intimamente associada ao pH da urina. Deste modo, são exemplos de cristais de urinas alcalinas: o fosfato de cálcio; o fosfato de amónio-magnésiano (estruvite); o urato de amónio; o carbonato de cálcio; o oxalato de cálcio dihidratado e os fosfatos amorfos. Por outro lado, de entre os cristais encontrados em urinas ácidas destacam-se: os cristais de cistina; de tirosina; de oxalato de cálcio monohidratado; de ácido úrico; de leucina; de uratos amorfos e de biurato de amónia; de urato de sódio; de oxalato de cálcio dihidratado; de bilirrubina e de xantina. Os cristais mais comumente encontrados em urinas de cães e gatos são os cristais de estruvite, os de fosfato de amónia, os de oxalato de cálcio dihidratado e os de oxalato de cálcio monohidratado (Rizzi, 2014b; Reppas & Foster, 2016).

A avaliação qualitativa e quantitativa de urólitos (cálculos urinários) também é um exame constituinte da UAn que visa determinar o tipo de minerais presentes com base na sua composição química, através da aplicação de várias técnicas quantitativas, recorrendo-se para tal a métodos colorimétricos (Moore, 2007).

Podem também ser realizados outros testes laboratoriais a fim de proceder à avaliação da função renal, para despistar possível existência de doença renal subjacente. Deste modo, a avaliação do rácio proteína urinária/creatinina urinária (UPC), também deve ser um elemento integrante de uma UAn completa, já que permite detetar a presença de proteína na urina (proteinúria), a qual poderá sugerir que exista uma doença glomerular oculta anteriormente ao desenvolvimento de azotémia no paciente (Rosenfeld & Dial, 2010). Outro tipo de prova funcional renal que pode ser realizado em laboratório é a avaliação da clearance de CREA, que está preconizada nos casos de o paciente apresentar sinais de poliúria/polidipsia sem evidência de azotémia.

1.3.2.6. Análises parasitológicas

A realização de análises parasitológicas em animais de companhia, desde sempre, tem sido encarada pelo Médico Veterinário, na prática clínica, como um elemento de suma importância no diagnóstico e prevenção de parasitoses, nomeadamente, de zoonoses. Todavia, a sua aplicabilidade diagnóstica tem vindo a ganhar maior ênfase, não só em animais exóticos, como, também, em espécies aquáticas e silvestres que podem ser potenciais transmissoras de parasitoses ao Homem.

No que concerne à área da Parasitologia acompanhada durante o estágio, na **tabela 5** apresentam-se as principais análises parasitológicas assistidas, excetuando outros tipos de testes rápidos de deteção de protozoários (*e.g. Giardia* spp.), entre outros parasitas transmitidos por vetores, como *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp., os quais foram contabilizados na subcategoria “*Testes rápidos de imunocromatografia*”. Outras técnicas de diagnóstico como as citologias auriculares para pesquisa de ectoparasitas foram contabilizados noutra subcategoria “*Testes dermatológicos*”, já explanada anteriormente. Também de ressaltar que, apenas foram

contabilizados nesta área de diagnóstico, todos os esfregaços sanguíneos que foram positivos quanto à pesquisa de hemoparasitas, já que a sua contabilização total foi integrada na área das análises hematológicas.

Tabela 4| Análises parasitológicas realizadas

Análises Parasitológicas	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fip Exóticos	Fi	Fr (%)
Pesquisa de hemoparasitas					
Esfregaço sanguíneo	53	114	-	167	50,15
Pesquisa de ectoparasitas – citologia cutânea					
Técnica de raspagem cutânea profunda	52	15	6	73	21,92
Técnica de raspagem cutânea superficial	38	9	12	59	17,72
Pesquisa de endoparasitas – exame fecal					
Testes de sedimentação fecal	13	21	-	34	10,21
TOTAL				333	100

Atendendo à observação dos dados concernentes aos distintos meios de diagnóstico parasitológico patentes na **tabela 4** apresentada, verifica-se que a análise parasitológica que denotou maior representatividade foi a subcategoria “*pesquisa de hemoparasitas*”, tendo a técnica do “*esfregaço sanguíneo*” sido um dos métodos de diagnóstico parasitológico sanguíneo o que teve francamente maior expressividade apresentando uma Fr=50,15% (n=333). O segundo exame mais realizado foi a “*pesquisa de ectoparasitas por citologia cutânea*”, utilizando a técnica de raspagem cutânea profunda, a qual apresentou uma Fr=21,92% (n=333). A espécie canina foi a que teve maior expressão face às restantes espécies animais mencionadas. Da análise da casuística evidenciada, depreende-se que a área menos assistida foi a coprologia para pesquisa de endoparasitas. A generalidade de análises coprológicas solicitadas eram remetidas ao laboratório externo DNAtch. De referir que não foram realizados testes de flutuação fecal, mas somente testes rápidos de sedimentação fecal, em virtude de serem mais fáceis de executar.

A pesquisa de hemoparasitas efetua-se rotineiramente através da avaliação de um ESP (**Figura 15**), o qual constitui um exame elementar no diagnóstico parasitológico, sobretudo, por representar um meio rápido de deteção de alterações peculiares na morfologia das células sanguíneas, as quais são, não raras vezes, sugestivas da presença de hemoparasitas no sangue, incluindo a deteção de outros agentes patogénicos de carácter parasitário ou infeccioso, bem como a presença de bactérias (Kroft, 2002; Rosenfeld & Dial, 2010). De entre os parasitas facilmente observados num ESP salientam-se *Babesia* spp. (agente etiológico de babesiose canina ou felina) e *Hepatozoon* spp. (protozoário causador de hepatozoonose), assim como formas larvares de outros parasitas, tais como, microfilárias (formas larvares imaturas de *Dirofilaria immitis* – principal agente causador de dirofilariose). No que concerne a outros géneros de microrganismos responsáveis por hemoparasitoses de índole bacteriana, que são muito frequentemente detetados por este meio de diagnóstico complementar, referem-se as bactérias *Rickettsia* spp. (agente responsável por riquetsiose), *Mycoplasma* spp. (anteriormente designado por *Haemobartonella* spp. e agente etiológico de micoplasmose hemotrófica), *Ehrlichia* spp.

(agente etiológico de erlichiose monocítica canina), bem como *Anaplasma* spp. (agente etiológico de anaplasmoze), entre outros géneros de microrganismos intracelulares (Kroft, 2002; Nicholson *et al.*, 2010).

Durante o estágio, foram diagnosticados maioritariamente, na espécie canina *Mycoplasma canis* e *Babesia canis* enquanto na espécie felina, o hemoplasma *Mycoplasma haemofelis*, foi detetado com importante representatividade, face a outros tipos de hemoparasitas observados microscopicamente. Para além disso, durante esse período foram efetuados muitos despistes de dirofilariose canina, através da pesquisa de microfíliarias de *Dirofilaria immitis*, em amostras de sangue periférico dos pacientes com auxílio do ESP.

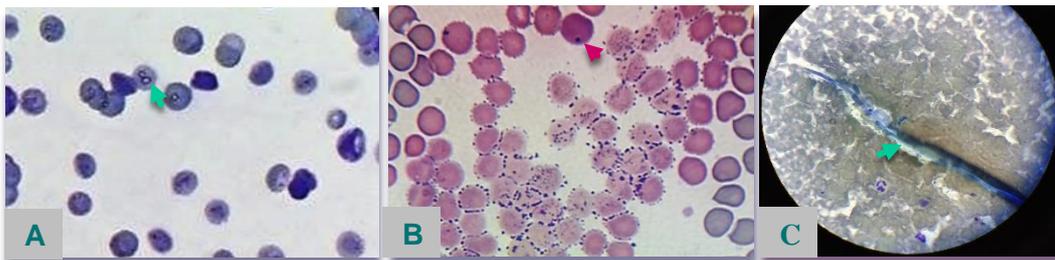


Figura 14| Fotomicrografias de três esfregaços sanguíneos com presença de hemoparasitas: (A) Evidência de inclusões intra-eritrocitárias compatíveis com *Babesia* spp., Obj. x1000 (seta azul) em canídeo (B) Presença de inclusões marginais eritrocitárias, compatíveis com *Mycoplasma* spp. ou *Rickettsia* spp., Obj. x1000 (seta rosa) e (C) esfregaço sanguíneo de um canídeo evidenciando a presença de uma microfíliaria; Coloração DQ (cortesia de Carolina Gregório e de Cláudio Grou, HVPT).

Num mesmo enquadramento, a estagiária pode constatar através da observação microscópica de variados ESP, que a identificação de *Rickettsia* spp. e a sua distinção de *Mycoplasma* spp. se torna por vezes extremamente difícil, pelo que frequentemente nos conduz ao recurso a outros meios de diagnóstico, para confirmação da presença destas bactérias no sangue dos pacientes suspeitos (e.g. através de técnicas serológicas como ELISA ou testes de biologia molecular, como o PCR). Porém, foram reportadas algumas limitações no que concerne à identificação e distinção de alguns tipos de bactérias presentes no sangue de pacientes infetados, bem como, ao valor preditivo do ESP. Como tal, de acordo com Nicholson *et al.* (2010), este meio de diagnóstico denota baixa sensibilidade na deteção de *Ehrlichia canis* especialmente, numa fase crónica da infeção e, segundo advoga Tasker (2010), o diagnóstico de *Mycoplasma* spp., através de citologia de sangue periférico apresenta geralmente, uma baixa sensibilidade e especificidade. Bellwood & Andrasik-Catton (2014), salientam que as bactérias do género *Mycoplasma* spp. em contacto com o anticoagulante EDTA exibem uma certa tendência para deixarem de aderir à superfície dos eritrócitos, o que dificulta a sua posterior identificação microscópica. Para tal, preconizam que a recolha da amostra de sangue a testar seja feita para um tubo com heparina em vez de EDTA ou em alternativa, usar uma amostra de sangue fresco (*i.e.*, sem adicionar qualquer anticoagulante), pois não interfere com a sua adesão às células sanguíneas e possibilita menor formação de artefactos. Contudo, Torrance (2000)

sublinha que o exame microscópico de um ESP isoladamente, em alguns casos permite determinar um diagnóstico definitivo.

Pesquisa de ectoparasitas por citologia cutânea

A **raspagem cutânea (RC)** é uma das técnicas de colheita de amostras cutâneas mais frequentemente realizada na área de Dermatologia, para o diagnóstico parasitológico. Trata-se de um procedimento de rápida e de fácil execução, associado a baixo custo, sendo largamente usado para a identificação de infeções e infestações por vários tipos de ectoparasitas, nomeadamente por ácaros, que podem encontrar-se nas camadas superficiais ou mais profundas da pele (Patel & Forsythe, 2010; Hnilica, 2012).

De entre os ectoparasitas que podem ser frequentemente diagnosticados por observação microscópica através de citologia por raspagem cutânea, destacam-se os ácaros pertencentes aos géneros *Demodex* spp., *Sarcoptes* spp., *Cheyletiella* spp. e *Otodectes* spp. (Patel & Forsythe, 2010). Tal como o nome sugere, a RC é uma técnica que consiste em proceder à raspagem da superfície ou das margens de uma lesão cutânea, na

direção de crescimento do pêlo, com o auxílio de uma lâmina de bistúri de bordo rombo ou de uma lâmina de

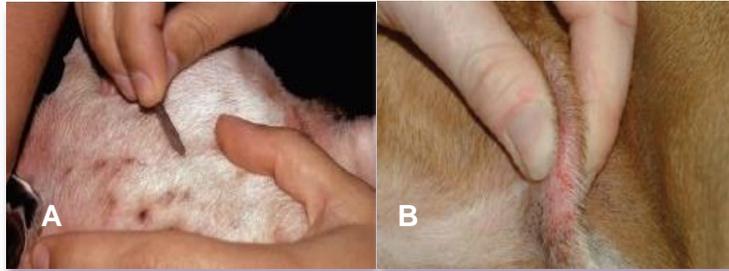


Figura 15| Técnica de raspagem cutânea profunda para exame parasitológico. (A) A raspagem feita na direção de crescimento do pêlo, usando uma lâmina de bistúri de bordo rombo; (B) Notar que numa raspagem cutânea profunda realiza-se primariamente uma prega de pele antes de realizar a raspagem para colheita da amostra (Imagens adaptadas de Hnilica, 2012).

vidro colocada perpendicularmente à superfície da lesão a raspar (Marcos & Santos, 2011) (**Figura 15**). Atendendo à prévia suspeita do tipo de ectoparasitas presente, assim se poderá selecionar a profundidade da raspagem, podendo obter-se uma raspagem superficial ou uma raspagem profunda. Regra geral, sempre que possível, as raspagens devem efetuar-se a partir de lesões primárias não traumatizadas evitando realizar as raspagens em zonas onde existam muitas escoriações ou crostas, o que poderia conduzir a resultados falso-negativos (Patel & Forsythe, 2010; Griffiths, 2011). Recomenda-se a obtenção de amostras de três a cinco zonas diferentes (sugerindo-se no total cinco, se houver suspeita de sarna sarcóptica ou de sarna demodécica). Na ótica de Marcos & Santos (2011), uma das principais limitações desta técnica citológica é permitir apenas a obtenção de células superficiais da lesão observada, já que se trata de uma técnica de citologia esfoliativa.

No decorrer do estágio foi possível diagnosticar vários casos de sarna demodécica e também alguns casos de sarna sarcóptica, na espécie canina (**Figura 16**). Na espécie felina, por seu turno, no que respeita a infeções parasitárias diagnosticadas por RC, observou-se, não raras vezes, a presença de *Otodectes* spp. e de *Notoedres* spp..

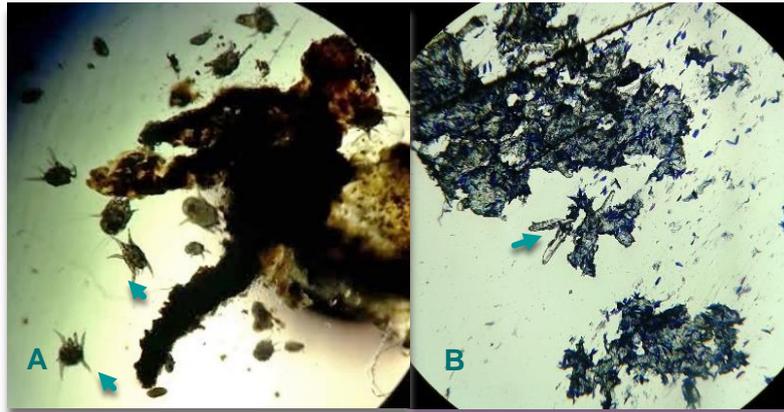


Figura 16| Fotomicrografias de ectoparasitas diagnosticados por raspagem cutânea: (A) múltiplos ácaros *Octodetes cati* spp. (setas azuis) em preparação citológica de felino, Obj. x100 e (B) vários ácaros *Demodex* spp. (setas azuis) em preparação citológica por raspagem cutânea profunda de um canídeo, Obj.x100 (Fotomicrografias HVPT).

1.3.2.7. Análises citológicas

De entre o leque de análises laboratoriais assistidos/efetuados pela autora no decorrer do estágio curricular, as análises citológicas integraram um volume considerável de todo o trabalho realizado no laboratório do HVPT diariamente, o que, inevitavelmente, justifica em pleno a eleição

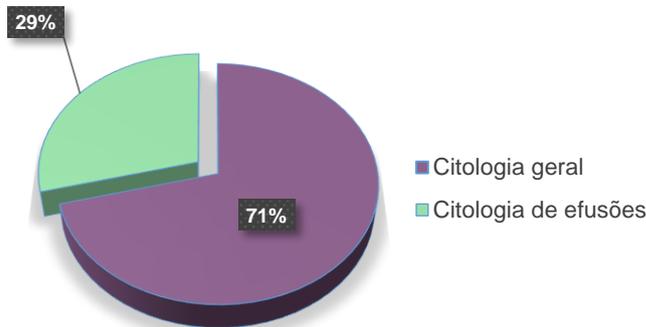


Gráfico 5. Análises citológicas acompanhadas (n=225).

do tema de revisão bibliográfica. No **gráfico 5**, são evidenciados os tipos de análise citológica realizados. De referir que nesta subcategoria não estão incluídos alguns tipos de análise citológica (*i.e.* a citologia cutânea, a citologia interdigital e a citologia auricular), já que foram englobados anteriormente, na seção dos testes dermatológicos.

A partir da informação apresentada pelo **gráfico 5**, constata-se que, de entre o tipo de análises citológicas que tiveram maior representatividade, foram a subcategoria “*citologia geral*”, seguida da “*citologia de efusões*”. Dentro da citologia geral, englobaram-se as citologias de linfonodos (Lnn.) regionais (25%), citologias urinárias (12%), citologias fecais (9%), citologias de LCR (3%); citologias vaginais/cervicais (2%), citologias oculares (1%), citologias nasais (1%), entre outras. As citologias prostáticas por PAAF ecoguiada (18%) foram também muito acompanhadas em canídeos, durante o período de estágio (**Figura 17**).

Um método diagnóstico basilar, usado para avaliar a natureza de uma efusão, é a análise citológica e, para tal, importa saber que, fisiologicamente, as cavidades corporais se encontram preenchidas por uma pequena quantidade de fluido seroso, o qual contém células mesoteliais e outras células como macrófagos, uma escassa percentagem de população de neutrófilos degenerados e de pequenos linfócitos maduros (Sharkey *et al.*, 2014a; Santos & Marcos, 2011).

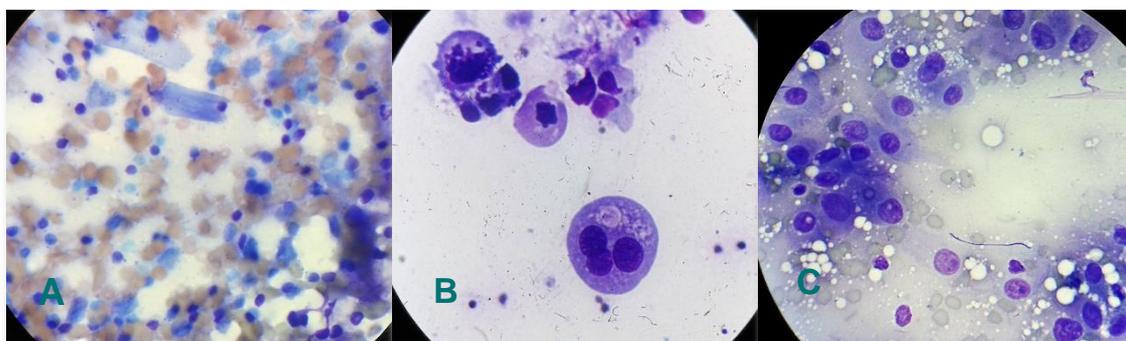


Figura 17 Imagens microscópicas de citologias realizadas no HVPT: (A) Carcinoma prostático em canídeo, Obj.x1000; (B) citologia de coto cervical em felídeo, evidenciando características celulares de malignidade, Obj. x400; (C) citologia periocular em canídeo diagnosticado com carcinoma epitelial indiferenciado, DQ, x1000 (Cortesia de HVPT e de Doutora Josefina Coucelo).

A recolha de uma **efusão cavitária** (*i.e.*, acumulação atípica de fluído no interior de espaços ou de cavidades corporais, nomeadamente na cavidade torácica, peritoneal, pleural e pericárdica) (Dempsey & Ewing, 2011; Ganjei-Azar *et al.*, 2011), para além de ser um procedimento clínico utilizado de modo terapêutico, segundo Santos & Marcos (2011), constitui, fundamentalmente, um “*procedimento com valor diagnóstico*”. As efusões são consideradas entidades clínicas comumente diagnosticadas em pequenos animais e são achados clínicos inespecíficos, cuja formação e acumulação pode resultar de uma variedade de processos patológicos, possuindo etiologia multifatorial (Dempsey & Ewing, 2011), tal como evidencia o

Quadro 4 Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à origem das efusões (adaptado de Santos & Marcos, 2011; Dempsey & Ewing, 2011; Mills, 2012; Marrinhas, 2015)

Fisiopatologia das efusões

1. Obstrução linfática
2. Processos neoplásicos
3. Infeções
4. Rotura de vísceras (*e.g.* rotura de bexiga – uroperitoneu; rotura da vesícula biliar – peritonite biliar, *etc.*)
5. Traumas locais
6. Doenças sistémicas (*e.g.* IH e IC)
7. Aumento da permeabilidade capilar (*e.g.* inflamação, vasculite e tromboembolismo)
8. Aumento da pressão hidrostática vascular
9. Hemorragia cavitária (*e.g.* trauma, deficiência em fatores de coagulação sanguínea e trombocitopenia)

Legenda: IH – Insuficiência Hepática; IC – Insuficiência Cardíaca

quadro 4.

É através da **análise citológica da efusão** que podemos avaliar a morfologia da população celular existente e o tipo predominante de células (Marrinhas, 2015) (**Figura 18**). A avaliação citológica de uma pequena fração do líquido colhido de uma efusão é um dos parâmetros a analisar após efetuada uma avaliação bioquímica primária através de um

refratómetro (para quantificação de proteínas presentes) e uma contagem de células totais/ μL presentes no fluído, em câmara de Neubauer ou em contador automático (Santos & Marcos, 2011). Esta avaliação integra a realização de um exame microscópico da preparação citológica,

o qual, segundo Marrinhas (2015), constitui um dos critérios de diagnóstico mais relevantes para aferir acerca da origem do fluido, particularmente quando há suspeita da existência de um processo neoplásico subjacente ou de uma infeção de etiologia bacteriana.

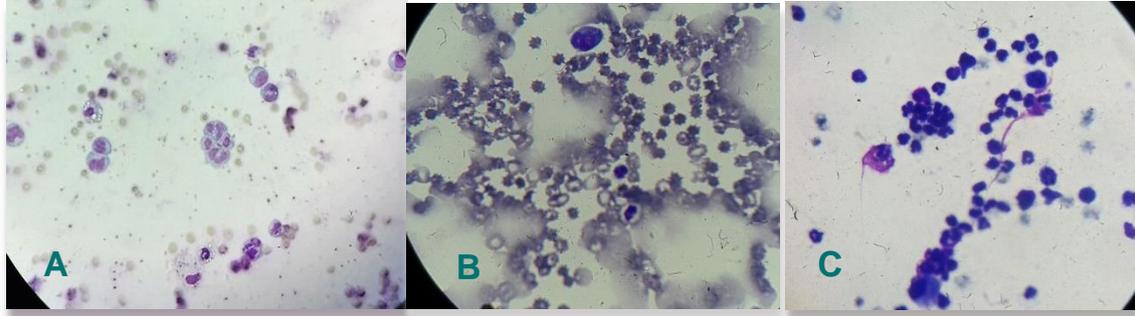


Figura 18| Fotomicrografias de citologias de efusões cavitárias: (A) citologia de **efusão pericárdica** de um canídeo, com suspeita de linfoma. DQ, x1000., (B) imagem de uma citologia de **efusão pleural** de um canídeo, evidenciando numerosos eritrócitos espiculados, Ghost cells e neutrófilo e (C) imagem ilustrativa de uma **peritonite séptica** num canídeo, notar o predomínio de neutrófilos presentes na efusão (Cortesia de Cláudio Grou, HVPT e fotomicrografias da autora).

As **efusões ou derrames cavitários** são clinicamente classificadas, com base na sua etiologia, seguindo a adotada classificação clássica, em três principais categorias: transudado puro, transudado modificado e exsudado (séptico ou não séptico) (Radin & Wellman, 2004; Dempsey & Ewing, 2011). Esta classificação baseia-se substancialmente, na contagem de células totais presentes na efusão, no tipo de populações celulares que contém e na sua concentração proteica (Rebar & Thompson, 2010; Santos & Marcos, 2011), tal como evidencia a **tabela 5**. Não obstante, esta tradicional categorização sofreu algumas modificações passando-se a incluir na classificação as efusões resultantes da esfoliação de células e as efusões causadas pela rotura de vasos, segundo a classificação proposta por O'Brien, em 1988 (Dempsey & Ewing, 2011).

Outra classificação independente da tradicionalmente descrita e adotada, categoriza as efusões em: **efusões neoplásicas**; **efusões hemorrágicas**; **efusões quilosas ou pseudoquilosas** (**Figura 19**), entre outras relacionadas com situações clínicas específicas, tais como efusões associadas à forma exsudativa de peritonite infecciosa felina ou a uroabdómen (associado a rotura da bexiga) (Rebar & Raskin, 2006; Dempsey & Ewing, 2011; Santos & Marcos, 2011).

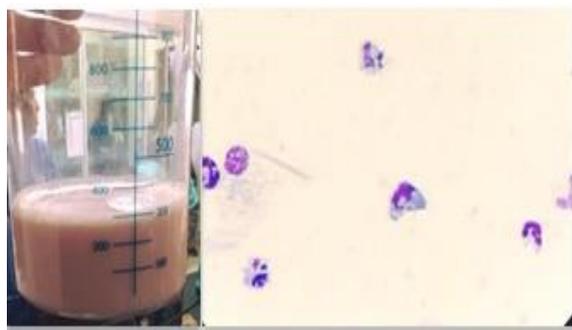


Figura 19| Quilotórax drenado de pulmão de um canídeo adulto (à esquerda) e citologia do fluído linfático drenado (à direita) evidenciado presença de múltiplas células polimorfonucleares (neutrófilos) (Fotografias de HVPT).

Tabela 5| Classificação das efusões cavitárias quanto às suas características principais.

Tipo de efusão cavitária			
Caraterísticas principais	Transudado puro	Transudado modificado	Exsudado
Aspeto/ Cor	Claro ou incolor	Amarelo, +/- opaco ou transparente	Usualmente opaco ou amarelado
Densidade Específica	<1,014	1,014 - 1,020 (variável)	>1,020
Concentração proteica (g/dL)	<2,5	2,5 - 3,0 (variável)	>3,0
Contagem celular/ μ L	<1000	500-10 000	>5000
Tipo celular predominante	Células mononucleadas (monócitos, mesoteliais)	Macrófagos, monócitos, linfócitos, células mesoteliais, eritrócitos	Majoritariamente Neutrófilos , monócitos e eritrócitos
Bactérias	Ausente	Ausente	Presentes (+/-)
Exemplos de causas subjacentes	Insuficiência cardíaca (IC) direita em gatos	IC, neoplasia, hérnia diafragmática	Torsão de lobo pulmonar, sépsis, neoplasia

(adaptado de Radin & Wellman, 2004; North & Banks, 2009; Rebar & Thompson 2010; Santos & Marcos, 2011).

Inovadoras técnicas têm sido usadas para complementar a avaliação citológica de efusões em cães e gatos, tal como a técnica do “*cell tube*” ou citotubo, a qual, segundo foi reportado tem possibilitado diferenciar células mesoteliais reativas de células neoplásicas metastáticas, bem como o recurso a citocentrífuga (*cytospin*) para fluídos de baixa celularidade (Marcos, 2013; Marrinhas, 2015; Marcos *et al.*, 2016).

1.3.2.8. Testes imunológicos

As preciosas aplicações diagnósticas dos testes imunológicos vieram possibilitar não só a deteção de anticorpos (Ac) ou de antigénios (Ag) específicos, de um determinado microrganismo, numa amostra biológica (e.g. soro), como também, permitir, de um modo indireto, o conhecimento da possibilidade de o animal ter estado previamente exposto a esse microrganismo (Tizard, 2014).

Para o reconhecimento da presença de Ac e Ag numa amostra específica, na área da Medicina Veterinária, pode recorrer-se a variadas provas diagnósticas, sendo particularmente utilizadas em pequenos animais, as provas **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e **Imunofluorescência** (IF) (Little & Lindsay, 2012; Tizard, 2014).

Durante o período de estágio, pôde constatar-se que foram maioritariamente solicitadas à DNAtch, análises pelo método ELISA (Leiscan®), nomeadamente para pesquisa de Ac's anti-*Leishmania infantum*, na espécie canina. As segundas análises mais requeridas foram a pesquisa de Ac anti-*Mycoplasma* spp. e a pesquisa de Ac anti-*Rickettsia* spp. (**Gráfico 7**) também com maior representatividade na espécie canina.

Deve ser salientado que na categoria “*Outros*” foram integradas algumas análises específicas com menor representatividade, tais como a deteção de Ag's ou Ac's virais ou parasitários (e.g. pesquisa de Ac anti-raiva; Ag de *Parvovirus* spp., Ag de *Dirofilaria immitis*, entre outros não referidos).

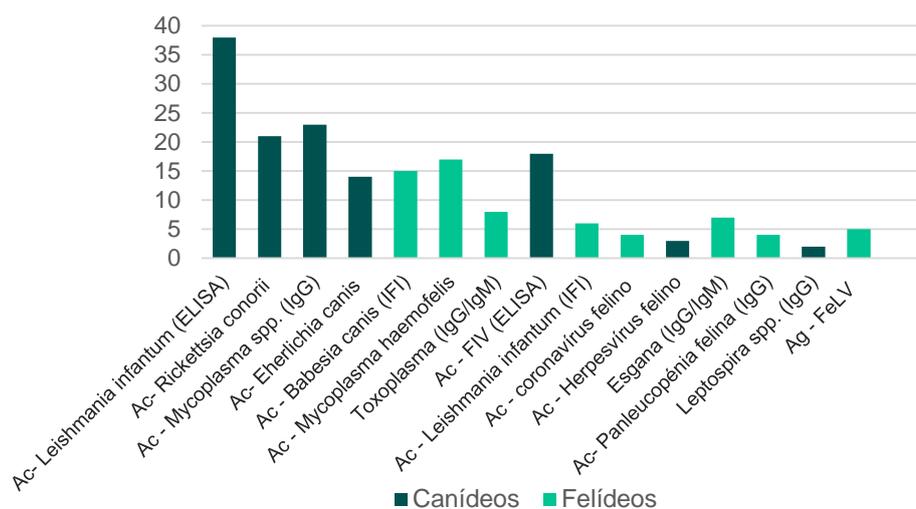


Gráfico 7. Testes imunológicos observados (n= 194).

O **ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)** consiste num dos imunoenaios enzimáticos com elevada sensibilidade diagnóstica mais usados no diagnóstico laboratorial de várias doenças parasitárias e infecciosas, o qual possibilita a deteção e quantificação, quer de Ag quer de Ac, na amostra biológica do paciente testado (Cavalcanti *et al.*, 2008; Tizard, 2014). Trata-se de uma metodologia quantitativa que permite quantificar a ligação Ag-Ac através da atividade enzimática. Segundo Quinn *et al.* (2005) são conhecidos vários métodos de imunoenensaio, porém os mais comumente usados são: o ELISA direto (o qual permite a deteção de Ag) e o ELISA indireto (que deteta somente Ac na amostra-teste).

1.3.2.9. Análises microbiológicas

No que se refere ao âmbito das análises realizadas na área da Microbiologia é possível constatar através da **tabela 6** que as análises que tiveram maior representatividade durante o estágio foram a pesquisa de fungos em meio de cultura *Dermatophyte Test Medium* (DTM) e os testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA).

Tabela 6| Análises microbiológicas observadas

Análise Microbiológica	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fip Exóticos	Fi	Fr (%)
Cultura micológica					
DTM	14	9	3	26	25,74
TSA	15	9	2	26	25,74
Urocultura	7	8	-	15	14,85
Cultura de exsudado	9	2	-	11	10,89
Cultura de aeróbios	5	4	-	9	8,91
Cultura de anaeróbios	6	2	-	8	7,92
Coprocultura	2	3	-	5	4,95
Cultura de LCR	1	-	-	1	0,99
TOTAL				101	100

Legenda: TSA – Testes de sensibilidade a antibióticos; LCR – Líquido cefalorraquidiano; DTM – *Dermatophyte Test Medium*.

Verifica-se que estes testes de diagnóstico foram especialmente realizados na espécie canina, em detrimento da espécie felina e outras espécies observadas. É importante ressaltar que, o diagnóstico de dermatofitoses em meio DTM era sempre efetuado no HVPT, ao passo que os TSA eram realizados no laboratório DNAtch, sendo apenas efetuadas as colheitas das amostras no local de estágio.

Em Micologia Clínica Veterinária a cultura fúngica para dermatófitos, em ***Dermatophyte Test Medium (DTM)***, é um dos meios mais usados na prática clínica diária para um célere despiste de dermatofitose ou micose queratinoflica (*i.e.* micose superficial considerada de elevado potencial zoonótico e de índole infeccioso que se desenvolve preferencialmente, ao nível da porção queratinizada dos tecidos) (Scott *et al.*, 2001; Barr & Bowman, 2012). O DTM é considerado o meio ideal para o isolamento fúngico de géneros como *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. e *Epidermophyton* spp. (Patel & Forsythe, 2010). Este meio basicamente, consiste num meio nutritivo apresentando na sua composição química, carboidratos, antibióticos (*e.g.* a gentamicina, a clortetraciclina e o cloranfenicol), para inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Contém ainda agentes antifúngicos para inibir o crescimento de possíveis contaminantes fúngicos, antimetabolitos, como a cicloheximida (um inibidor de síntese proteica) e um indicador de pH, o vermelho de fenol (Littlewood, 2003; Moriello & DeBoer, 2012; Miller *et al.*, 2013). Fundamentalmente, o princípio básico deste teste assenta na metabolização primária das proteínas contidas no meio por parte dos dermatófitos que nele crescem, levando a uma viragem do indicador de pH (vermelho de fenol), que se torna vermelho de forma gradual, por ação dos metabolitos alcalinos produzidos pelo fungo no meio de cultura. Esta viragem de cor do meio normalmente, ocorre antes que haja crescimento das primeiras colónias ou poderá ocorrer ao mesmo tempo que estas começam a aparecer (Moriello, 2001; Angus, 2005; Moriello & DeBoer, 2012) (**Figura 20**).



Figura 20| Cultura positiva em DTM para diagnóstico de dermatofitose, realizado em um canídeo jovem. (A) Notar o halo avermelhado no verso da placa, formado quando ocorre mudança de cor do meio de amarelo para vermelho poucos dias após a inoculação da amostra de pêlos e a aparição do crescimento de uma colónia; (B) A mesma placa de DTM passada uma semana da inoculação, totalmente avermelhada denotando a existência de uma colónia branca de dermatófitos e (C) meio com presença de fungos contaminantes com colónias de coloração característica cinzenta-esverdeada (Cortesia de HVPT).

Durante a incubação, para que ocorra o crescimento das colónias, é necessário que as placas contendo o meio de cultura sejam colocadas num ambiente escuro (propício ao desenvolvimento fúngico), protegidas da dessecação e à temperatura de aproximadamente, 25

°C. Segundo Angus (2005), um estudo realizado por outros autores sugeriu que a temperatura ambiente poderia originar um crescimento fúngico mais lento e por outro lado, conduzir à obtenção de resultados falsos-negativos aquando da interpretação do teste. Por outro lado, o isolamento do exterior das placas, utilizando e.g. fita adesiva, ajuda a evitar a possível contaminação cruzada, a dessecação e o desenvolvimento de outros microrganismos no interior da placa contendo o meio de cultura. A interpretação dos resultados deste teste encontra-se sumariamente apresentada no **quadro 5**.

Quadro 5 Interpretação diagnóstica de uma placa de DTM do kit Uranovet® Dermatofitos. (adaptado de Uranovet®, 2016)			
Mudança de cor do meio de cultura	Período de tempo (incubação)	Cor das colónias	Interpretação dos resultados
Nenhuma alteração	A partir de 12 dias	Sem crescimento de dermatófitos	Resultado negativo
Amarelo → Vermelho	Entre 2 a 12 dias	Branças (com aspeto de algodão)	Resultado positivo
Amarelo → Vermelho	A partir de 12 dias	Castanhas, cinza ou esverdeadas	Resultado negativo - Há crescimento de flora saprófita ou presumíveis contaminantes
Nenhuma alteração	A partir de 2 dias	Castanhas, cinza ou esverdeadas	Resultado negativo

No HVPT, sempre que se suspeitava da existência de uma possível dermatofitose recorria-se ao uso do teste comercial - o *kit* Uranotest Dermatofitos da Uranovet® - apresentado sob a forma de uma placa de Petri circular contendo o DTM. Deve ser referido que é muito importante que as placas sejam observadas diariamente, por forma a se obter uma correta interpretação do teste, pois pode ocorrer mudança de cor do meio sem que haja concretamente, crescimento de dermatófitos mas sim de fungos saprófitas ou contaminantes (Littlewood, 2003; Moriello & DeBoer, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Preconiza-se uma avaliação microscópica da morfologia dos macroconídeos característicos dos fungos dermatófitos (após coloração com lactofenol azul de algodão) (**Figura 21**), posteriormente à avaliação macroscópica da cor do meio e da morfologia das colónias formadas (Angus, 2005). O diagnóstico definitivo de dermatofitoses deverá ser o resultado do conjunto da aplicação prática de um leque de exames complementares de diagnóstico que inclui, o exame cutâneo com lâmpada de Wood, o exame direto dos pêlos para averiguar a presença de infeção ativa, a colheita de amostras para realização de cultura micológica, como também, da identificação microscópica dos fungos, entre outros procedimentos descritos (Moriello *et al.*, 2017).

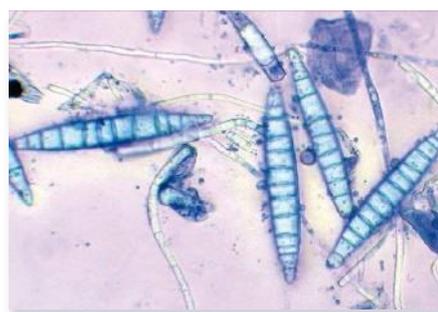


Figura 21| Morfologia característica dos fungos dermatófitos. Macroconídeos de dermatófitos da espécie *Microsporum canis* (Imagem adaptada de Algarra, 2014).

1.3.2.10. Análises histopatológicas

No que concerne à área de diagnóstico anatomopatológico, as análises histopatológicas (AH) foram, no decorrer do estágio, um dos tipos de exames mais requisitado ao laboratório DNAtech. A realização das técnicas de biópsia, colheita e conservação das amostras tiveram sempre lugar no Hospital, maioritariamente durante a realização de cirurgias efetuadas e, também, durante as consultas de rotina. Durante o estágio, a autora pôde verificar que as biópsias cutâneas (BC) representaram a maior parcela do total de biópsias realizado, no âmbito do campo de cirurgia de tecidos moles, tal como é ilustrado no **gráfico 6**. No **gráfico 7**, apresenta-se a distribuição de BC em função da espécie animal. Consta-se que não foram acompanhadas AH em outras espécies (e.g. animais exóticos). O número total de AH acompanhadas foi de $n=86$, o qual integra as biópsias realizadas em órgãos cavitários (e.g. o baço, o fígado, o pâncreas e o intestino), a pele e tecidos anexos, em glândulas (e.g. glândula (gl.) mamária e gl. perianal), em órgãos reprodutores (e.g. nos testículos, nos ovários e no útero), na língua e no plano nasal. Deverá ser referido que este número não reflete na íntegra o total de biópsias (especialmente, efetuadas em regime cirúrgico) que foram sendo efetuadas diariamente, não podendo assim abranger a globalidade da visualização/execução deste tipo de procedimentos, o que é compreensível face ao horário semanal rotativo desempenhado pela estagiária.

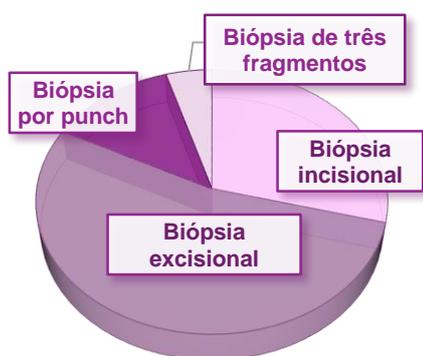


Gráfico 8. Tipos de biópsias cutâneas realizados no HVPT durante o período de estágio ($n=86$).

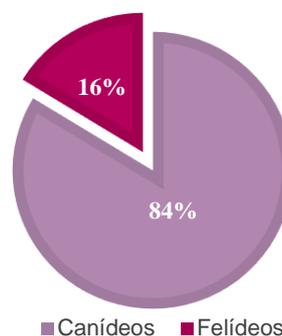


Gráfico 9. Biópsias cutâneas realizadas no HVPT em função da espécie animal ($n=86$).

Da análise do **gráfico 8** constata-se notoriamente que a técnica de biópsia mais realizada durante o período de estágio foi a biópsia excisional (exérese), seguida da biópsia incisional. A biópsia de três fragmentos (consiste na obtenção de apenas três fragmentos do tecido/órgão lesionado, a serem conservados posteriormente em formalina a 10%) foi a técnica que menor representatividade teve nesta área de diagnóstico, dado que foi a que menos se assistiu à sua realização. A partir do **gráfico 9**, é bastante perceptível que a espécie canina foi o alvo de maior atuação no que se refere à execução de análises para diagnóstico anatomopatológico. Efetivamente, verificou-se que foi nesta espécie que se diagnosticaram maior número de nódulos

cutâneos, bem como de lesões cutâneas sugestivas de processos neoplásicos, inflamatórios ou de origem autoimune, em detrimento da espécie felina.

Uma **biópsia** envolve a aquisição de uma amostra ou fração de um tecido lesionado, frequentemente destinado para análise microscópica histológica ou para avaliação imunohistoquímica, de modo a permitir uma melhor elucidação quanto ao tipo tecidual envolvido (**Figura 22**), no que tange às suas características fenotípicas, histológicas e moleculares, relacionando-as com a sua origem, com o intuito de estabelecer um diagnóstico das lesões patentes mais fidedigno e um prognóstico mais rigoroso (Ehrhart & Withrow, 2007). O recurso à realização de uma biópsia cutânea (BC) revela-se



Figura 22 Biópsia excisional de um nódulo cutâneo ulcerado localizado num membro posterior de um canídeo (A) e imagem de um nódulo cutâneo conservado em formol a 10% (Fotografias de autora).

não raras vezes, necessário como método auxiliar no diagnóstico de neoplasias cutâneas e subcutâneas, sendo correntemente empregue na área da dermatologia, permitindo orientar o clínico veterinário na determinação de um diagnóstico definitivo e avaliar o curso do processo patológico presente (Peleteiro, 1996). Esta técnica está especialmente indicada sempre que se suspeite de uma lesão neoplásica ou em casos de evolução atípica do tecido observado, não responsivo da forma esperada a terapêutica realizada e que necessita de um parecer por parte de um patologista veterinário, estando também indicada em lesões ulcerativas crónicas ou dermatoses de aspeto agravado e em lesões de índole desconhecida (Peleteiro & Carvalho, 2002; Loures & Conceição, 2013).

A escolha criteriosa do local a biopsiar é um aspeto muito relevante, bem como a posterior preservação dos fragmentos recolhidos em fixador apropriado (e.g. formalina ou formol a 10%), por forma a se obter uma correta interpretação histológica da amostra submetida a AH. Preferencialmente, recomenda-se realizar uma BC em lesões primárias (e.g. nódulos, zonas de alopecia, pústulas, etc.), já que ao contrário das lesões secundárias, estas não sofreram alterações intrínsecas ou, em alternativa, devemos incidir em lesões secundárias mais recentes, no caso de não se observarem lesões primárias visíveis. De modo a dispormos de material biológico suficiente para ser analisado, devem ser colhidas amostras provenientes de várias zonas afetadas e devem, sempre que possível, ser colhidas amostras que sejam representativas de toda a lesão subjacente, não refletindo somente uma parte desta (Peleteiro, 1996). Deve ter-se especial atenção em não lavar ou raspar o local a ser biopsiado, para não remover componentes celulares relevantes (e.g. crostas ou resíduos de queratina) e ectoparasitas da superfície cutânea, os quais é importante preservar, minimizando possíveis modificações do estado tecidual (Peleteiro & Carvalho, 2002).

Para proceder à execução desta técnica deve realizar-se previamente uma cuidada tricotomia da região (não rente ao pêlo), bem como a posterior demarcação do local a intervir com caneta de feltro. Peleteiro & Carvalho (2002) reforçam que a desinfeção com álcool *ad anteriori* a este procedimento, não é recomendada. A BC é um procedimento que requer por norma, a realização de uma anestesia local prévia (e.g. com lidocaína a 2%), efetuada em leque, ou seja, na periferia da lesão (e.g. ao nível do tecido subcutâneo, se este não estiver afetado). De acordo com Peleteiro (1996) preconiza-se a execução da biópsia passados sensivelmente cinco a dez minutos após se ter efetuado anestesia local na região lesional. Em tecidos com maior sensibilidade, tais como a pele da região periorbital, nas almofadinhas plantares ou no plano nasal, recomenda-se a realização prévia de uma anestesia geral para proceder à biópsia das lesões (Peleteiro & Carvalho, 2002). Além disso, para grandes retalhos cutâneos a biopsiar, é fundamental ter um sólido conhecimento dos princípios cirúrgicos e procedimentos básicos inerentes à prática da cirurgia oncológica cutânea, requerendo a realização de uma anestesia geral, por se tratar de um procedimento mais invasivo, potencialmente doloroso para o animal e mais moroso (Liptak, 2009). Existe um leque variado de técnicas que podem ser efetuadas para proceder a uma biópsia cutânea, cuja eleição está relacionada com a configuração anatómica da lesão, com a experiência e preferência pessoal por quem a executa (North & Banks, 2009). Alguns dos métodos mais frequentemente usados na prática clínica são: a *biópsia incisional*, a *biópsia por punch*, a *biópsia excisional* e a *biópsia por agulha Tru-cut* (**Figura 23**). Esta última não foi executada durante o estágio.

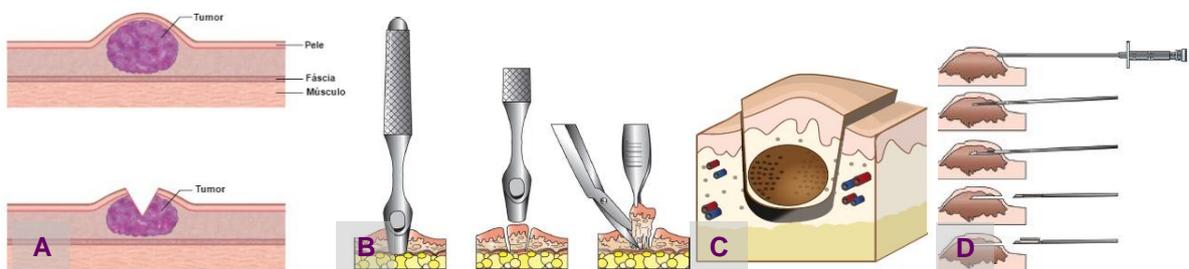


Figura 23| Principais técnicas de biópsias cutâneas realizadas em Dermatologia Veterinária: (A) incisional; (B) por punch; (C) excisional e (D) por agulha Tru-cut (adaptado de Ehrhart & Withrow, 2007; North & Banks, 2009 e Couto & Moreno, 2013).

No **quadro 6**, encontram-se as principais diferenças entre os distintos métodos de biópsia aludidos anteriormente.

Quadro 6 | Diferenças entre os principais tipos de métodos usados em BC
(Peleteiro, 1996; Ehrhart & Withrow, 2007; North & Banks, 2009; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Aspetos descritivos gerais

- A. Biópsia incisional:** técnica de mínima intervenção cirúrgica preferencial em lesões únicas necróticas ou ulceradas, permitindo obter uma amostra tecidual mais representativa da profundidade dos planos tecidulares cutâneos afetados. A amostra de tecido é obtida através da realização de uma incisão em forma de cunha ou talhada de melão, com **lâmina de bisturi**. Necessária, a realização de uma anestesia geral na maioria dos casos.
- B. Biópsia por punch:** usada em pequenas lesões cutâneas (de diâmetro entre 2 a 6 mm) regulares, superficiais sendo efetuada com um biótomo descartável ou **“punch”** que permite

remover a fração lesional até à hipoderme, através de um suave movimento rotacional unidirecional, dirigido profundamente nas camadas da pele. Para tal, é necessária uma prévia anestesia local. A amostra obtida é destacada da pele através de uma pinça e cortada com recurso a tesoura de bicos finos curvos. Posteriormente, é necessária a sutura com fio de seda, do local intervencionado com um ou dois pontos simples de sutura para encerramento da ferida cirúrgica. O punch de 4 mm deverá ser usado em lesões de difícil sutura (pálpebras e focinho).

C. *Biópsia excisional:* pode ser usada como procedimento diagnóstico ou terapêutico (excisão completa) e baseia-se na remoção (exérese cirúrgica) de uma massa localizada mais profundamente e com maior extensão na pele. Realizada uma incisão elíptica (com margens de 2 a 3 cm) com auxílio de uma **lâmina de bisturi**, tendo por base margens de ressecção definidas. O encerramento do defeito cutâneo geralmente, requer intervenção de técnicas de cirurgia reconstrutiva (e.g. realização de *flaps* cutâneos). O retalho cutâneo excisado engloba tanto tecido lesionado como tecido normal. A excisão completa recorrendo a margens de segurança menores, está preconizada em neoplasias benignas.

D. *Biópsia por agulha Tru-cut:* método de mínima invasão que pode ser usado em massas externas palpáveis, com recurso à utilização de uma **agulha Tru-cut** que perfura o interior da massa e permite recolher uma pequena fração da amostra lesional. Apresenta como principal limitação, a obtenção de amostras de reduzidas dimensões que podem ser insuficientes para o estabelecimento de um diagnóstico histopatológico preciso.

Relativamente a todo o material biológico destinado para AH, este deverá ser devidamente acondicionado em recipientes apropriados de plástico (hermeticamente selados, exteriormente com adesivo), contendo material fixador cujo volume recomendado deve ser sempre dez vezes superior ao volume da peça a fixar, sendo corretamente identificados com a indicação do tipo de peça cirúrgica a remeter para análise laboratorial (Peleteiro, 1996). Qualquer tipo de material a enviar para laboratório de anatomia patológica deverá sempre ser acompanhado de uma ficha de requisição específica (de preferência totalmente preenchida com os dados do paciente e identificação minuciosa da lesão observada e remetida) (Vala & Pires, 2016).

1.3.2.11. Análises endocrinológicas

Através da observação da **tabela 7**, é possível constatar que o doseamento sérico da hormona tiroxina total (tT4) foi a análise endocrinológica, em que se observou maior representatividade com uma Fr de 62,16%, tendo apresentado maior relevo na espécie felina. Por outro lado, a segunda análise endocrinológica mais requerida ao laboratório externo DNAtech foi o doseamento de cortisol sérico, com uma Fr igual, de cerca de 7%, tendo tido maior representatividade na espécie canina. Não foram efetuados doseamentos séricos de hormonas sexuais (e.g. progesterona).

Tabela 7| Análises endocrinológicas realizadas

Análise Endocrinológica	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fi	Fr (%)
Doseamento sérico de tT4	19	27	46	62,16
Teste de supressão de Dexametasona	9	-	9	12,16
Teste de estimulação com ACTH	8	-	8	10,81
Doseamento de cortisol sérico	5	-	5	6,76
Doseamento sérico de T4 livre (IT4)	4	-	4	5,41
Doseamento sérico de TSH canina	2	-	2	2,70
TOTAL	47	24	74	100

Legenda: tT4 – Tiroxina total; TSH – Hormona tiroestimulante (Tirotropina); ACTH – Hormona corticotrófica.

O **doseamento sérico da hormona tiroxina total (tT4)** é um dos métodos mais utilizados para avaliar o estado funcional da glândula tiróide e é usado como meio auxiliar no diagnóstico em determinadas endocrinopatias. Dado que a mensuração sérica de tT4 é um meio relativamente barato e facilmente disponível, tem-se tornado no teste de eleição para o rastreio de hipertiroidismo em gatos de meia-idade e geriátricos, permanecendo um excelente teste para diagnosticar esta doença na população felina, especialmente nestas faixas etárias (Mooney, 2011; Mooney & Shiel, 2012; Peterson, 2013a).

Cunha *et al.* (2015) referem que o hipertiroidismo é considerado a endocrinopatia mais comumente diagnosticada no gato, verificando-se uma produção, excreção e circulação ativa exacerbada das hormonas tiroxina total (tT4) e da hormona Triiodotironina (T3), sendo esta afeção produzida por um anormal funcionamento da glândula tiróide (Shiel & Mooney, 2007; Cunha *et al.*, 2014). A generalidade dos felinos hipertiroideos apresentam uma concentração elevada de tT4 circulante, denotando valores aproximadamente, 20 vezes superiores aos limites dos intervalos de referência relatados para esta espécie animal. Não obstante, uma proporção significativa de felinos hipertiroideos (sensivelmente 10% de todos os casos e 40% dos casos classificados com hipertiroidismo leve) parecem possuir uma concentração sérica de tT4 dentro do intervalo de referência para a espécie (Feldman & Nelson, 2004; Mooney & Shiel, 2012). Há que ter em consideração que em gatos gravemente doentes que possuam valores médios a elevados de tT4 sérica não deveremos deixar de suspeitar da existência de hipertiroidismo concomitante (Mooney & Shiel, 2012). Contrariamente ao que ocorre na espécie felina, o hipertiroidismo raramente surge em cães, sendo o hipotiroidismo a afeção endócrina mais prevalente nesta espécie animal (Mooney, 2008). O hipotiroidismo caracteriza-se por ser uma endocrinopatia resultante de concentrações inadequadas (abaixo do nível sérico padronizado) das hormonas ativas tT4 e T3.

Até ao momento, a mensuração sérica da concentração de tT4 na espécie canina tem-se revelado um ótimo teste de diagnóstico de afeções da glândula tiróide. Se um paciente canino apresentar uma concentração sérica de tT4 dentro do valor de referência, tal pode ser considerado como normotiroideu (Montanha & Lopes, 2011). Deve ser salientado que, embora alguns canídeos apresentem níveis de tT4 abaixo do intervalo de referência para a espécie, tal resultado *per se* não permite confirmar assertivamente, o diagnóstico de hipotiroidismo (Catharine *et al.*, 2004). Por seu turno, sabe-se que, em aproximadamente, 8% de canídeos hipotiroideos, a existência de anticorpos contra tiroglobulina (TgAA's - *Antibodies against thyroglobulin*) conduz a concentrações séricas de tT4 falsamente elevadas (Mooney, 2008). Outros testes funcionais que podem auxiliar no despiste de disfunções com sede na glândula tiróide, tanto em felídeos como em canídeos, têm sido descritos: o doseamento sérico de Tiroxina livre (IT4) e de hormona tiroestimulante (TSH) endógena; a mensuração de TgAA's, bem como outros testes de função, dinâmicos, tais como, testes de estimulação com TSH e os testes de supressão com T3 (Ferguson, 2007; Shiel & Mooney, 2007; Mooney, 2008; Graham, 2009; Peterson, 2013b).

Existem diferentes formas de proceder à mensuração da tT4. Uma delas é através de testes rápidos de imunoensaio (e.g. *ELISA*), comercialmente disponíveis em *kits*, que podem ser eficazmente utilizados para uso interno a nível hospitalar, usando para tal uma amostra de soro do paciente a avaliar (Peterson, 2013b). Atualmente, esses testes podem ser realizados em analisadores bioquímicos, utilizando um *SNAPtest T4* ou e.g. clips/slides da IDEXX™ Laboratories®, que são colocados nesses analisadores e permitem determinar a concentração da hormona circulante no plasma ou no soro, permitindo rapidamente comparar os valores obtidos com os intervalos de referência e emitir um diagnóstico pouco moroso. Ainda de acordo com o autor supracitado, embora a correlação das concentrações séricas de tT4 providenciada pelos métodos de imunoensaio seja geralmente satisfatória, qualquer um destes métodos pode ocasionalmente, fornecer valores séricos de tT4 que podem ser falsamente altos ou baixos. Mooney (2008) refere como principais vantagens da mensuração sérica de tT4, o facto de se basear num método de diagnóstico de baixo custo, que permite uma fácil deteção da hormona tT4 e por constituir um marcador particularmente sensível para o diagnóstico de hipotiroidismo.

1.3.2.12. Testes de diagnóstico molecular

Os avanços biotecnológicos têm permitido, cada vez mais, uma crescente aplicabilidade das técnicas de biologia molecular como profícuos exames complementares no diagnóstico veterinário, ainda que os testes de diagnóstico serológico e microbiológico continuem a ser usados como ferramenta essencial em laboratórios de rotina, como imprescindíveis meios auxiliares no diagnóstico de muitas entidades clínicas infecciosas e parasitárias (Cavalcanti *et al.*, 2008; Tenreiro *et al.*, 2014).

O **gráfico 10**, evidencia todos os testes moleculares requisitados ao laboratório DNatech e cujas amostras biológicas foram colhidas no HVPT e conservadas no seu laboratório interno.

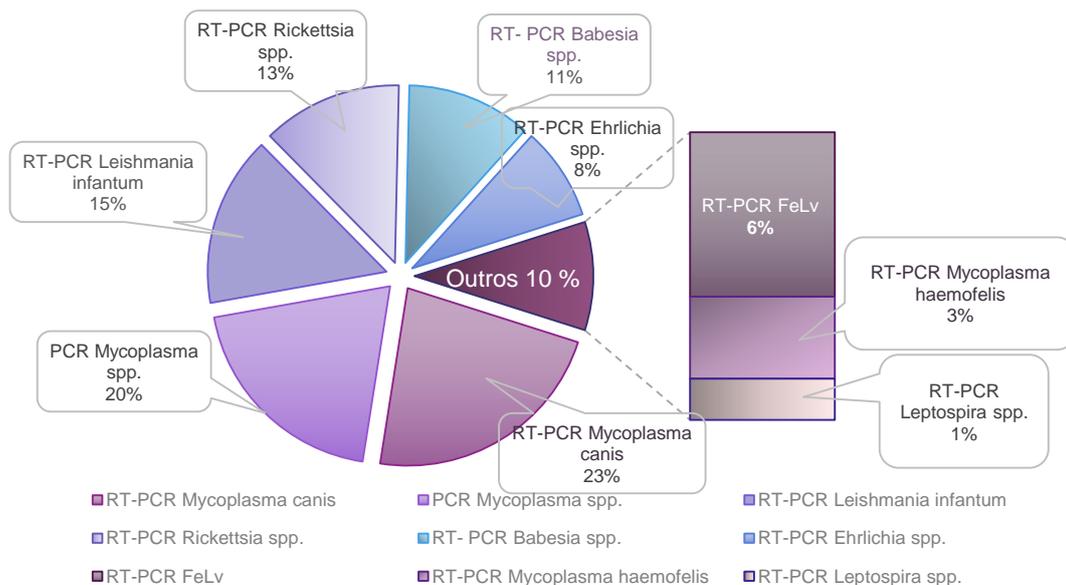


Gráfico 10. Testes de diagnóstico molecular observados (n= 71).

Devido à sua elevada especificidade e sensibilidade, os testes de biologia molecular permitem a deteção precoce de um vasto leque de agentes patogénicos emergentes, a identificação de agentes infecciosos (e.g. FeLV, FIV, *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma* spp., entre outros) e de agentes parasitários (e.g. *Dirofilaria immitis*, *Leishmania infantum*, entre outros vários) de um modo mais específico, bem como, a monitorização de doenças endémicas e/ou zoonóticas (Cunha & Inácio, 2014; Viveiros *et al.*, 2014), para além de virem complementar o prévio diagnóstico microbiológico e parasitário efetuado, vieram proporcionar uma maior rapidez de resposta do diagnóstico emitido (Tenreiro *et al.*, 2014; Pires & Alves, 2015).

A **Reação de Polimerase em Cadeia ou PCR (Polimerase Chain Reaction)** representa uma das técnicas de diagnóstico molecular mais usadas na rápida deteção e identificação de variados agentes patogénicos de índole infecciosa e parasitária constituindo um método molecular que possibilita a ampliação do número de cópias de uma região específica do genoma (DNA ou RNA) do agente patogénico, até determinados níveis detetáveis permitindo assim, a reprodução *in vitro* da replicação do material genético, com larga escala de repetibilidade (Cavalcanti *et al.*, 2008; Tenreiro *et al.*, 2014; Pires & Alves, 2015).

1.3.2.13. Provas de coagulação sanguínea

Da observação da **tabela 8** pode constatar-se que as provas de coagulação sanguínea mais observadas foram os tempos de coagulação sanguínea, designadamente, o Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e o Tempo de Protrombina (TP), particularmente com maior representatividade observada na espécie canina, apresentando uma Fr de 32,56%. Este facto deve-se a estes testes terem sido efetuados com maior frequência em canídeos que se encontravam em regime de internamento hospitalar e que ingressaram no HVPT em situação de urgência ou com historial de doença oncológica, possuindo grande parte deles instabilidade hemodinâmica e suspeita de coagulação intravascular disseminada (CID). Estas são consideradas indicações justificáveis para a realização de provas desta natureza.

Tabela 8/ Provas de coagulação sanguínea realizadas

Provas de coagulação sanguínea	Fip Canídeos	Fip Felídeos	Fi	Fr (%)
APTT	12	2	14	32,56
TP	12	2	14	32,56
Painel analítico completo	5	1	6	13,95
AT III	4	-	4	9,30
TT	2	-	2	4,65
Fibrinogénio	2	-	2	4,65
FvW	1	-	1	2,33
TOTAL	38	5	43	100

Legenda: APTT - Tempo de tromboplastina parcial ativada; TP - Tempo de Protrombina; TT - Tempo de trombina; AT III - Antitrombina; FvW - Fator de Von Willebrand.

Deverá também ser referido que o APTT e o TP representaram parâmetros analíticos com iguais Fr dentro da totalidade de provas efetuadas, uma vez que ambos eram mensurados simultaneamente com o mesmo analisador portátil de coagulação. As restantes provas

específicas de coagulação eram solicitadas ao laboratório DNAtech, sempre que se considerasse pertinente e atendendo ao quadro clínico manifestado pelos animais.

As **provas de coagulação sanguínea** constituem, atualmente, um proficiente meio auxiliar no diagnóstico de distúrbios da hemostase, tendo vindo a ganhar maior relevo na área do diagnóstico laboratorial em Medicina Veterinária. Estas provas permitem avaliar indiretamente a integridade dos sistemas de coagulação sanguínea e, assim, possibilitar o diagnóstico de alterações hemodinâmicas que podem representar um potencial risco para a vida dos pacientes. No caso de existir uma disfunção em qualquer um dos componentes envolvidos nos mecanismos hemostáticos e do equilíbrio interno hemodinâmico do paciente, poderá culminar no desenvolvimento de um grau excessivo de hemostase, podendo originar-se posteriormente, uma coagulação obstrutiva (*i.e.* um processo tromboembólico) ou, pelo contrário, resultar numa hemostase inadequada (*i.e.* numa hemorragia ativa). Os distúrbios de coagulação são gerados, maioritariamente, pela ocorrência de alterações das vias de coagulação intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação sanguínea (Arnold, 2011). Geralmente, a presença de desordens hemostáticas (DH) pode ser confirmada através da combinação de vários meios, *i.e.*, pela história clínica do paciente; através dos sinais clínicos observados; pelos achados clínicos adquiridos através de exame físico completo, que possam sugerir a existência de defeitos hemostáticos (*e.g.* a presença de hemorragia espontânea), que não estão relacionados com trauma ou lesão tecidual e, não menos relevante, pelo resultado obtido em testes *screening* específicos, que avaliam os sistemas hemostáticos fisiológicos (Meinkoth & Lorenz, 2009; Gómez & Wolberg, 2014; Baker, 2015). De entre as DH mais comuns que podem ser diagnosticadas, com o auxílio da realização de análises de coagulação do sangue, alguns autores apontam as seguintes: a disfunção plaquetária, a trombocitopénia, a Doença de Von Willebrand (vDW), a intoxicação por rodenticidas, a CID e a hemofilia.

Por outro lado, as DH que parecem ser menos comumente diagnosticadas em pequenos animais tendem a ser o tromboembolismo aórtico felino e o tromboembolismo pulmonar (Prater & Tvedten, 2004; Meinkoth & Lorenz, 2009; Arnold, 2011). Sabe-se que na prática clínica veterinária, no que concerne ao diagnóstico de alterações hemostáticas, desde sempre se tem atribuído maior relevo aos distúrbios hemorrágicos, especialmente na espécie canina, em detrimento de outras espécies animais, por nesta serem mais significativos e exuberantes (Arnold, 2011). Nelson & Couto (2006) referem que, em canídeos, a hemorragia espontânea constitui o distúrbio hemostático mais frequente, estando associado a patogenia imunomediada e, em felídeos, determinadas afeções clínicas como as hepatopatias, processos neoplásicos e virais evidenciam usualmente alterações hemostáticas em testes de coagulação sanguínea. Para avaliar as anomalias da hemostase, usualmente verificadas nos casos que surgem com frequência na prática clínica, pode recorrer-se à análise e interpretação dos tempos de coagulação sanguínea, através da célere avaliação do APTT e do TP.

No HVPT as provas de coagulação eram realizadas com recurso a um aparelho analisador portátil para avaliação de coagulação (qLabs®Vet Coag Panel 2 Combo) (**Figura 24**), o qual permite medir simultaneamente, o APTT e o TP de uma forma simples e rápida, sendo apenas necessário aplicar no aparelho uma tira descartável de medição dos tempos de coagulação (específica para canídeos e felídeos, já que, os parâmetros a avaliar diferem entre espécies) e colocar sobre esta, 10 a 20 µL de uma amostra de sangue venoso periférico, colhida por venopunção não traumática. Pode ser usado sangue fresco ou conservado em tubos contendo meio anticoagulante - citrato de sódio a 3,8% - que é um quelante de cálcio. A obtenção do resultado é efetuada em sensivelmente poucos segundos. A interpretação dos resultados obtidos é regida pelos valores padronizados (Jensen *et al.*,



Figura 24 | Aparelho analisador portátil dos tempos de coagulação utilizado no HVPT (Imagem de autora).

2014). A necessidade de realização de testes laboratoriais hemostáticos adicionais baseia-se nos resultados dos testes mencionados anteriormente, entre outros não referidos, como de testes para avaliar especificamente a hemostase primária e de testes para avaliar o sistema fibrinolítico e o processo de fibrinólise (Meinkoth & Lorenz, 2009; Herring & McMichel, 2012; Baker, 2015). Existem algumas enfermidades, congénitas ou adquiridas, onde se espera a obtenção de um APPT e de um TP prolongados, ao realizar uma prova de coagulação, tal como evidencia o **quadro 7** apresentado.

Quadro 7 Interpretação dos resultados em diferentes provas de coagulação sanguínea em alguns distúrbios hemostáticos mais frequentes (adaptado de Prater & Tvedten, 2004 e Nelson & Couto, 2006).							
Distúrbio hemostático	TS	TCA	TP	ATTP	Plaquetas	Fibrinogénio	PDF's
Trombocitopénia	↑	N	N	N	↓	N	N
Trombocitopatia	↑	N	N	N	N	N	N
Doença de Von Willebrand	↑	N	N	N	N	N	N
Hemofilias	N	↑	N	↑	↓	N	N
Intoxicação por rodenticidas	N	↑	↑	↑	N↓	N↓	N↑
CID	↑	↑	↑	↑	↓	N↓	↓

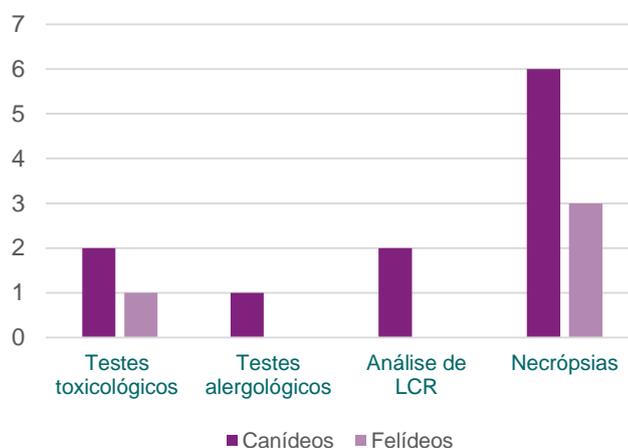
Legenda: TS - Tempo de sangramento; TCA – Tempo de coagulação ativada; TP- Tempo de protrombina; ATTP – Tempo de tromboplastina parcial ativada; PDF's – Produtos de degradação da fibrina; ↑-alto ou prolongado; N- normal ou negativo; ↓- baixo ou diminuído.

1.3.2.14. Outros exames complementares de diagnóstico

No **gráfico 11** estão representadas outras análises ou procedimentos adjuvantes no diagnóstico de algumas entidades clínicas que foram assistidos, mas os quais não integraram o leque de análises clínicas veterinárias mais vulgarmente realizadas no local de estágio e, tal como foi aludido anteriormente, não revelaram grande expressividade relativa face à casuística total observada. Da leitura do **gráfico 11**, é possível afirmar que as necrópsias constituíram um dos procedimentos de diagnóstico com maior destaque, apresentando uma Fr de 60% face à totalidade de casos referidos (n=15).

A **necrópsia** é o exame *post mortem*, o qual objetiva determinar a causa da doença ou morte do animal, através da avaliação do quadro lesional observado (Alves *et al.*, 2016; Seixas & Pires, 2016).

Citando os mesmos autores, o exame *post mortem* tem usualmente por objetivo determinar “(...) as circunstâncias e mecanismos em que a morte ocorreu e/ou determinar o tempo da morte; pode também avaliar se determinado evento ocorreu ante ou *post mortem* (...)” e, caso a etiologia que determinou a morte do animal seja conhecida, permite aferir acerca da sua real natureza, da localização e extensão das lesões apresentadas, bem como, de “(...) outras alterações que possam estar presentes no cadáver”. Sumariamente apresentam-se no **quadro 8**, os objetivos gerais da realização de uma necrópsia em qualquer animal.



Legenda: LCR – Líquido cefalorraquidiano

Gráfico 11. Outros exames auxiliares de diagnóstico observados (n=15).

Quadro 8 | Principais objetivos da realização de uma necrópsia de um animal
(adaptado de Alves *et al.*, 2016)

Objetivos gerais

1. Estabelecer as causas que condicionaram o surgimento de doença ou morte do animal;
2. Proceder à identificação de possíveis anomalias congénitas presentes;
3. Determinar o diagnóstico morfológico e etiológico da doença;
4. Confirmar o diagnóstico clínico e identificar a relação entre os dados clínicos e o processo patológico em questão;
5. Avaliar os resultados do tratamento instituído com o intuito de melhorar a sua aplicação;
6. Informar o clínico responsável da premência em estabelecer medidas sanitárias ou de saúde pública apropriadas;
7. Fazer um levantamento de dados suficientes para obter informação necessária à realização de uma análise estatística ou epidemiológica.

Uma necrópsia deve ser efetuada o mais celeremente possível após a morte ou eutanásia do animal (não devendo ultrapassar as 24 horas depois do óbito), dado que a realização de posteriores exames complementares de diagnóstico necessários poderá ser comprometida devido às alterações *post mortem* (nomeadamente, a aceleração da autólise tecidual), que se iniciam logo após a morte (Alves *et al.*, 2016; Correia & Pissarra, 2016). Correia & Pissarra (2016) reforçam que, caso a necrópsia não possa ser realizada após a morte do animal, o cadáver deverá ser refrigerado a uma temperatura entre os 0° e os 4°C, sendo colocado numa câmara frigorífica. O período de refrigeração não deverá ultrapassar os quatro dias, uma vez que o processo de decomposição do cadáver não é totalmente inviabilizado, ainda que seja retardado

pela refrigeração. Outro aspeto relevante a considerar, e que os mesmos autores enfatizam, é que só se deverá recorrer ao processo de congelação do cadáver em última instância, já que durante esse período poderão produzir-se danos significativos e irreversíveis nos tecidos devido à formação de cristais de gelo no interior das células. Paradoxalmente, Alves *et al.* (2016) não recomendam absolutamente a realização deste processo de conservação de cadáveres. A execução desta técnica deve sempre ser concretizada de modo sistemático (**Figura 25**) avaliando-se como um todo o conjunto de lesões observadas individualmente, sendo a avaliação constituída inicialmente pelos dados da história clínica do animal e posteriormente, pelo exame do cadáver, o qual se inicia pela apreciação do hábito externo e do hábito interno. Ao proceder-se à observação do exterior do cadáver do animal, deve avaliar-se com minúcia o seu estado de autólise (Branco, 2015). Por último, poderá recorrer-se à realização de exames complementares de diagnóstico, nomeadamente à colheita de amostras para exame histológico (Alves *et*

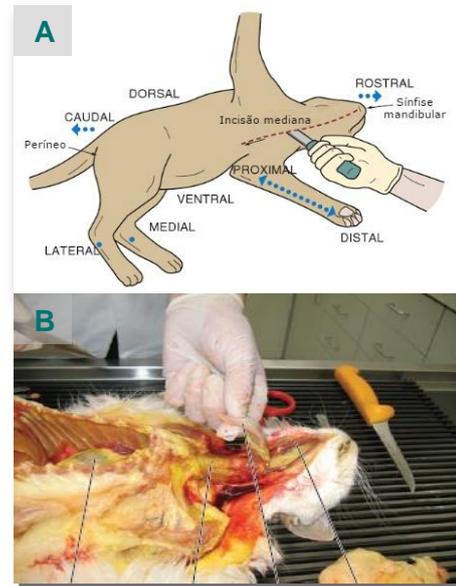


Figura 25| Necropsia de felídeo: (A) linhas anatômicas orientadoras para correta iniciação da necropsia; (B) processo de remoção da língua do interior da cavidade oral (Imagens adaptadas de Cochran, 2011; Bassert & Thomas, 2014).

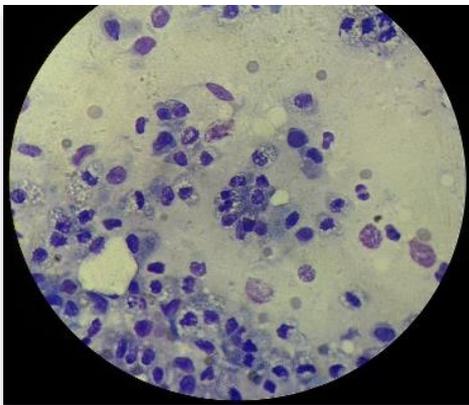


Figura 26| Imagem microscópica de uma preparação citológica por aposição de conteúdo de um nódulo pulmonar de um felino de 12 anos de idade, obtida durante a realização de uma necropsia no HVPT. A imagem é sugestiva de um adenocarcinoma pulmonar, em virtude das características morfológicas celulares. Notar a presença de uma população celular heterogénea com características de malignidade, evidenciando grupos de volumosas células epiteliais coesivas entre si, denotando pleomorfismo, marcadas anisocitose e anisocariose, com elevada relação núcleo: citoplasma e exibindo vacuolização citoplasmática indicativa de diferenciação glandular (DQ, x1000) (Cortesia de Doutora Josefina Coucelo).

al., 2016; McDonough & Southard, 2017).

O recurso à análise citológica como meio auxiliar no diagnóstico *post mortem* pode ser utilizado para obtenção de um diagnóstico preliminar de massas existentes no cadáver, avaliação de fluídos cavitários (e.g. exsudados) ou para uma rápida identificação de parasitas (Maxie & Miller, 2016) (**Figura 26**). Sempre que a necropsia não seja conclusiva, Correia & Pissarra (2016) recomendam que “(...) terá que ser completada com o exame histopatológico dos órgãos”. As amostras destinadas para AH e para exame toxicológico devem ser colhidas independentemente, ou seja, deverão ser colhidas pelo menos duas amostras provenientes de cada tecido, sendo que uma deverá ser conservada em formol a 10% (a fim de a remeter para histopatologia) e a restante, deverá ser conservada por refrigeração ou congelação em última instância,

servindo para um possível exame toxicológico (Jolly, 1969; Poppenga & Braselton, 1990, referido por Oliveira *et al.* (2002). O exame *post mortem* nestes casos pode permitir descartar uma etiologia não toxicológica como fator causal da morte do animal e também, auxiliar na minimização da lista de possíveis tóxicos potencialmente letais, a considerar (Oliveira *et al.*, 2002). Maxie & Miller (2016) referem que, na prática, o ideal seria correlacionar os achados citológicos com os achados histológicos. Para tal, os referidos autores apontam três tipos de material que necessitam ser enviados para laboratório para possibilitar a emissão de um diagnóstico anatomopatológico, sendo eles os seguintes: “(...) *cadáveres, órgãos e/ou fragmentos de órgãos (biópsias e peças cirúrgicas) e esfregaços em lâmina de vidro para exame citológico*”. No que diz respeito à realização de preparações citológicas, Branco (2015) realça que “ (...) *todos os esfregaços que se pretendam realizar devem ser feitos o mais rapidamente possível após a morte, com recurso a lâminas limpas e desengorduradas que se devem deixar secar antes de serem acondicionadas (...)*”. Relativamente às necrópsias assistidas no HVPT, na generalidade dos casos, não se conseguiu determinar a causa de morte do animal somente através deste exame, designadamente em canídeos, pelo que se justificou o recurso a outras análises complementares de diagnóstico que permitissem fornecer mais informações detalhadas, por forma a se obter um diagnóstico definitivo *post mortem*. Contudo, nalguns casos foi possível obter um diagnóstico citopatológico concordante com os achados de necrópsia e o diagnóstico histopatológico obtido.

1.3.3. Casuística relativa às neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas durante o estágio com o auxílio do exame citológico

Nesta categoria integrada na casuística geral observada no estágio é apresentada a contabilização global do número de casos em que se procedeu ao prévio exame citológico de neoplasias cutâneas e subcutâneas, bem como de outros processos patológicos de índole não neoplásica, em canídeos e felídeos acompanhados no HVPT. Todas as amostras citológicas avaliadas foram obtidas através da técnica de PAAF. Em alguns casos em que a citologia não se revelou elucidativa do tipo de processo neoplásico em curso, recorreu-se a posterior confirmação do diagnóstico por exame histopatológico. Num total de citologias efetuadas no decorrer do estágio (n=225), a estagiária pôde acompanhar 31 casos suspeitos de processos neoplásicos em canídeos e 23 casos em felídeos, atendendo às lesões macroscópicas apresentadas, compreendendo no total n=54 preparações citológicas avaliadas, cujo diagnóstico citopatológico foi efetuado no laboratório interno do HVPT.

No **gráfico 12** e **gráfico 13** encontra-se representada a distribuição das neoplasias diagnosticadas na espécie canina e felina, respetivamente, no que concerne à sua classificação inerente ao caráter de malignidade exibido, com base na morfologia celular evidenciada e no seu tipo histológico.

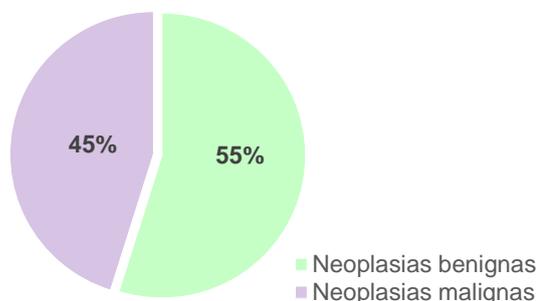


Gráfico 12. Neoplasias cutâneas benignas e malignas diagnosticadas **em canídeos (n=31)**.

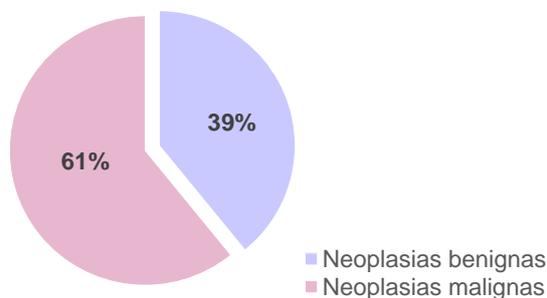


Gráfico 13. Neoplasias cutâneas benignas e malignas diagnosticadas **em felídeos (n=23)**.

Pela análise do **gráfico 12**, constata-se que na espécie canina foi diagnosticado um maior número de neoplasias benignas com localização na pele e anexos cutâneos (Fr =55%, n=31), em detrimento das neoplasias de caráter maligno. Por seu turno, na espécie felina verifica-se notoriamente que as neoplasias de caráter maligno (Fr=61%, n=23) apresentaram maior representatividade face às de caráter benigno, tal como é evidenciado no **gráfico 13**.

Deverá ser referido que os resultados inerentes ao diagnóstico citológico não se mostraram, na sua totalidade, concordantes em relação aos obtidos posteriormente pelo diagnóstico histopatológico, o que é expectável face às limitações diagnósticas intrínsecas da análise citológica. Verificou-se uma maior concordância de ambos os tipos de análise em neoplasias com origem nas células redondas o que, em parte, é justificado pela maior facilidade de diagnóstico citológico deste tipo de neoplasias devido aos padrões celulares exibidos microscopicamente. Na **tabela 9** apresentam-se os principais tipos histológicos diagnosticados das neoplasias acompanhadas no estágio.

Tabela 9| Principais tipos de neoplasias cutâneas diagnosticadas quanto à sua classificação histológica.

Tipos histológicos tumorais mais diagnosticados	Fi	Fr(%)
Tumores das células redondas	11	20,37
Lesões não neoplásicas	10	18,52
Tumores das gls. anexas	7	16,67
Tumores das gls. especializadas	9	12,96
Tumores melanocíticos	6	11,11
Tumores mesenquimais	4	7,41
Tumores epiteliais	4	7,41
Tumores dos folículos pilosos	3	5,55
TOTAL	N=54	100

Legenda: gls. - Glândulas

Depreendemos que o tipo histológico mais diagnosticado correspondeu às neoplasias das células redondas, designadamente tumor venéreo transmissível (TVT); histiocitoma cutâneo (HCT); linfoma epiteliotrópico e mastocitoma cutâneo canino (MTC) (**Figura 27**), denotando uma (Fr=20,37%, n=54) seguiram-se

os processos de caráter não neoplásico que incluíram processos de origem inflamatória e não

inflamatória, como hemartoma fibroso das estruturas anexas da pele; quistos foliculares do tipo infundibular; dermatites piogranulomatosas, etc., apresentando uma (Fr=18,52%, n=54).

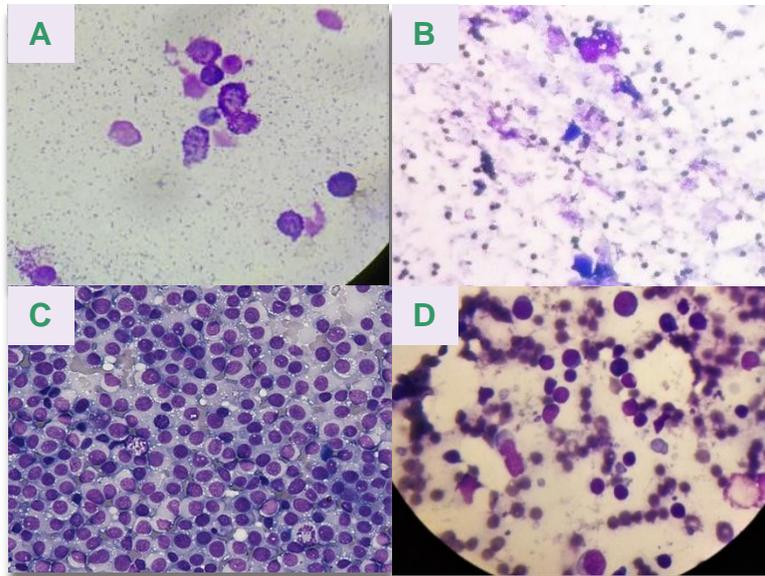


Figura 27| Imagens de preparações citológicas realizadas no HVPT evidenciando lesões de caráter neoplásico: (A) Aspirado de um mastocitoma cutâneo pouco diferenciado em um canídeo. Notar a presença de poucas células grandes (mastócitos) isoladas evidenciando moderada relação núcleo: citoplasma, anisocitose e anisocariose pouco marcadas, bem como raros grânulos intracitoplasmáticos característicos cor púrpura. Podem ser observados escassos eosinófilos na população celular presente (DQ, x600); (B) aspirado de um histiocitoma cutâneo canino. A população celular predominante observada é compatível com células histiocíticas apresentando uma forma ligeiramente arredondada, com núcleo central arredondado com cromatina grosseira, citoplasma eosinofílico denotando uma baixa relação núcleo: citoplasma (DQ, x1000); (C) Aspirado de um tumor venéreo transmissível (tumor de Sticker) de uma cadela. Evidencia-se um conjunto de células dispostas em tapete, arredondadas a ovais, com um núcleo arredondado ligeiramente excêntrico, um citoplasma pouco basofílico vacuolizado (de aspeto espumoso, devido à presença de vacúolos de tamanho regular), com elevada relação núcleo: citoplasma. Podem ser observadas figuras míticas e pequenos linfócitos dispersos (DQ, x600) e (D) Aspirado de massa cutânea cervical compatível com linfoma epiteliotrópico. Observa-se a presença de uma população celular heterogênea com escasso pleomorfismo com características linfóides (elevado número de linfócitos de pequeno tamanho e linfoblastos, por vezes de grande dimensão e um pouco atípicos) (DQ, x1000) (Fotomicrografias da autora).

O terceiro tipo tumoral mais prevalente foi representado pelos tumores das glândulas anexas, como o adenocarcinoma das glândulas apócrinas (ACGA), e o cistoadenoma das glândulas apócrinas (CGA), denotando uma Fr=16,67% (n=54). Não foram considerados nesta análise de casuística os casos cujo diagnóstico foi considerado inconclusivo.

O **gráfico 14** mostra a distribuição das neoplasias diagnosticadas em raças puras e cruzadas, tanto na espécie canina como na felina, e o **gráfico 15** evidencia a distribuição por sexo dos animais. Na globalidade dos casos acompanhados, foi identificada uma maior prevalência de neoplasias cutâneas em canídeos de raças puras (designadamente, em Labradores, *Rottweiler*, Yorkshire, Jack Russel, Pastor Alemão, Bichon e *Pitbull*).

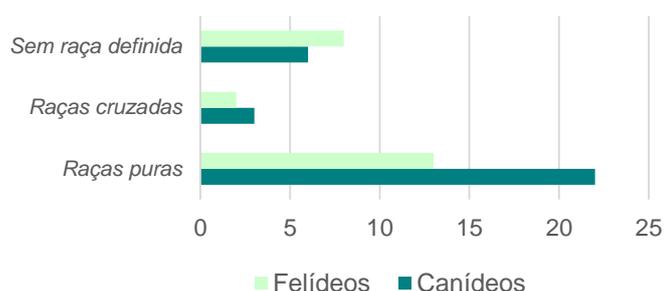


Gráfico 14. Distribuição das neoplasias em raças pura e cruzamentos (n=54).

No que tange à espécie felina, também se verificou maior número de neoplasias cutâneas diagnosticadas em animais de raça pura (e.g. Europeu comum e Persa), em detrimento de animais sem raça definida.

Quanto à distribuição de neoplasias atendendo ao sexo dos animais acometidos, constatou-se que quer na espécie felina quer na espécie canina, se observaram maior número de casos diagnosticados por citologia em animais do sexo masculino (Fr=76%, n=54) do que em pacientes do sexo feminino (Fr=24%, n=54) (**Gráfico 15**).

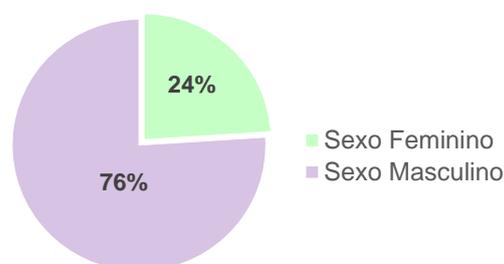


Gráfico 15. Distribuição por sexo nos pacientes observados em função das suas Fr (n=54).

Uma vez que o fator etário é um elemento

relevante no diagnóstico oncológico, procedeu-se à determinação das faixas etárias mais acometidas por tumores com localização cutânea e subcutânea, nas espécies canina e felina, tal como é dado a conhecer na **tabela 10**.

Tabela 10 Distribuição das faixas etárias dos pacientes diagnosticados com neoplasias cutâneas no HVPT.

Faixa etária	Canídeos (Fip)	Fr(%)	Felídeos (Fip)	Fr(%)
[5-10 m]	5	16,13%	-	-
[12 m – 5 A]	8	25,81%	9	39,13%
[>5 A- 10 A]	11	35,48%	6	26,09%
[10 A – 14 A]	7	22,58%	8	34,78%
n= 54	31	100	23	100

Legenda: m – meses; A – anos; - - sem registo observado.

Da análise da casuística observada, entende-se que, na espécie canina, os animais com faixa etária compreendida entre os cinco e os 10 anos de idade foram os que denotaram maior representatividade de entre a globalidade de neoplasias cutâneas diagnosticadas por citologia. Por outro lado, na espécie felina, foram diagnosticados maior número de casos de processos tumorais na pele em pacientes com idades compreendidas entre os 12 meses e os cinco anos de idade.

Os resultados alcançados corroboram o que vem descrito na literatura acerca da incidência de processos neoplásicos em animais geriátricos e à influência da predisposição de

determinadas raças puras para o desenvolvimento de tumores com localização cutânea (North & Banks, 2009; Martínez de Melro *et al.*, 2015). Não obstante, excecionalmente, verificou-se um pequeno número de animais aos quais foram diagnosticadas neoplasias com localização cutânea, numa faixa etária mais jovem, e.g. o HCT em canídeos. De acordo com Martínez de Melro *et al.* (2015) tem-se verificado uma diminuição da prevalência de neoplasias espontâneas em animais com faixa etária acima dos 12 anos de idade, ainda que, excecionalmente o linfossarcoma felino e o HCT canino, apresentem maior tendência em surgirem em animais jovens, enquanto as neoplasias das glândulas perianais nos canídeos, parecem ser mais prevalentes em animais adultos com mais de 12 anos de idade.

Relativamente à incidência e ao comportamento biológico das neoplasias espontâneas, a incidência do surgimento de neoplasias é, tendencialmente mais elevada na espécie canina (Martínez de Melro *et al.*, 2015), ainda que Vail & Withrow (2007) refiram que aproximadamente, 20% a 40% dos tumores primários cutâneos e subcutâneos se apresentem histologicamente com caráter maligno nos canídeos, contrariamente, a uma maior incidência na espécie felina (entre 50% e 65%). Na espécie canina, sensivelmente 70% a 80% das neoplasias são consideradas de caráter benigno, sendo diagnosticadas com maior frequência, em detrimento das neoplasias malignas (Blackwood, 2011). De entre os tipos de tumores cutâneos mais comuns na espécie canina destacam-se o MTC (14-21%), o sarcoma dos tecidos moles (STS) (8-15%) e o adenoma das glândulas perianais (5-18%). Por seu turno, na espécie felina, o SSC (15-49%), os tumores das células basais (11-26%) e o MTC (8-21%) estão descritos como os tipos tumorais mais prevalentes (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

No que concerne ao fator racial, sabe-se que são conhecidas algumas raças caninas que denotam maior predisposição para o desenvolvimento tumoral maligno, tais como *Cocker Spaniel*, *Boxer*, *Pastor Alemão*, *Doberman*, *Golden Retriever*, *Mastín* e *Dogo*. Para além disso, determinou-se que o surgimento de neoplasias malignas é mais comum em raças puras do que em raças cruzadas, sendo que há determinadas raças em que se tem descrito uma maior incidência para desenvolverem variantes tumorais específicas (e.g. sabe-se que os gatos siameses são considerados suscetíveis para desenvolverem MTC e linfoma) (Martínez de Melro *et al.*, 2015).

Parte 2. Exame citológico no diagnóstico de neoplasias: Aplicação em dermatologia oncológica

2.1. Introdução à dermatologia oncológica

A pele atua como um espelho ao refletir o estado de saúde do animal, permitindo ao clínico Veterinário aferir indiretamente, quanto ao correto funcionamento do seu organismo (Noli, 1999). Em virtude, da complexidade da sua estrutura anatómica, o sistema tegumentar encontra-se permanentemente suscetível ao desenvolvimento potencial de uma grande variedade de tumores, cuja etiologia não se encontra completamente elucidada até aos dias de hoje (Hounston

et al., 2002; Grandi & Rondelli, 2016). Todavia, sabe-se que a exposição a radiação ultravioleta UVB, bem como o contributo de determinadas hormonas sexuais (e.g. estrogénios e testosterona) e de alguns tipos de vírus (e.g. Papilomavírus tipo 2) estão na base do desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias nestas espécies animais (North & Banks, 2009; Warland & Dobson, 2011; Munday *et al.*, 2016).

No campo da Oncologia Veterinária, à semelhança do que se tem verificado em Oncologia cutânea humana, nos últimos anos tem-se apurado que a prevalência de doenças oncológicas está a aumentar exponencialmente, devido ao contributo de uma diversidade de fatores intrínsecos e extrínsecos, que está associada à longevidade das populações caninas e felinas (North & Banks, 2009; Siegel *et al.*, 2016). O maior risco de surgimento de cancro em pacientes geriátricos encontra-se intrinsecamente correlacionado com o enfraquecimento do sistema imunovigilante, o qual está associado com as alterações fisiológicas integrantes do processo de envelhecimento (Villalobos & Kaplan, 2007). Estima-se que um em cada dez gatos ou cães acabará por desenvolver um tumor no decorrer da sua vida (Moris & Dobson, 2001). Sabe-se que sensivelmente dois terços de todos os tumores cutâneos caninos se apresentam como massas solitárias, surgindo como lesões benignas com origem no epitélio ou estruturas anexas à pele, incluindo as glândulas sebáceas e apócrinas, bem como, os folículos pilosos (Vail & Withrow, 2007; Warland & Dobson, 2011). Nos felídeos, a pele é também um local comum de desenvolvimento tumoral, embora os tumores benignos tendam a ser menos frequentemente diagnosticados, do que os malignos nesta espécie animal (Warland & Dobson, 2011; Martínez de Melro *et al.*, 2015). Por esse motivo, face ao incremento do número de casos de afeções dermatológicas, nomeadamente de índole neoplásico, diagnosticadas diariamente na prática clínica veterinária, a Dermatologia oncológica tem-se tornado uma especialidade médica crescente, que merece cada vez mais relevo por parte da comunidade veterinária.

Esta monografia apresentará inicialmente uma abordagem geral às particulares anatómicas e histológicas da pele e anexos dos pequenos animais, evidenciando os aspetos relacionados com a diferenciação citológica de alguns tipos de neoplasias cutâneas, procurando enfatizar o contributo do exame citológico no diagnóstico de afeções dermatológicas de cariz neoplásico.

2.2. Revisão anatómica e histológica da pele e anexos cutâneos

O conhecimento dos aspetos morfológicos, referentes à anatomia e histologia das várias estruturas cutâneas nos pequenos animais, torna-se imperativo nas áreas da citopatologia e histopatologia dermatológicas, por um lado porque a pele nas diferentes espécies animais é histologicamente distinta e, por outro, para que se possa compreender melhor possíveis alterações observadas. A pele e os seus anexos constituem o sistema tegumentar que recobre a superfície corporal, sendo considerado o órgão mais extenso e nitidamente observável de todo o corpo (Noli, 1999).

Apesar de existirem diferenças quanto à morfologia da pele nos canídeos e felídeos, em virtude da existência de algumas particularidades histológicas apresentadas, a arquitetura básica da pele dos pequenos animais é constituída genericamente, por três camadas principais dispostas pela seguinte ordem de profundidade: a epiderme, a derme e a hipoderme (Housnton *et al.*, 2002) (**Figura 28**).

Cada uma das camadas é constituída por diferentes tipos de células e estruturas sensitivas que lhe conferem variadas funções específicas e desempenham um papel importante na defesa contra agentes externos. Embriologicamente, a epiderme tem origem a partir da ectoderme, enquanto a derme e a hipoderme possuem origem mesodérmica (Sinowatz, 2010).

A **epiderme** consiste na camada mais superficial da pele e é formada por um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, cuja espessura se apresenta variável atendendo a uma dada região anatómica, sendo menor do que a da derme (Dyce, 2010). A epiderme é constituída intimamente por várias camadas ou estratos: o estrato basal,

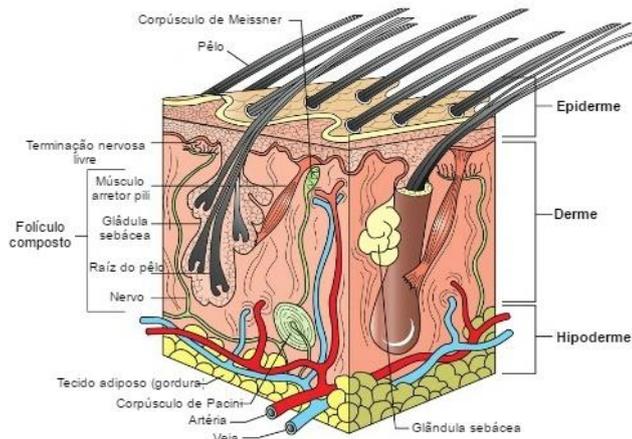


Figura 28 Composição anatómica da pele de um canídeo (Imagem adaptada de Tighe & Brown, 2015).

o estrato espinhoso; o estrato granuloso; o estrato lúcido e o estrato córneo (Cochran, 2011). Maioritariamente esta camada superficial da pele é formada por queratinócitos, células ricas em queratina, que sofrem uma contínua migração e descamação a partir da camada basal permitindo a substituição regular das células (Seeley *et al.*, 2011). Para além dos queratinócitos, outros tipos de células que constituem a epiderme são os melanócitos (produtores do pigmento melanina, responsável pela pigmentação da pele); as células de Langerhans (pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear, relacionadas com a apresentação de antígenos) e as células de Merkel (constituídas por mecanorreceptores tácteis de pressão) (Affolter & Moore, 1994, referidos por Souza *et al.*, 2009; Lucas, 2014). Por não conter vasos sanguíneos, a epiderme não possui irrigação sanguínea própria, sendo nutrida através de difusão pelos capilares sanguíneos da derme subjacente (Souza *et al.*, 2009; Seeley *et al.*, 2011).

A **derme** é a camada profunda da pele, subjacente à epiderme, encontrando-se separada desta pela membrana basal, sendo constituída por uma vasta rede de fibras de tecido conjuntivo denso, insolúvel e irregular, apresentando maioritariamente colagénio, bem como algumas fibras de elastina e de reticulina. Os principais tipos de células que habitualmente a compõem são os fibroblastos, algumas células adiposas, os macrófagos, os melanócitos (em quantidades variáveis), os dendrócitos dérmicos e uma variedade de células inflamatórias. Nesta camada, encontram-se, ainda, localizados vasos sanguíneos que servem de suporte nutritivo à epiderme,

vasos linfáticos, nervos cutâneos, músculo liso eretor do pêlo e apêndices epidérmicos, *i.e.*, glândulas anexas e folículos pilosos (Ackerman, 2008; Souza *et al.*, 2009; Dyce, 2010; Seeley *et al.*, 2011). É nesta camada da pele, que se localizam terminações nervosas receptores sensoriais tácteis e da dor, os denominados corpúsculos de Meissner (Cochran, 2011). A derme constitui o maior suporte físico da epiderme, bem como, dos anexos da pele, sendo responsável por grande parte da resistência estrutural do tegumento.

A **hipoderme**, também denominada por **subcutis**, localiza-se sob a pele e compõe o tecido subcutâneo, sendo constituída por tecido conjuntivo laxo (apresentando fibras de colagénio e elastina), assim como depósitos de tecido adiposo abundante, possuindo fundamentalmente um papel de amortecimento cutâneo. A hipoderme serve de suporte à derme e epiderme, funcionando como isolante térmico, desempenhando assim, uma função importante na regulação térmica. Os principais tipos celulares que a integram são as células adiposas, os fibroblastos e os macrófagos (Ackerman, 2008; Cochran, 2011; Seeley *et al.*, 2011).

O **tecido subcutâneo** é composto essencialmente por tecido conjuntivo laxo e tecido adiposo, ainda que possa apresentar na sua estrutura, regiões de tecido muscular estriado que constituem o panículo muscular (Marcos *et al.*, 2011).

A pele é ainda constituída por estruturas anexas, *i.e.*, pelos folículos pilosos e pêlos, pelas glândulas anexas associadas e glândulas especializadas, pelas unhas ou garras e pelas almofadinhas palmares e plantares.

Os **pêlos** representam estruturas filiformes compostas por células queratinizadas, que são produzidas pelos folículos pilosos (estruturas infundibulares localizadas na derme) apresentando uma fração livre (pedículo piloso) que emerge à superfície da epiderme e uma fração proximal (raíz pilosa) com localização na derme (Seeley *et al.*, 2011; Ackerman, 2008; Cochran, 2011).

Os pêlos desenvolvendo-se ciclicamente e sofrem alterações sazonais flutuantes no seu crescimento, as quais são variáveis consoante determinadas raças dos animais (Houston *et al.*, 2002; Lucas, 2014). Existem alguns animais que podem surgir desprovidos de pêlos devido à ocorrência de mutações ocasionais, como é o caso dos gatos da raça *Sphynx* (Dyce, 2010). Nos canídeos e nos felídeos existem folículos pilosos compostos, ou seja, constituídos por vários folículos pilosos primários e secundários (Cochran, 2011; Lucas, 2014). A sua quantidade e o seu tamanho é variável, estando distribuídos por quase toda a extensão cutânea corporal dos animais, à exceção do plano nasal e das almofadinhas palmares e plantares (Souza *et al.*, 2009).

As principais **glândulas anexas à pele** são as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas que segregam produtos de secreção diferenciados. As glândulas sebáceas encontram-se em todas as zonas da pele com pêlos tendo localização anatómica na derme e caracterizam-se por serem glândulas alveolares, simples e holócrinas. A sua componente secretora está disposta por uma camada de células cúbicas de forma cilíndrica, em torno das quais existem células mioepiteliais. Estas glândulas produzem e segregam diretamente através dos seus ductos, um sebo (substância viscosa de caráter oleoso) (Dyce, 2010; Seeley *et al.*, 2011). As glândulas sudoríparas, tanto nos cães como nos gatos, desempenham uma importante

função na integridade da pele, mas não são importantes na termorregulação (Affolter & Moore 1994). Existem dois tipos de glândulas sudoríparas, as **apócrinas** (epitriquiaias ou paratriquiaias) e as **écrinas** (merócrinas ou atriquiaias).

As glândulas sudoríparas são de pequeno tamanho, tubulares simples, apresentando uma forma enovelada, estando rodeadas por células mioepiteliais e formadas por uma camada de células cúbicas ou cilíndricas e situam-se logo abaixo das glândulas sebáceas, abrindo para o interior do folículo piloso, sendo responsáveis pela produção e libertação de uma substância isotónica líquida – o suor (Affolter & Moore, 1994; Seeley *et al.*, 2011).

Existem ainda associadas à pele **glândulas especializadas** originadas a partir das glândulas anexas, como as glândulas dos sacos anais e as glândulas perianais ou hepatóides diferindo particularmente no que concerne ao produto glandular secretado ou quanto à sua estrutura íntima, a nível histológico (Souza *et al.*, 2009).

2.3. Descrição das alterações macroscópicas da pele no estabelecimento de diagnósticos diferenciais

A pele, ao contrário de outros órgãos mais internos, é aquele que mais facilmente se consegue explorar. Por este motivo, recomenda-se efetuar a sua exploração minuciosa, incluindo as suas estruturas anexas, com recurso a técnicas de diagnóstico adequadas, logo na primeira consulta em que se procede à inspeção física do paciente (Hounston *et al.*, 2002).

Ao contrário do que ocorre com os clínicos Veterinários, os Citopatologistas e os Anatomopatologistas Veterinários não têm acesso ao tipo de lesões apresentadas pelos pacientes, as quais são observadas durante a realização do exame físico durante a consulta. Estes últimos apenas conseguem observar uma pequena amostra da lesão clínica que o animal apresentava (maioritariamente, através de biópsias cutâneas), a qual foi colhida para posterior análise laboratorial. Neste sentido, torna-se de suma importância que exista uma linguagem científica universal entre o clínico veterinário e o citopatólogo/anatomopatólogo (Alves & Gama, 2016; Saraiva & Payan-Carreira, 2016), no que concerne à realização da descrição das alterações macroscópicas observadas, para que este último tenha claro conhecimento do padrão de distribuição lesional, bem como do seu aspeto morfológico (**Figura 29**), para permitir efetuar uma posterior correlação entre o aspeto macroscópico e o aspeto microscópico das lesões observadas nas preparações citológicas e em cortes histológicos, a fim de poder estabelecer uma lista de diagnósticos diferenciais. Dado que, não raras vezes, o papel do Anatomopatólogo quanto à emissão de um diagnóstico definitivo se revela fundamental para “encerrar” um diagnóstico, a informação que é vinculada principalmente de forma manuscrita entre estes dois interlocutores deverá ser objetiva e o mais completa possível (Hargis & Ginn, 2012; Saraiva & Payan-Carreira, 2016).



Figura 29 Lesões típicas de lúpus eritematoso discóide num canídeo geriátrico (Propriedade intelectual de HVPT).

2.4. Classificação das neoplasias cutâneas e subcutâneas

Para permitir uma melhor elucidação quanto à nomenclatura referente à classificação das neoplasias cutâneas e subcutâneas, torna-se pertinente abordar primeiramente, o conceito de neoplasia, bem como referir as principais alterações no controlo da divisão e diferenciação celular, que podem ser precursoras de processos neoplásicos na pele.

Uma neoplasia, também denominado por “*neoplasma*” ou “*tumor*” consiste num “*novo crescimento*” que tem na sua composição células originadas a partir de tecidos normais, os quais sofreram alterações genéticas, que se foram acumulando de forma gradual e que as permitiram tornarem-se não responsivas a mecanismos de controlo de crescimento normais, conduzindo, desta forma à sua expansão para além dos seus limites anatómicos normais (Kusewitt, 2017). Sendo assim, o surgimento de uma massa cutânea de cariz neoplásico está intrinsecamente associada a uma proliferação celular inapropriada (Zuccari *et al.*, 2016). Pires *et al.* (2004) conceptualizam o termo “**neoplasia**” como sendo:“(…) *uma massa anormal de tecido, de crescimento excessivo, descoordenado e autónomo* “. Por outro lado, o termo “*cancro*”, de um modo geral, abrange todos os tipos de neoplasias que denotam idoneidade para invasão dos tecidos-alvo e metastização à distância, o qual sempre evidencia um crescimento maligno (Zuccari *et al.*, 2016; Newkirk *et al.*, 2017).

Uma vez que o desenvolvimento de uma neoplasia é um processo de transformação celular progressivo, é importante referir que alguns tipos de lesões pré-neoplásicas associadas a alterações no crescimento celular, podem estar intimamente relacionadas com o desenvolvimento de células cancerígenas. Um dos tipos de lesões proliferativas que deverá ser um diagnóstico diferencial de uma neoplasia, é a hiperplasia (*i.e.* uma alteração que consiste no aumento das dimensões do tecido ou órgão em virtude do aumento do número das suas células) (Pires *et al.*, 2004; Zuccari *et al.*, 2016).

2.4.1. Origem celular e tipo histológico das lesões neoplásicas da pele

Segundo Nimwegen & Kirpensteijn (2017), a classificação histológica das neoplasias cutâneas e subcutâneas tradicionalmente, tem por base a origem da população celular predominante e o tipo histológico envolventes. Deste modo, atendendo à sua caracterização histológica e à sua origem embrionária, os tumores da pele e anexos cutâneos podem ser classificados em: (i) *tumores epiteliais*; (ii) *tumores mesenquimatosos*; (iii) *tumores das células redondas* e (iv) *tumores com origem melanocítica* (Goldschmidt *et al.*, 1998; Hendrick *et al.*, 1998).

Os **tumores epiteliais** podem ser originados a partir de qualquer um dos folhetos de células embrionárias (*i.e.* ectoderme, mesoderme ou endoderme), embora os que se originam a partir da epiderme e de estruturas anexas à pele, sejam tumores ectodérmicos (Raskin, 2010; Kusewitt, 2017). Os tumores epiteliais podem desenvolver-se tanto no epitélio de revestimento

(pavimentoso estratificado ou cúbico) originando **tumores epiteliais não glandulares**, como também no epitélio glandular, levando à formação de **tumores epiteliais glandulares** (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017). Os tumores benignos do epitélio de revestimento não glandular são denominados com base no nome da célula, tecido ou órgão de origem, adicionando o sufixo “-oma” (e.g. Papiloma de células escamosas). Enquanto, todos os tumores de origem epitelial, de caráter maligno são designados por “*carcinomas*” (Pires *et al.*, 2004). A uma neoplasia epitelial de caráter maligno que ainda não tenha penetrado a membrana basal para invadir o estroma (consiste numa estrutura de suporte formada por tecido conjuntivo, essencialmente por fibroblastos e células inflamatórias, sendo altamente vascularizado) (Pires *et al.*, 2004) e que permanece no interior da estrutura epitelial, se denomina por “*Carcinoma in situ*” (forma pré-invasiva de carcinoma). Por outro lado, a nomenclatura é distinta quanto aos tumores do epitélio glandular, aos quais na sua denominação, o prefixo “*adeno-*” precede o sufixo “-oma” (benigno – adenoma) ou “-*carcinoma*” (maligno – adenocarcinoma) (Kusewitt, 2017; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Os **tumores mesenquimatosos** são mesodérmicos, ou seja, derivam embriologicamente a partir da mesoderme e podem desenvolver-se em variados tecidos mesenquimatosos, tais como no tecido muscular, no endotélio (vasos sanguíneos), nos nervos, no tecido conjuntivo, no tecido adiposo, bem como em tecidos hematopoiéticos e linfóides. À semelhança dos tumores epiteliais, os tumores mesenquimatosos benignos são denominados adicionando o sufixo “-oma” ao nome da célula mesenquimal ou tecido originário. Por outro lado, os tumores mesenquimatosos malignos são denominados por “*sarcomas*” (e.g. Fibrossarcoma – neoplasia maligna do tecido conjuntivo) (Pires *et al.*, 2004; Kusewitt, 2017; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Os distintos tipos de neoplasias, *i.e.*, os tumores das células redondas e os tumores com origem melanocítica serão abordados em detalhe seguidamente.

Na **figura 30** apresentam-se ilustrados os principais tipos celulares precursores de neoplasias na pele e tecido subcutâneo.

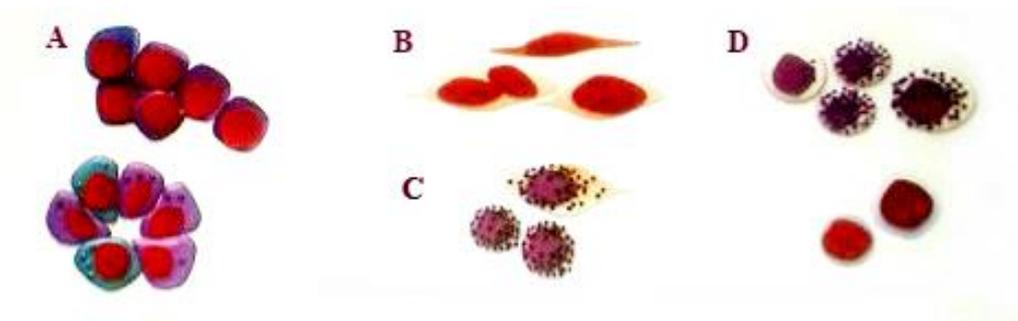


Figura 30 | Diferentes tipos celulares constituintes da pele e anexos cutâneos: (A) células epiteliais; (B) células mesenquimatosas; (C) células melânicas e (D) células redondas (Imagem adaptada de Peleteiro *et al.*, 2011).

2.4.2. Características citológicas gerais dos distintos tipos tumorais

Uma vez que o domínio das neoplasias cutâneas e subcutâneas em pequenos animais é nitidamente vasto, não sendo possível explicar em detalhe todos os aspetos citológicos peculiares de cada tipo tumoral, será efetuada uma abordagem numa perspetiva generalista, de alguns dos neoplasmas que, segundo a literatura no âmbito da citologia clínica veterinária, têm revelado maior incidência em canídeos e felídeos.

2.4.2.1. Neoplasias com origem epitelial

As células epiteliais são com frequência sede de múltiplos processos neoplásicos, dos quais se destacam alguns dos tipos tumorais mais comuns: o *carcinoma das células escamosas* (SSC), os *tumores das células basais*, os *adenomas sebáceos* e o *tricoblastoma* (Barger, 2012). Uma particularidade dos neoplasmas epiteliais é apresentarem citologicamente, uma elevada esfoliação celular (Aldarra, 2014; Johnson & Myers, 2016). As células originárias deste tipo de tumores podem ser escamosas ou, também, células com origem glandular (Teske, 2009a) (**Figura 31**). A sua aparência citológica é caracterizada por arranjos celulares coesos, constituindo agregados (*clusters*) formados por conjuntos de células de epitélio pavimentoso, formando uma única camada (Teske, 2009a), dispostas em paliçada com elevada adesão intercelular entre si (Aldarra, 2014).

Nas neoplasias com origem na epiderme, as células epiteliais de estratos intermédios são regra geral, células de pequeno tamanho que exibem uma morfologia arredondada, núcleo pequeno (redondo ou oval), geralmente picnótico (*i.e.* núcleo retraído denotando diminuição no seu tamanho e cromatina condensada), ainda que existam exceções como o SSC em que as células podem exibir núcleos de formas variadas (Pires *et al.*, 2004; Barger, 2012; Del Ojo, 2013a) e apresentarem um rácio núcleo: citoplasma (N:C) menor. Por outro lado, as células superficiais (queratinizadas) são mais volumosas e de maior tamanho, denotando um núcleo pequeno, picnótico e com bordos citoplasmáticos poliédricos ou angulosos, evidenciando um baixo rácio N:C. A variação na relação N:C está dependente do tipo de célula e do tecido de origem (*e.g.* células neoplásicas epiteliais de tecidos glandulares podem apresentar vacúolos citoplasmáticos ou discretos grânulos). Por seu turno, células epiteliais de epitélios glandulares normais surgem dispostas em ácinos, exibindo um citoplasma multivacuolizado e volume aumentado (Barger, 2012; Aldarra, 2014).

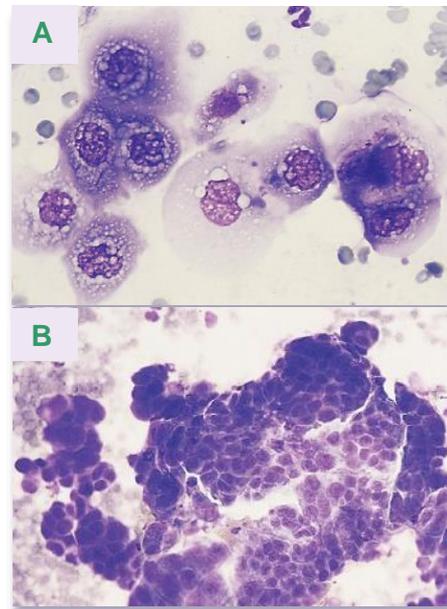


Figura 31 | Alguns tipos de neoplasias epiteliais: (A) SSC e (B) Tumor de células basais (Imagens adaptadas de Raskin, 2010).

O Carcinoma das células escamosas (SCC) ou também denominado por carcinoma espinocelular ou epidermóide é um tipo de tumor cutâneo epitelial de revestimento, de caráter maligno, muito invasivo localmente, sendo comum nos canídeos e felídeos e é, geralmente, induzido o seu desenvolvimento devido à exposição a radiação solar prolongada. Conhecem-se alguns fatores de risco associados ao seu aparecimento, tais como a existência de infeção cutânea por papilomavírus; o tipo de pigmentação da pele, *i.e.*, em animais que possuam pelagem branca existe maior predisposição, particularmente em felídeos; a presença de inflamação crónica e de lesões térmicas (queimaduras). Em felídeos, a sua localização anatómica mais comum é ao nível da face (plano nasal, pavilhão auricular e pálpebras) (Johnson & Myers, 2016; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017). Este tipo de neoplasma surge com maior incidência em animais com idades mais avançadas e nos canídeos, pode desenvolver-se em vários locais, tais como nos dígitos (raíz ungueal), nos membros ou ao longo do corpo. Quanto ao aspeto macroscópico, as lesões podem apresentar caráter proliferativo (placa ou lesão em “couve-flor”) ou ulcerativo (inicialmente uma crosta que depois evolui para uma úlcera cutânea), ou, por outro lado, ocorrerem simultaneamente (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

O aspeto microscópico do SSC ao exame citológico, revela geralmente a presença de células epiteliais queratinizadas que exibem elevado grau de pleomorfismo, anisocitose, anisocariose e aumento da relação N:C, podendo evidenciar fragmentação nuclear, binucleação ou multinucleação, bem como citoplasma de coloração azul-celeste. Pode ser observada uma certa assincronia na relação N:C no que concerne à sua maturação, podendo ser observável a presença de células pequenas parabasais atípicas ou células epiteliais basais (Marcos *et al.*, 2011; Johnson & Myers, 2016).

2.4.2.2. Neoplasias das estruturas anexas à pele

Os processos neoplásicos podem também surgir quer associados aos folículos pilosos, quer às glândulas anexas à pele, sendo apresentado de seguida tumores com diferenciação anexal.

2.4.2.2.1. Neoplasias com origem no folículo piloso

De entre os tipos de neoplasias mais comuns originadas a partir das bainhas dos folículos pilosos, destacam-se as seguintes: o *tricoblastoma* e o *tricoepitelioma*. Citologicamente, podem ser observadas células que se assemelham a células basais e podem estar presentes detritos queratinosos (Raskin, 2010). Os tricoblastomas são tumores comumente diagnosticados na pele de cães e menos frequentemente, em gatos.

Estes tumores fornecem normalmente amostras com elevada riqueza celular, exibindo células basalóides, maiores que as apresentadas nos tumores das células basais, constituindo placas coesas, com um núcleo proeminente, redondo e grande, bem como um citoplasma basofílico, podendo ser observadas mitoses em maior número (Raskin, 2010; Marcos *et al.*, 2011) (Figura 32).

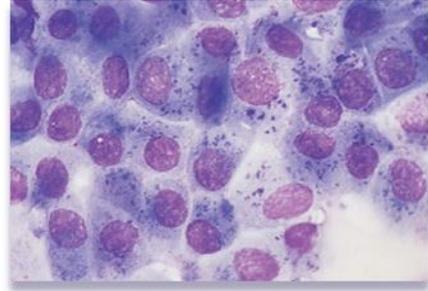


Figura 32 | Imagem citológica de células neoplásicas de um Tricoblastoma (Imagem adaptada de Raskin, 2010).

2.4.2.2.2. Neoplasias com origem nas glândulas anexas à pele

Os tumores que se desenvolvem a partir de células das glândulas anexas cutâneas são neoplasias epiteliais glandulares, podendo ser categorizados em dois tipos: (i) *tumores com origem nas glândulas sudoríparas* e (ii) *tumores com origem nas glândulas sebáceas* (Marcos *et al.*, 2011).

Relativamente aos tumores das glândulas sudoríparas, estes podem ser originados a partir das glândulas apócrinas e das glândulas écrinas (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

→ Neoplasias com origem nas glândulas apócrinas

Os tumores das glândulas apócrinas surgem raramente nos canídeos constituindo 0,6% a 2,2% de todos os tumores cutâneos nesta espécie animal, para além de serem pouco comuns nos felídeos (2,5% a 3,6% de todos os tumores) (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Os distintos tipos de células das glândulas apócrinas (*e.g.* ductais e secretoras) podem originar variados tumores de carácter benigno, tais como o *cistoadenoma das glândulas apócrinas (CGA)*, o *adenoma ductal apócrino (ADA)* e o *adenoma secretor apócrino*, sendo encontrados com maior incidência em gatos da raça Persa. Em cães, são mais comuns em raças como *Chow-Chow* (Marcos *et al.*, 2011; Ruano, 2015). De acordo com Johnson & Myers (2016) estes subtipos de carácter benigno, incluindo os quistos apócrinos, são dificilmente distinguíveis através do exame citológico. O surgimento de tumores malignos com sede nas glândulas apócrinas é pouco comum.

Os adenomas ductais exibem células de aspeto basalóide e o material contido neles pode encontrar-se mineralizado. Por outro lado, os adenomas secretores possuem células cuboidais ou colunares com núcleo basalóide arredondado que apresentam, maioritariamente, citoplasma vacuolizado (Ruano, 2015). A proliferação maligna das células apócrinas, ainda que ocorra com menor incidência nos pequenos animais, pode conduzir ao surgimento de um *adenocarcinoma apócrino* que em citologia pode evidenciar a presença de grandes células com arranjo predominante ductal, semelhante ao exibido em tumores mamários, ou por outro lado, células basalóides, muito similares às observadas em carcinomas das células basais (Marcos *et al.*, 2011; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

→ **Neoplasias com origem nas glândulas sebáceas**

Os tumores das glândulas sebáceas apresentam uma maior incidência na espécie canina, comparativamente aos tumores das glândulas apócrinas constituindo entre 6,8% a 7,9% de todos os tumores cutâneos que se desenvolvem nesta espécie animal. Em felídeos, o seu surgimento é pouco comum (incidência entre 2,3% a 4,4%), ainda que os gatos persas apresentem maior predisposição (Johnson & Myers, 2016; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Processos neoplásicos predominantes nas glândulas sebáceas são: o *adenoma sebáceo (ADS)*, o *epitelioma sebáceo (EP)* e o *carcinoma sebáceo* (Marcos *et al.*, 2011).

O ADS surge como um dos tipos mais comuns de entre os mencionados, caracterizando-se por ser uma neoplasia benigna das glândulas sebáceas, bem diferenciada (Marcos *et al.*, 2011), que tende a apresentar células com um núcleo central, muitas vezes obscurecido pela presença de múltiplos pequenos vacúolos que o cercam, bem

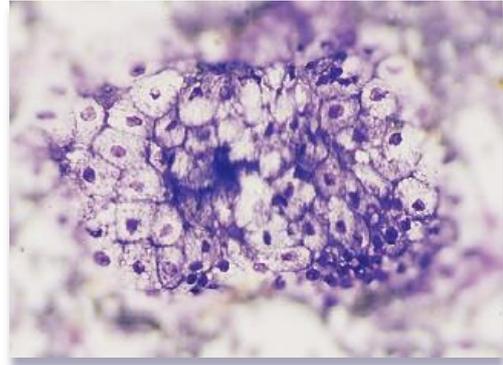


Figura 33| Imagem citológica de um adenoma sebáceo (Imagem adaptada de Raskin, 2010).

como um citoplasma pálido, abundante espumoso preenchido por discretos vacúolos. Uma particularidade citológica deste tipo celular neoplásico é que, as suas células se apresentam sob a forma de *clusters*, formados por células glandulares homogéneas (**Figura 33**), dispostas em forma de folha ou com arranjo acinar (Fernández *et al.*, 2003; Barger, 2012). O diagnóstico diferencial com hiperplasia é regra geral, impossível de efetuar por citologia (Marcos *et al.*, 2011).

2.4.2.3. Neoplasias com origem em glândulas especializadas

Nesta categoria de neoplasias com origem nas glândulas perianais e nos sacos anais realçam-se os *adenomas* e *adenocarcinomas das glândulas perianais*, bem como os *adenocarcinomas dos sacos anais (ACSA)* (Raskin, 2010; Marcos *et al.*, 2011). De acordo com estudos efetuados e, segundo a literatura consultada, no que concerne à incidência deste tipo de neoplasias e à sua prevalência em relação ao género, a presença de adenomas das glândulas perianais é mais comum em machos inteiros (**Figura 34**).

Fernández *et al.* (2003) apontam como menos prevalente a ocorrência de adenocarcinomas nestas glândulas em machos orquiectomizados e em fêmeas inteiras. As

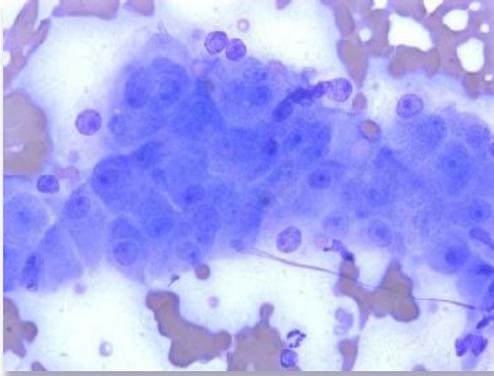


Figura 34| Citologia aspirativa de um adenoma de glândula perianal em canídeo, Wright-Giemsa, x500 (Imagem adaptada de Sharkey *et al.*, 2014b).

células que os originam têm um aspeto semelhante aos hepatócitos e, por isso, também se denominam de adenomas ou adenocarcinomas das glândulas hepatóides. No caso dos ACSA, citologicamente, têm tendência a exibir *clusters* celulares de índole epitelial, com células exibindo núcleos de elevado volume e cromatina homogénea, sem serem visíveis nucléolos, podendo apresentar anisocitose pouco marcada e grau de pleomorfismo variável. Estes neoplasmas tendem a apresentar-se com uma organização celular do tipo acinar (Marcos *et al.*, 2011).

2.4.2.4. Neoplasias com origem mesenquimatosa

Este tipo de tumores surge maioritariamente, do tecido conjuntivo (incluindo do tecido conjuntivo muscular), bem como de cartilagens, do tecido ósseo, do tecido adiposo, do tecido fibroso e do endotélio vascular, podendo desenvolver-se na derme e tecido subcutâneo (Marcos *et al.*, 2011; Barger, 2012; Johnson & Myers, 2016), caracterizando-se citologicamente, por serem neoplasmas constituídos por células gigantes com aspeto fusiforme ou estrelado que podem apresentar mais do que um núcleo, por vezes variável quanto ao tamanho (Teske, 2009; Meinkoth *et al.*, 2014). O facto da maioria das células deste tipo denotar esta característica morfológica em comum, torna mais difícil efetuar um diagnóstico diferencial, pelo que o recurso ao exame citológico isoladamente, não permite na maior parte dos casos emitir um diagnóstico definitivo. Não obstante, o recurso ao exame citológico pode ser bastante útil para efetuar um diagnóstico célere de uma neoplasia mesenquimal, na presença de determinadas características citológicas observáveis (Marcos *et al.*, 2011; Johnson & Myers, 2016).

Os aspirados por PAAF de massas constituídas por células mesenquimais apresentam geralmente, pouca riqueza celular, uma vez que as células não esfoliam bem, como ocorre no caso dos tumores epiteliais. Porém, sabe-se que alguns tipos de tumores com origem mesenquimatosa podem apresentar moderada a elevada celularidade, particularmente quando são pouco diferenciados. Existe uma característica morfológica peculiar dos tumores mesenquimatosos, ou seja, as células mesenquimais que os originam não possuem tendência a formar *clusters* (agregados entre si), apresentando-se individualmente (Johnson & Myers, 2016).

São exemplos de neoplasias com origem mesenquimatosa o *hemangiopericitoma canino*, o *fibrossarcoma* e o *hemangiossarcoma* (Teske, 2009a) (**Figura 35**).

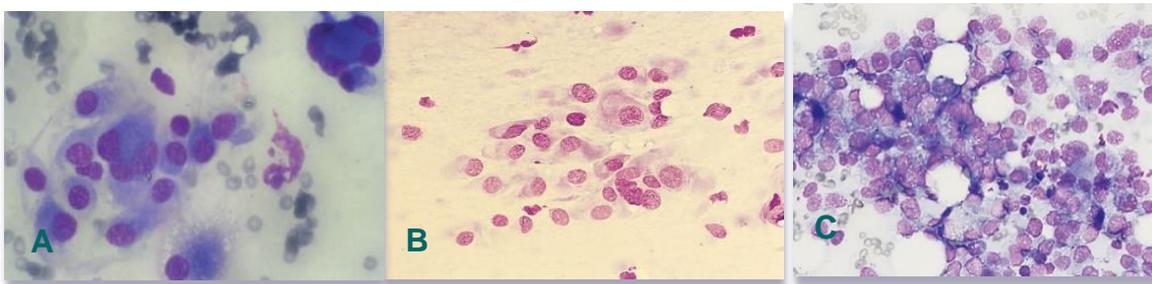


Figura 35 | Alguns tipos de neoplasias mesenquimatosas: (A) *Hemangiopericitoma canino*, (B) *Fibrossarcoma felino* e (C) *Hemangiossarcoma cutâneo* (Imagens adaptadas de Raskin, 2010).

O Fibrossarcoma é um tipo de tumor mesenquimatoso de elevada malignidade que integra o grupo dos STS, que tem origem no tecido conjuntivo (*i.e.* nos fibroblastos), sendo mais frequentemente diagnosticado no tecido subcutâneo. Este tipo de neoplasma surge com maior frequência em felídeos do que em canídeos e a sua localização anatómica preferencial é ao nível da região inter-escapular (local de administração de vacinas e de outros fármacos). Contudo, o fibrossarcoma pode desenvolver-se em qualquer local do corpo do animal, como na região do tronco e membros. Conhecem-se como fatores de risco, a infeção pelo vírus do sarcoma felino e a predisposição genética que determinados animais possuem, para o desenvolvimento deste tipo de tumor, a par da administração de vacinas como a vacina contra o FeLV. Na espécie felina, os fibrossarcomas pós-vacinais são tumores bastante agressivos, geralmente muito invasivos localmente, de crescimento rápido, possuindo elevada probabilidade de metastização à distância e de recidiva. Citologicamente, os fibrossarcomas caracterizam-se por evidenciarem uma população variável de células mesenquimatosas de aspeto fusiforme, que podem surgir de forma individual ou em *clusters*, que denotam elevado grau de anisocitose e anisocariose, estando rodeadas de matriz extracelular rica em colagénio. Os núcleos dos fibroblastos podem ter uma forma alongada e evidenciam marcado pleomorfismo (Marcos *et al.*, 2011; Hohenhaus *et al.*, 2016; Johnson & Myers, 2016).

2.4.2.5. Neoplasias com origem nas células redondas

Nos pequenos animais, podem ser considerados cinco tipos mais comuns de neoplasias cuja origem reside nas células redondas (Barger, 2012), tal como ilustra a **figura 36** e **figura 37** apresentadas. A sua subclassificação é baseada nas características citológicas de cada tipo tumoral (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Este tipo de neoplasmas encontra-se, usualmente, relacionado com células hematopoiéticas (Raskin, 2010) e denota uma elevada esfoliação nas preparações citológicas, conduzindo a amostras citológicas com elevada celularidade (Barger, 2012).

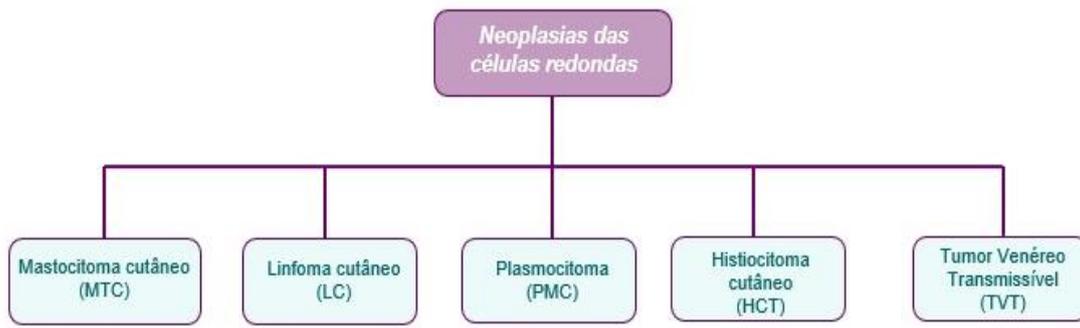


Figura 36 | Representação esquemática dos cinco tipos de neoplasias com origem em células redondas (Imagem de autora).

As populações celulares deste tipo apresentam, essencialmente, duas características em comum exibem uma morfologia discretamente arredondada, de pequeno tamanho, com bordos citoplasmáticos bem definidos e com elevado N:C, não se apresentando interligadas entre si através de uniões intercelulares, nem a uma matriz extracelular. Regra geral, não se apresentam em *clusters*, dispendo-se de forma individual, respeitando as margens citoplasmáticas. (Raskin, 2010; Barger, 2012; Algarra, 2014).

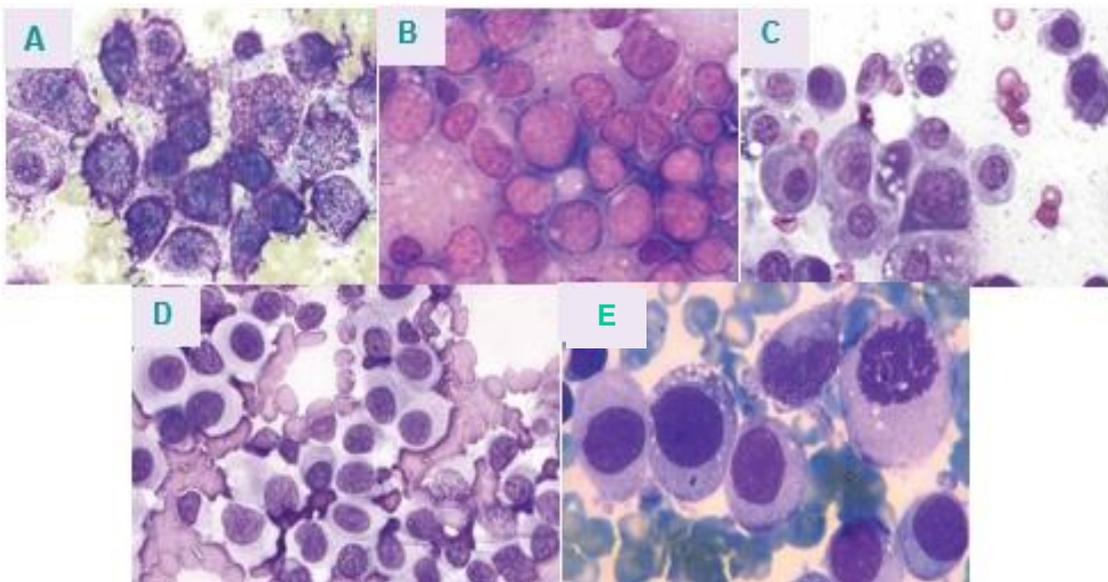


Figura 37 Imagens citológicas dos cinco tipos de neoplasias das células redondas: (A) Mastocitoma de grau I; (B) Linfoma cutâneo maligno; (C) Plasmocitoma; (D) Histiocitoma e (E) Tumor venéreo transmissível (Imagens adaptadas de Teske, 2009 & Algarra, 2014).

Cada um destes tipos celulares possui características citológicas peculiares que os define permitindo o seu discernimento (Algarra, 2014). As principais características citológicas particulares destes cinco tipos tumorais encontram-se descritas na **tabela 11**.

Tabela 11| Características citológicas das neoplasias de células redondas
(adaptado de Barger, 2012)

MTC	<p>*Citoplasma: basofílico em quantidade moderada contendo variados números de grânulos metacromáticos.</p> <p>*Núcleo: redondo e localizado centralmente. Usualmente, o padrão de cromatina e os nucléolos não podem ser totalmente avaliados devido à intensa granulação.</p> <p>*Eosinófilos geralmente, podem ser observados em cães e menos em gatos.</p>
LC	<p>*Células de aspeto redondo que consistem em linfócitos de tamanho grande ou intermédio, provavelmente possuindo núcleos proeminentes.</p> <p>*Citoplasma: basofílico de bordo escasso. Ocasionalmente, denota baixo número de grânulos eosinofílicos e núcleo redondo e largo.</p>
PMC	<p>*Citoplasma: basofílico em quantidade moderada.</p> <p>*Núcleo: localizado excêntricamente; comumente são observadas células binucleadas ou multinucleadas.</p> <p>*Geralmente, são observados um halo perinuclear ou complexo de Golgi proeminente</p>
HCT	<p>*Citoplasma: bordo do citoplasma moderadamente pálido basofílico. A principal característica distintiva é a presença de um halo limpo do citoplasma na periferia da célula.</p> <p>*Núcleo: geralmente localizado centralmente.</p> <p>À medida que o tumor começa a regredir, números crescentes de pequenos linfócitos são observados.</p>
TVT	<p>*Núcleo: o padrão de cromatina grosseiro com ocasional binucleação.</p> <p>*Citoplasma: moderada quantidade de citoplasma pálido basofílico; geralmente, contém vários vacúolos discretos citoplasmáticos.</p>

2.4.2.6. Neoplasias com origem melanocítica

Segundo Warland & Dobson (2011), as neoplasias melanocíticas assumem um surgimento pouco comum, denotando maior incidência em cães geriátricos, com pele mais pigmentada como os *Scottish Terrier*. Dois tipos tumorais com origem nos melanócitos apresentam-se com maior incidência na espécie canina: o *melanocitoma* (neoplasia de caráter benigno) e o *melanoma maligno* (neoplasia com comportamento maligno). Raramente são encontrados estes tipos de neoplasias cutâneas em gatos. Citologicamente, os melanomas podem exibir características marcadas de malignidade, tais como anisocitose, pleomorfismo nítido e anisocariose acentuadas e tendem a exibir no citoplasma uma concentração variável de grânulos de melanina (pretos a acastanhados) (Marcos *et al.*, 2011; Del Ojo., 2013a). Estas neoplasias podem ser agrupados na classe de tumores das células redondas, em virtude da aparência celular arredondada que este tipo de tumores apresenta (Teske, 2009; Del Ojo, 2013a). Geralmente, o discernimento de células melanocíticas pigmentadas patológicas e as células epiteliais pigmentadas normais é simples de se efetuar por citologia (Teske, 2009). Em gatos, quando observável, os melanomas cutâneos podem ser melanóticos ou amelanóticos conhecendo-se vários tipos de melanomas atendendo à morfologia das suas células (*e.g.* epitelióides, com células em forma de balão, fusiformes, mistos, *etc.*) (Raskin, 2010) (**Figura 38**). Sempre que se verifique um tumor muito indiferenciado, que apresente citologicamente um grande pleomorfismo celular e características de várias populações celulares, devemos considerar como possível diagnóstico diferencial os melanomas amelanóticos (Del Ojo, 2013a).

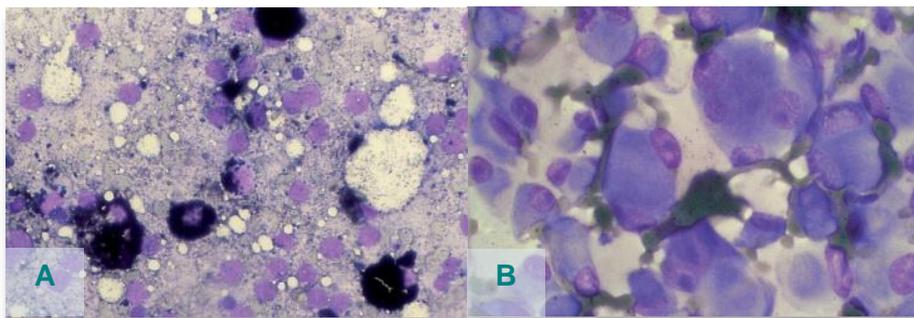


Figura 38| *Imagens citológicas de aspirados de dois tipos de melanomas: (A) aspirado de um melanoma num canídeo. Observam-se células grandes (melanócitos) contendo grânulos pretos de melanina e várias células anucleadas; (B) aspirado de um melanoma amelanótico de células emanel de sinete num felídeo. Notar a presença de muitas células amelanóticas (sem grânulos de melanina), algumas delas multinucleadas (Imagens adaptadas de Teske, 2009).*

2.4.3. Lesões cutâneas que mimetizam nódulos cutâneos tumorais

2.4.3. 1. Lesões não neoplásicas cutâneas com caráter nodular

Os nódulos cutâneos podem surgir quer a partir de estruturas do tecido subcutâneo, quer de outros tecidos localizados sob a pele (Teske, 2009). Sabe-se que as lesões não-inflamatórias e não-tumorais representam, sensivelmente, 10% das lesões cutâneas removidas em cães e gatos (Raskin, 2010). De entre os tipos de deformações de caráter nodular que não consistem em processos neoplásicos nem inflamatórios, mas que podem macroscopicamente assemelhar-se a algumas lesões de caráter tumoral, podem apresentar-se os seguintes: (i) *quistos cutâneos: quistos foliculares, quistos epidérmicos, quistos dermóides e quistos de origem glandular*; (ii) *hiperplasia das glândulas anexas*, bem como (iii) *acumulação de fluídos corporais em cavidades desprovidas de parede própria (e.g. sangue)* (Marcos et al., 2011). O surgimento de quistos cutâneos é relativamente comum e são histologicamente benignos, sendo os quistos foliculares (i.e. originários a partir dos folículos pilosos), dos tipos de quistos cutâneos mais frequentes em cães e gatos (Boes, 2013).

2.4.4. Lesões cutâneas de caráter inflamatório

As lesões cutâneas de caráter inflamatório são, geralmente, diagnosticadas citologicamente atendendo ao tipo celular envolvido que se observa com maior predominância, ao número de células presentes e à natureza das populações celulares envolvidas numa resposta inflamatória (Raskin, 2010; Peleteiro, 2011). No caso de serem observadas primariamente células inflamatórias numa preparação citológica, o processo em curso pode consistir numa inflamação aguda ou subaguda ou, por outro lado, numa inflamação de caráter mais crónico, ainda que se possa tratar, também, de uma inflamação secundária a um processo neoplásico subjacente. Deste modo, revela-se importante investigar a presença de outros tipos celulares, mesmo tendo observado células inflamatórias na amostra, numa primeira análise (Teske, 2008). De entre os tipos celulares mais detetados nestes processos destacam-se, os

neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares), cujo reconhecimento permite comumente diagnosticar um processo inflamatório de caráter purulento ou supurado, bem como, uma inflamação crónica purulenta (e.g. inflamação piogranulomatosa associada a presença de corpo estranho). Em amostras de lesões granulomatosas é frequente observar-se a presença de elevada quantidade de macrófagos, os quais se apresentam aumentados e exibem um aspeto espumoso devido à elevada vacuolização do seu citoplasma (denominando-se de macrófagos espumosos) (Peleteiro, 2011).

Genericamente, os processos inflamatórios podem ser distinguidos tendo por base a sua duração (agudo ou crónico), tipo (purulento, piogranulomatoso, granulomatoso e eosinofílico) e quanto à sua etiologia. No que concerne à etiologia, as inflamações cutâneas podem ser categorizadas em não infecciosas (e.g. lesões do complexo eosinofílico ou granuloma por lambadura acral) e infecciosas (com origem bacteriana, parasitária, fúngica, alérgica ou devido a reação por corpo estranho) (Teske, 2008; Peleteiro, 2011). A inflamação cutânea pode ainda ser classificada como mista ou linfoplasmocitária (Marcos *et al.*, 2011). De entre alguns tipos de processos inflamatórios particulares, que podem ser diagnosticados por avaliação citológica, realçam-se a pododermatite plasmocitária, paniculite ou celulite nodular, inflamações eosinofílicas e lesões por corpos estranhos (Teske, 2008; Marcos *et al.*, 2011).

2.5. O exame citológico como meio auxiliar de diagnóstico em neoplasias cutâneas

A utilidade do exame citológico (também vulgarmente referido por **citologia**) no diagnóstico oncológico teve o seu início na área da Patologia em Medicina Humana, reportando-se ao final do século XIX, tendo envolvido a contribuição de múltiplas personalidades destacando-se os patologistas, James Paget (1814-1899) e George Papanicolaou (1883-1962), cujos estudos na identificação e descrição de células cancerígenas, foram preponderantes para a perpetuação da aplicabilidade diagnóstica desta técnica em Citopatologia (Frable, 1995; Naylor, 1999). Não obstante, este método de diagnóstico somente foi introduzido em Medicina Veterinária há relativamente poucas décadas (Teske, 2008), passando a constituir uma valiosa ferramenta informativa do *status celular* num quadro lesional. A aplicação da citologia diagnóstica ou citopatologia em oncologia está preconizada para permitir a diferenciação entre a natureza reativa ou neoplásica de uma lesão, a classificação de neoplasias em benignas e malignas, bem como proporcionar a identificação da origem celular das neoplasias. Para além do referido, facultam informação adicional importante para determinar um tratamento a instituir ou descartar uma possível abordagem cirúrgica (Mayordomo & De las Mulas, 2011). O objetivo primordial do diagnóstico citológico, numa primeira instância é fornecer linhas orientadoras ao clínico, através da exclusão de hipóteses e listagem de diagnósticos diferenciais possíveis, mesmo quando não se reúnem informações aprofundadas do tipo de processo lesional em curso. Tal permitirá a definição precoce da etiologia da lesão, *i.e.*, se se trata de uma neoplasia ou de um processo inflamatório. Mesmo que em muitos casos não se alcance um diagnóstico definitivo, a informação

que a citologia aporta é de máxima utilidade, possuindo valor diagnóstico (Peleteiro, 2011; Garrett *et al.*, 2017).

2.5.1. Diretrizes gerais no diagnóstico citopatológico

Para entendermos os princípios gerais por que o diagnóstico citopatológico se deve reger, devemos nos remeter ao conceito fundamental de **Citopatologia**, que é o ramo de estudo que se debruça sobre a avaliação microscópica das características morfológicas das células de um tecido, a fim de determinar a presença de aspetos considerados patológicos. A citologia diagnóstica engloba o exame de células naturalmente esfoliadas ou que foram artificialmente removidas de uma cavidade corporal ou de uma massa de tecido (Ayele *et al.*, 2017).

Existem alguns aspetos relevantes a considerar antes de se proceder à observação microscópica minuciosa de uma preparação citológica, a qual deve obedecer ao seguimento de alguns princípios genéricos, a fim de apreciarmos a riqueza celular de um espécime em estudo. Um dos fatores determinantes que interferem no diagnóstico citológico emitido é o fornecimento de um historial clínico completo do paciente, cujos dados deverão encontrar-se integrados na ficha de requisição de análise citológica (De Lara & Rodríguez, 2011).

A par da experiência do Patologista Veterinário, a qualidade da amostra (particularmente, uma boa representatividade do espécime e a correta preservação da morfologia celular) é um fator decisivo no valor diagnóstico da análise citológica e tem um elevado contributo para a obtenção de uma interpretação citológica rigorosa (Teske, 2008; Meinkoth *et al.*, 2014). Ainda que, o diagnóstico citológico seja fundamentado quase integralmente na avaliação do material recebido, o conhecimento pleno da história e dados que o clínico Veterinário fornece são comumente, utilizados para aperfeiçoar a probabilidade de um diagnóstico final ser estabelecido com êxito, pelo que deverá existir uma correlação entre os achados citológicos e a informação clínica veiculada, a fim de evitar erros diagnósticos (Radin & Wellman; Stone & Reppas, 2010). Os mesmos autores sublinham que a colheita adequada da amostra e posterior preparação constituem dois parâmetros de relevância apreciável, no que concerne à interpretação citológica posterior, já que beneficiam o patologista relativamente à avaliação geral do padrão celular observado. Para que se possa usufruir de um esfregaço de ótima qualidade, não devemos descurar a importância da utilização de um bom microscópio baseado nas potencialidades do seu sistema ótico, já que o poder de resolução deste aparelho é vital para alcançarmos uma boa observação global das preparações citológicas e, fundamentalmente, conseguirmos estudar as suas particularidades com maior finura, também, à mercê do seu sistema de iluminação (Radin & Wellman, 2010; Peleteiro, 2011).

A observação microscópica de uma preparação citológica fundamenta-se no seguimento de algumas diretrizes práticas, que é importante termos em consideração (**Figura 39**). Por norma, apenas recorremos ao uso da objetiva de x100 (ou objetiva de imersão) quando desejamos um estudo mais pormenorizado da constituição íntima celular, a fim de conseguirmos identificar possíveis agentes etiológicos (e.g. microrganismos intracelulares), bem como aferir

quanto ao tipo de células apresentadas quando não são visíveis recorrendo a objetivas de menor ampliação (Radin & Wellman, 2010; Peleteiro, 2011).

Raskin (2010) refere que as interpretações citológicas são usualmente classificadas em um dos cinco grupos citodiagnósticos, tal como se evidencia no **quadro 9**. No que tange, à interpretação citológica de um espécime suspeito de envolvimento tumoral, o prévio conhecimento da incidência de determinadas neoplasias com cede na pele, a sua localização preferencial e o seu aspeto morfológico geral representam dados orientadores preponderantes para o alcance do diagnóstico citológico de um processo cutâneo de índole neoplásica em curso (Radin & Wellman, 2010).

Quadro 9 Interpretação geral das características citológicas (adaptado de Raskin, 2010)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tecido normal ou hiperplásico ▪ Massa quística ▪ Inflamação ou infiltrado celular ▪ Resposta a lesão tecidual ▪ Neoplasia ▪ Amostra não diagnóstica

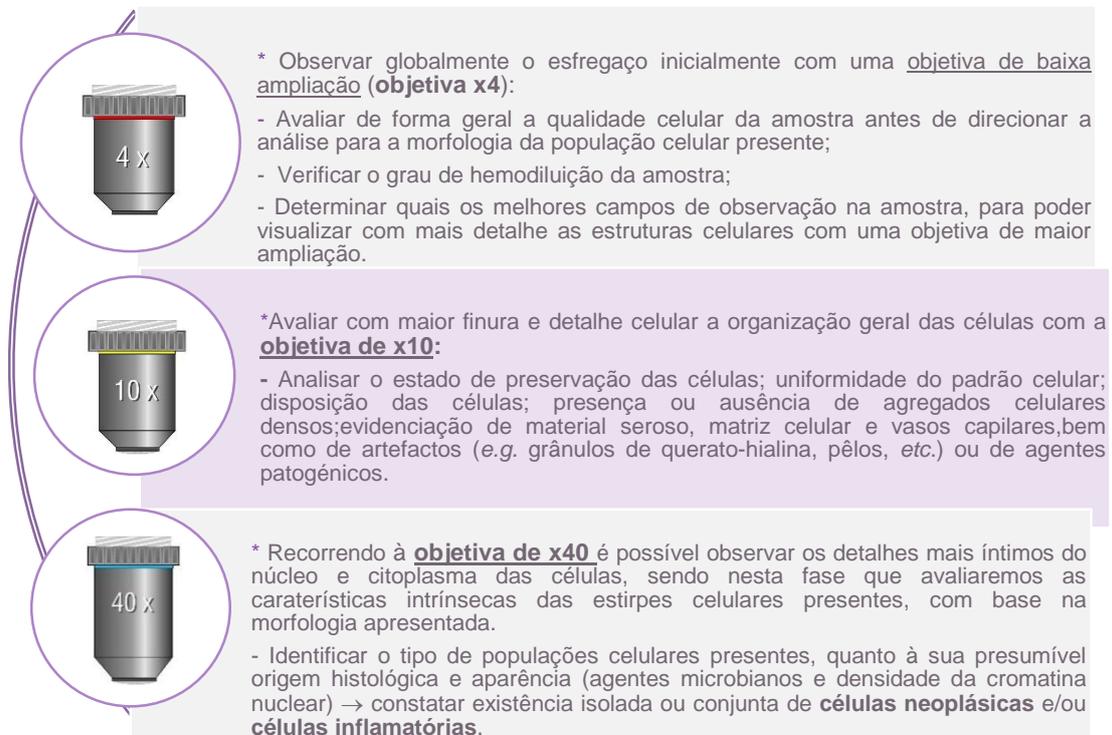


Figura 39 | Diretrizes orientadoras na avaliação citológica (adaptado de Peleteiro, 2011; Szladovits, 2014).

É possível observar distintos tipos celulares na mesma amostra de uma lesão, pelo que poderão ser encontradas simultaneamente, células do tipo neoplásico e do tipo inflamatório, especialmente se a colheita da amostra recaiu sobre o estroma do tumor, o que inevitavelmente poderá dificultar a interpretação da lesão em curso (Peleteiro, 2011; Zarka & Field, 2017) (**Figura 40**). De acordo com Radin & Wellman (2010), as alterações nas características morfológicas nucleares e citoplasmáticas conseguem avaliar-se melhor, usando objetivas de maior ampliação, devendo apenas proceder-se à avaliação das células que se encontram corretamente estendidas

e intactas, já que células roturadas podem facilmente confundir-se com células neoplásicas, dadas as modificações nucleares que estas denotam.



Figura 40| Diferenciados aspetos morfológicos celulares: (A) células epiteliais neoplásicas com escasso estroma mioepitelial, CPN, x20; (B) células epiteliais neoplásicas com abundante estroma mioepitelial, GMS, x20 e (C) padrão típico de inflamação mista, CPN, x20 (Imagens adaptadas de Zarka, 2017).

2.5.2. Padrões arquitetónicos celulares e aspetos histológicos

Numa primeira instância, ao avaliarmos as características celulares da amostra citológica, para aferirmos quanto à sua presumível origem histológica, deveremos procurar primeiramente, proceder: (i) à determinação do tipo de população celular predominante na amostra; (ii) à identificação das estirpes celulares presentes e (iii) à avaliação do padrão de disposição celular. A determinação dos padrões arquitetónicos celulares dominantes deverá constituir um passo primário, que antecede o discernimento entre células neoplásicas, de células do tipo inflamatório (Peleteiro *et al.*, 2011). Os padrões arquitetónicos celulares refletem, de um modo geral, a forma como as células estão relacionadas entre si, formando arranjos celulares. Esta característica é crucial na avaliação de cortes histológicos. Contudo, as amostras citológicas são constituídas por células maioritariamente, descamadas, esfoliadas ou aspiradas, o que conduz a perda da arquitetura geral do tecido de origem. O arranjo das células presentes na amostra citológica pode mimetizar o padrão arquitetónico em cortes histológicos, quando efetuada uma colheita e preparação apropriadas (Masserdotti, 2006; De Lara & Rodríguez, 2011). Aquando da avaliação morfológica das células presentes numa preparação citológica, devemos ter em consideração que as células quando dispostas numa monocamada em lâmina de vidro, se encontram dispersas na amostra colhida denotando uma aparência diversificada daquela que exibem em cortes histológicos, depois de efetuados os procedimentos de processamento histológico (Peleteiro, 2011).

Masserdotti (2006) considera que amostras citológicas mais ricas em células intactas e cujas relações entre si se mantêm, proporcionam-nos maiores hipóteses de determinar os padrões arquitetónicos predominantes, ainda que tal celularidade esteja dependente de vários fatores inerentes à própria amostra e aos métodos de processamento a que foi submetida.

Uma vez que as mesmas células podem assumir aspetos variados na análise citológica e na análise histopatológica, pode efetuar-se uma analogia entre o aspeto das células em citologia e a aparência e forma de um ovo estrelado, exibindo-se espraiadas na superfície da preparação citológica, sendo que, em histologia ou histopatologia, como as células foram submetidas a fixação e corte, surgem com aspeto fatiado, semelhante ao de um ovo cozido cortado, evidenciando menor volume (devido ao processamento químico a que foram sujeitas) (Peleteiro, 2011) (**Figura 41**).

Os padrões arquitetónicos celulares podem ser classificados em oito tipos distintos, de acordo com Masserdotti (2006) e Garrett *et al.* (2017): 1) *pavimentoso*, 2) *em favo de mel*, 3) *acinar*, 4) *em paliçada*, 5) *papilar*, 6) *trabecular*, 7) *em feixe multidireccional* e 8) *perivascular*. Na **figura 42**, encontram-se representados três

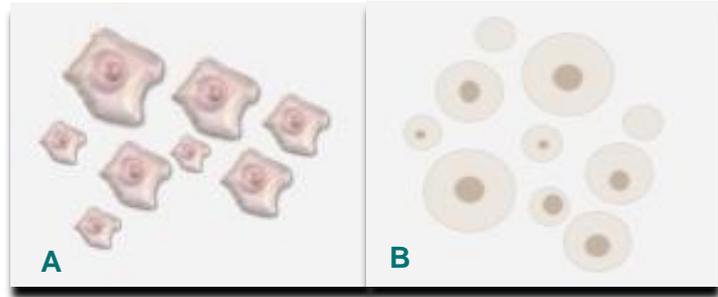


Figura 41 | Aspeto microscópico das células em citologia e histopatologia: (A) Células em forma de ovos estrelados (citologia) e (B) Células em forma de ovo cozido cortado (histopatologia) (Imagens de autora).

tipos exemplares celulares evidenciando o arranjo das células. Para proceder a uma interpretação apropriada de uma amostra é relevante considerar a aparência histológica do tecido e a sua arquitetura subjacente (Garret *et al.*, 2017).



Figura 42 | Exemplos de padrões arquitetónicos celulares (Imagem de autora).

2.5.3. Avaliação e interpretação citológica de lesões neoplásicas

De acordo com Teske (2008), a avaliação e interpretação de uma preparação citológica consiste basicamente em três etapas: (i) determinar o tecido de origem envolvido; (ii) diferenciar inflamação de hiperplasia (*i.e.* aumento das dimensões de um tecido ou órgão, em virtude do aumento do seu número de células) (Pires *et al.*, 2004) ou de uma neoplasia benigna ou maligna e (iii) classificar o processo inflamatório em curso ou o tipo de tumor presente. Citando Peleteiro (2011): “ *Uma vez identificado o tecido de origem, há que avaliar se as células em esfregaço reproduzem as características das células normais ou se se afastam destas, assumindo imagens que se designam como atípicas, seja na dimensão, na forma ou na relação núcleo: citoplasma*”.

O diagnóstico de lesões neoplásicas revela-se bastante desafiante, já que alguns tumores podem exibir uma morfologia celular muito similar à das células normais e nem todos os tumores apresentam a reunião de todas as características, em termos citológicos (Peleteiro *et al.*, 2011; Meinkoth *et al.*, 2014).

2.5.3.1. Critérios citológicos de malignidade celular

O grau de malignidade de um tumor é, fundamentalmente, baseado num conjunto de critérios de malignidade que expressam características de transformação neoplásica e cuja aplicação permite orientar o estabelecimento do diagnóstico citopatológico (Peleteiro, 2011). Estes critérios podem ser categorizados em três tipos essenciais: **critérios gerais, nucleares e citoplasmáticos**, tal como se evidencia na **tabela 12**.

A apreciação do potencial de malignidade celular de um tumor em preparações citológicas implica a avaliação das populações celulares, quanto à falta de diferenciação celular (anaplasia) e evidência de características de atipia celular, que indiquem que existe um descontrolo no crescimento (desenvolvimento assíncronico) e diferenciação celular anormal (indicador de anaplasia) (De Lara & Rodríguez, 2011; Meinkoth *et al.*, 2014).

Tabela 12 Critérios de malignidade celular (adaptado de De Lara & Rodríguez, 2011; Peleteiro, 2011 & Meinkoth <i>et al.</i> , 2014)		
Critérios	Caraterísticas celulares	Descrição citológica
Critérios Gerais	Anisocitose	Variação no tamanho da população celular
	Macrocitose	Células de maior dimensão (algumas células podem atingir o dobro do tamanho normal)
	Pleomorfismo	Morfologia variada dentro do mesmo tipo celular (variação no tamanho e forma)
	Hiper celularidade	Aumento do tamanho da população celular
	Disqueratose	Heterogeneidade no grau de queratinização celular (nos epitélios escamosos)
Critérios Nucleares	Anisocariose	Heterogeneidade na dimensão dos núcleos de uma população celular
	Macrocariose	Núcleos com tamanho muito aumentado (macronúcleos)
	Alteração do rácio Núcleo: Citoplasma (N:C)	Maior relação N:C
	Multinucleação	Existência de múltiplos núcleos numa só célula
	Moldagem nuclear	Deformação do núcleo por outro núcleo dentro da mesma célula ou em células adjacentes Núcleo de perfil deformado, por vezes com chanfraduras
	Macronúcléolos	Núcléolos aumentados de tamanho (altamente sugestivo de malignidade – núcléolos $\geq 5 \mu$)
	Núcléolos angulares	Núcléolos são fusiformes ou têm outras formas angulares ao invés da sua forma arredondada ou levemente oval

Crítérios Citoplasmáticos	Anisonucleose	Nucléolos de formas variadas
	Figuras mitóticas	Aumento do aparecimento de figuras de mitose atípicas
	Mitoses anormais	Divisão celular mais frequente e desalinhamento de cromossomas
	Padrão de cromatina grosseira	Aspeto mais grosseiro da cromatina, encontrando-se mal dispersa, em grânulos ou reticulada
	Aumento ou variabilidade na intensidade de coloração do citoplasma	Maior basofilia do citoplasma ou basofilia variável
	Vacuolização citoplasmática	Presença de vacúolos claros, de contorno normalmente bem definido e pequeno tamanho no interior do citoplasma
	Variação na quantidade de citoplasma	Conduz a alterações no rácio N:C

Num tecido normal as populações celulares constituintes denotam uma certa uniformidade morfológica, à semelhança do que normalmente é observado em amostras citológicas de neoplasias de carácter benigno (as quais exibem geralmente, populações celulares bem diferenciadas).

Ao contrário, as neoplasias malignas, podem apresentar-se com uma miríade de características celulares (Barger, 2012; Meinkoth *et al.*, 2014). Raskin (2010) realça que uma

neoplasia pode ser diagnosticada precocemente quando se observa a presença de uma população aumentada de células monomórficas e uma significativa escassez de células inflamatórias. A avaliação das características citomorfológicas é basilar para diferenciar um tipo de neoplasia benigno de um tipo maligno.

Será de referir que cada uma das características celulares indicadas em cada critério mencionado anteriormente, pode apresentar-se com intensidade de diferentes gradações, o que permite auxiliar na definição do

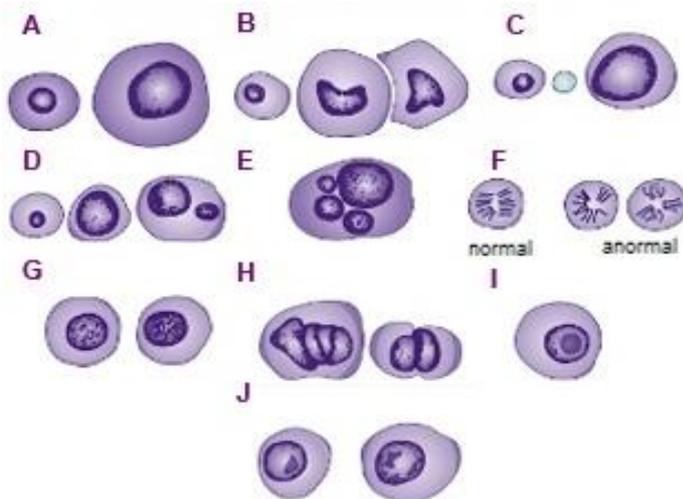


Figura 43|Principais critérios de malignidade celular: (A) Anisocitose e macrocitose; (B) Pleomorfismo; (C) Macrocitose (D) Anisocariose; (E) Multinucleação; (F) Figuras mitóticas atípicas; (G) Cromatina grosseira; (H) Moldagem nuclear; (I) Macronúcleolos e (J) Nucléolos angulares (adaptado de Meinkoth *et al.*, 2014).

grau de diferenciação celular e, conseqüentemente, aferir quanto ao grau de malignidade (Peleteiro, 2011). Os critérios que possuem maior relevo na interpretação citológica são os

nucleares e os nucleolares, sendo estes últimos, os que detêm maior contribuição para a denominação final do caráter do tumor, em detrimento dos critérios gerais e citoplasmáticos (Ochoa, 2007) (**Figura 43**). De acordo com a observação dos critérios nucleares é possível obter maior confiança no diagnóstico de malignidade (Santana *et al.*, 2016). De entre as principais características que possuem maior contributo orientativo no diagnóstico citológico destacam-se: a anisocariose acentuada, a anisocitose e a presença de mitoses atípicas ou figuras de mitose anormais. Uma outra evidência de malignidade é a observação de cromatina nuclear dispersa, grosseira ou anormalmente densa (sob a forma de grânulos), a qual numa célula normal deverá apresentar-se “*finamente dispersa*” (Peleteiro, 2011). Deveremos ter em linha de consideração que muitos dos critérios de malignidade citoplasmáticos podem ser evidenciados em estirpes neoplásicas de caráter benigno, como também, em alterações celulares de cariz fisiológico, relacionados com processos de índole displásica ou hiperplásica (De Lara & Rodríguez, 2011). A malignidade do tipo de população celular observada numa amostra citológica não pode ser determinada somente pela identificação de um critério de malignidade, porém qualquer uma destas características pode ser observada numa população celular (Meinkoth *et al.*, 2014). De acordo com Raskin (2010) para se estabelecer um diagnóstico de malignidade da lesão, deverão ser identificados três ou mais critérios de malignidade na população celular que evidenciem imaturidade celular, bem como atipia. Se reconhecidos mais de três critérios de malignidade nucleares em elevada percentagem na população celular da amostra observada, tal é sugestivo de que o tumor é maligno (De Lara & Rodríguez, 2011). Citando Peleteiro (2011): “*Identificada a natureza neoplásica da população celular e aplicados os critérios que permitem identificar o tecido de origem, o diagnóstico final está prestes a poder ser emitido*”.

2.5.4. Técnicas de colheita e processamento de amostras biológicas para análise citológica

A obtenção de amostras de material patológico para proceder à sua posterior, avaliação citológica é, na generalidade dos casos, um procedimento fácil que não implica o uso de material ou equipamento aprimorado e que se revela pouco traumatizante para o paciente (Peleteiro & Rodrigues, 1991). Os espécimes destinados a exame citológico podem ser obtidos e processados através da aplicação de variadas técnicas, algumas das quais serão explanadas adiante em virtude da sua relevância no diagnóstico oncológico.

2.5.4.1. Técnica de impressão ou aposição

Os esfregaços de impressão ou aposição são executados com frequência na prática clínica, nomeadamente em lesões cutâneas externas ulceradas (de preferência, não contaminadas por bactérias), secas, exsudativas (e.g. dermatites exsudativas ou lesões suspeitas de CSS) ou em material biológico proveniente de biópsia (que foi excisado cirurgicamente) ou que tenha sido colhido durante necrópsia (neste procedimento esta técnica

citológica é uma das mais empregues, já que possibilita uma avaliação e diagnóstico presuntivo céleres) (Teske, 2008; Marcos & Santos, 2011; Meinkoth *et al.*, 2014).

Em lesões obtidas por exérese cirúrgica ou provenientes de necrópsia recomenda-se a remoção do sangue (o qual pode impedir a correta adesão das células na lâmina) presente na superfície do fragmento de tecido colhido, com auxílio de um material absorvente (e.g. papel absorvente ou uma gaze), minimizando-se a presença de resíduos na amostra (Pires, 2002; Marcos & Santos, 2011; Bauer, 2014). Tal como a sua designação indica, este método baseia-se em pressionar suavemente por aposição a lesão cutânea superficial (antes e após limpeza da lesão com solução salina

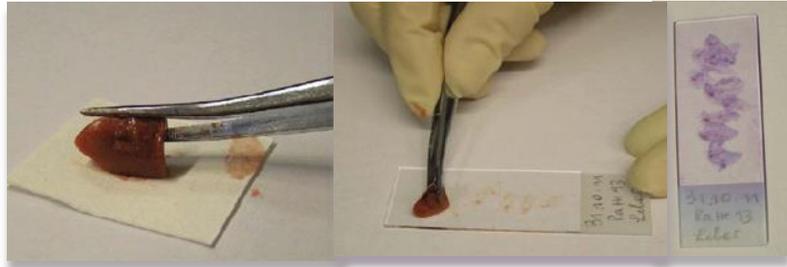


Figura 44| Preparação citológica pela técnica de impressão (Imagens adaptadas de Bauer, 2014).

isotónica) sobre uma lâmina de vidro previamente desengordurada ou fazendo aderir um fragmento de tecido colhido, a uma lâmina de vidro realizando várias impressões sobre esta (**Figura 44**). Deve proceder-se à execução de várias impressões do tecido na mesma lâmina, através de um movimento de rotação do fragmento tecidular ou da própria lâmina de vidro, para que este fique “impresso” sobre a superfície da lâmina (Teske, 2008; Marcos & Santos, 2011). Pires (2002) reforça que se preconiza a execução de mais do que uma lâmina para análise. Duas das principais limitações desta técnica são a maior probabilidade de contaminação indesejada do material biológico por bactérias, bem como o facto de apenas permitir a colheita de células superficiais da lesão e que podem não ser representativas de todo o processo patológico, conduzindo a uma observação de baixa celularidade no espécime obtido (Pires, 2002; Bauer, 2014).

2.5.4.2. Técnica de Punção por agulha fina (PAF)

Representa uma das técnicas citológicas primordial na obtenção de amostras provenientes de diferentes localizações anatómicas, sendo considerado o método de eleição na recolha de células dispostas mais profundamente numa lesão. Consiste basicamente numa técnica que utiliza uma agulha de calibre fino para puncionar uma lesão-alvo específica e obter um espécime a avaliar, através da deposição do conteúdo da agulha sobre uma lâmina (Peleteiro, 2011; Garrett *et al.*, 2017). Neste procedimento a agulha é acoplada ou não a uma seringa estéril e descartável (Santana *et al.*, 2016). Quanto mais mole for a consistência da lesão tecidular a ser aspirada, menor será o calibre da agulha e o volume da seringa a usar (Santana *et al.*, 2016). No que concerne a este método de colheita de amostras biológicas, consideram-se duas formas a partir das quais se emprega uma agulha fina para obtenção de um espécime,

proveniente de um tecido de um paciente: (i) *técnica aspirativa por Punção Aspirativa com Agulha Fina (PAAF)* e (ii) *técnica não aspirativa* (Del Ojo, 2013b; Garrett *et al.*, 2017).

A citologia de aspiração com agulha fina é uma técnica útil especialmente indicada para avaliar lesões nodulares palpáveis exteriormente (e.g. cutâneas ou subcutâneas), massas de tecido mole (sólidas ou abscessos), variados órgãos intracavitários, Lnn. regionais (e.g. em situações de hipertrofia ganglionar), massas intraabdominais e intratorácicas, bem como, efusões ou derrames cavitários corporais e, ainda, material fluído de origem quística (Peleteiro & Rodrigues, 1991; Peleteiro, 2011; Bauer, 2014) (Figura 45).

Na obtenção de material proveniente de massas intracavitárias recorre-se com frequência ao uso da técnica de PAAF ecoguiada, podendo ser aplicadas as duas vertentes (Peleteiro, 2011). Em qualquer uma das técnicas é necessário o uso limitado de material para se obter uma boa preparação citológica a partir da amostra

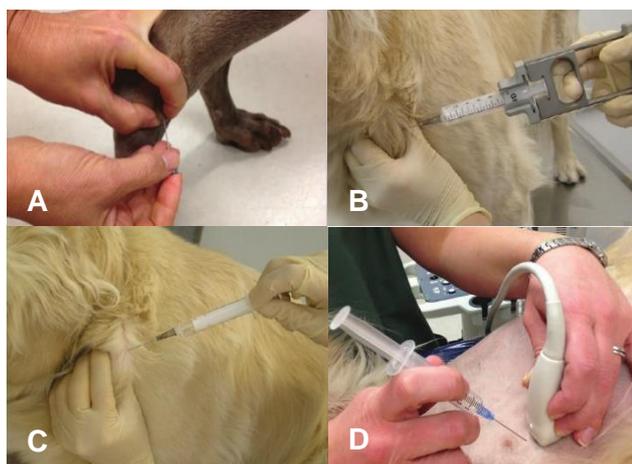


Figura 45| Técnicas de PAF não aspirativas e aspirativas: (A) PAF não aspirativa, por capilaridade, (B) PAAF, (C) PAAF com punho de aspiração e (D) PAAF ecoguiada (Imagens adaptadas de Bauer, 2014 e Garret *et al.*, 2017).

recolhida, não devendo descurar-se a correta seleção do calibre da agulha a utilizar (já que, o seu comprimento interfere diretamente na quantidade de amostra aspirada), o volume da seringa recomendado e não menos importante, a prévia preparação do local a intervir (Peleteiro & Rodrigues, 1991; Peleteiro, 2011;Garret *et al.*, 2017).

2.5.4.2.1. Punção aspirativa por agulha fina (PAAF)

Baseia-se num procedimento simples, inócuo e rápido em que se procede à aspiração de uma pequena fração de um tecido usando uma agulha, cujo calibre fino (entre 21 e 25 Gauge-G), causa mínimo traumatismo sem necessitar, regra geral, de anestesia ou de sedação do animal, nem recurso a sutura. Antes de se proceder à técnica de aspiração, o operador deverá isolar com firmeza a massa tecidular, com uma mão e, com a outra mão, introduzir a agulha com a seringa acoplada, no centro da lesão numa direção perpendicular. Posteriormente, poderá proceder-se à aspiração através de vácuo, por meio de uma pressão negativa exercida, até a seringa (com volume entre 3 a 10 mL) atingir a capacidade máxima de aspiração (Peleteiro & Rodrigues, 1991; Peleteiro, 2011; Meinkoth *et al.*, 2014). Pode efetuar-se a aspiração usando a seringa isoladamente ou com recurso a um punho ou pistola de aspiração fixada à seringa, a qual permite obter amostras de melhor qualidade, nomeadamente em lesões com diâmetro inferior a 1 cm (Peleteiro, 2011).Preconiza-se a realização de diversas aspirações na mesma

lesão, em vez de redirecionar a agulha várias vezes no nódulo (Del Ojo, 2013b), já que, tais movimentos poderão induzir maior traumatismo e hemorragia local, conduzindo, consequentemente, a maior hemodiluição do espécime obtido. Para além disso, deverá evitar-se que a agulha saia da massa tecidual a fim de precaver que material circunvizinho seja, também, recolhido (Peleteiro, 2011). Sempre que se detete a entrada de sangue no interior da seringa deve interromper-se de imediato a aspiração, caso contrário será obtida uma amostra sem valor diagnóstico. Uma vez concluída a aspiração procede-se à minimização da pressão negativa criada no interior da seringa, largando o êmbolo, procedimento este muito importante para evitar a entrada de material para o seu interior, e a extração da agulha da lesão. De seguida, a agulha é desacoplada da seringa e é introduzido ar no seu interior sendo reintroduzida a agulha, de novo na seringa. O material biológico colhido é depois depositado sob a forma de uma única gota, na extremidade de uma ou mais lâminas de vidro desengorduradas, tendo especial cuidado em colocar o bisel da agulha direcionado para baixo e em contato íntimo com a lâmina, já que, deste modo, se evita a disseminação de várias pequenas gotículas, que podem condicionar a qualidade da amostra. Recomenda-se geralmente a preparação de vários esfregaços por análise (Peleteiro, 2011). Face à ampla variedade de neoplasias cutâneas que os pequenos animais podem apresentar, a técnica de PAAF torna-se de extrema utilidade diagnóstica, possibilitando a avaliação de qualquer massa cutânea, de forma minimamente invasiva, sendo, desde há longas décadas, considerado um método de diagnóstico oncológico fiável (particularmente, no diagnóstico de tumores mamários) em Medicina humana (Mayordomo & De las Mulas, 2011, Cassali *et al.*, 2007).

2.5.4.2.2. Técnica não aspirativa (PNAF)

Nesta técnica recorre-se também ao uso de uma agulha de calibre fino (entre 22 a 25 G), à semelhança do que é efetuado na PAAF, porém não se usa vácuo para colher o material do interior da lesão, não sendo acoplada a seringa à agulha, para realizar a sua aspiração. Trata-se de um método em que somente se usa uma agulha para puncionar o interior da massa cutânea em diferentes ângulos, realizando movimentos cortantes, multidireccionados para obter a amostra por capilaridade (Stone & Reppas, 2010; Meinkoth *et al.*, 2014). Pode ser amplamente usada em múltiplas massas, apresentando como principais vantagens a obtenção de amostras com reduzida contaminação hematogénica, em órgãos muitos vascularizados (*e.g.* Baço), e a preservação da morfologia celular. Não obstante, a sua principal limitação diagnóstica é proporcionar espécimes com pouca riqueza celular (Peleteiro, 2011).

2.5.4.3. Técnicas de esfregaços para análise citológica

Habitualmente, na rotina laboratorial para obtenção de esfregaços citológicos obtidos a partir de amostras biológicas, em citologia veterinária, recorre-se à realização de duas técnicas de

preparação citológica (Figura 46): (i) técnica de esmagamento ou *squash* e (ii) técnica do esfregaço sanguíneo.

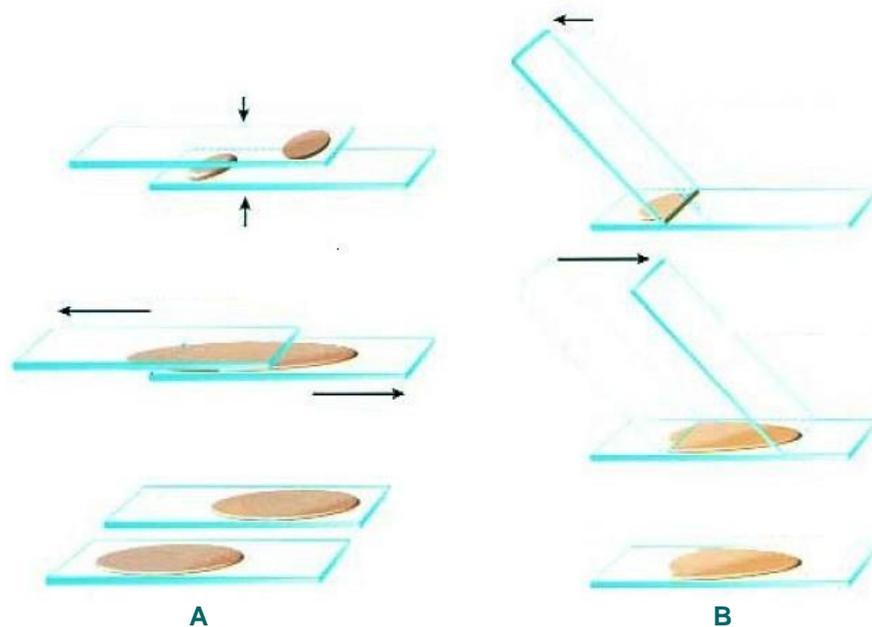


Figura 46 Técnicas de preparação citológica: (A) Técnica de esmagamento ou *squash* e (B) Técnica do esfregaço sanguíneo (adaptado de Radin & Wellman, 2004).

2.5.3.3.1. Técnica de esmagamento ou *squash*

A execução desta técnica está preconizada em espécimes de consistência semissólida (e.g. conteúdo quístico) ou de aspeto mucoso (e.g. material obtido por PAF de Lnn. ou de RC) ou que tenham sido alvo de centrifugação (Meyer *et al.*, 2010, Marcos & Santos, 2011). Baseia-se na colocação de uma pequena amostra do material colhido numa lâmina de vidro limpa e desengordurada, efetuando o esmagamento utilizando segunda lâmina (denominada por *spreader*), que é colocada perpendicularmente sobre a primeira. Esta técnica de compressão da amostra biológica deve ser executada de modo contínuo, realizando um deslizamento uniforme e suave, sem efetuar demasiada pressão sobre a lâmina (Meyer *et al.*, 2010). Deverá ter-se especial cuidado em não ultrapassar o extremo da primeira lâmina sobre a qual é depositado o material a estender, já que, durante o movimento de deslizamento, poderá ocorrer alguma perda de material que pode ser relevante para análise (Marcos & Santos, 2011). No final, o objetivo central é obter um esfregaço em monocamada, composto por material distribuído de modo uniforme, permitindo observar a morfologia individual das células após coloração (Meyer *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2016). Na ótica de Meyer *et al.* (2010) a colocação de amostra em excesso na lâmina, não raras vezes, conduz a obtenção de uma preparação citológica com uma camada espessa que dificulta a observação das células microscopicamente.

2.5.4.3.2. Técnica do esfregaço sanguíneo

Em amostras de consistência mais líquida (e.g. fluídos cavitários) que apresentam uma semelhança com o plasma, está indicada a utilização de uma técnica de preparação citológica muito similar à efetuada para realização de um esfregaço sanguíneo (Meyer *et al.*, 2010). Neste caso, uma pequena gota de amostra líquida é colocada sobre uma lâmina de vidro desengordurada, sobre a qual se sobrepõe uma segunda lâmina de vidro (*spreader*), num ângulo de 45° em relação à primeira lâmina onde é depositado o material. Através de um suave e contínuo movimento de deslizamento efetuado de modo célere, espalha-se o material sobre a primeira lâmina, através de capilaridade e posterior arrastamento. Este procedimento é importante para se obter um esfregaço em monocamada de aspeto fino que permita uma distribuição das células e fácil observação individual, sem sobreposição de estruturas (Marcos & Santos, 2011).

2.5.5. Fixação e coloração específica de preparações citológicas

Uma vez efetuadas as preparações citológicas, estas deverão ser fixadas de preferência ao ar (Teske, 2008), regra geral, através de agitação manual, já que deste modo, se proporciona a preservação da integridade das células e a sua aderência à lâmina, permitindo conservar as estruturas celulares de modo mais fidedigno possível ao estado vivo e, evitando o seu desprendimento durante a fase de coloração (Marcos & Santos, 2011).

Depois de seco, o esfregaço pode ser corado de imediato ou, caso seja enviado para laboratório externo, a coloração não deverá ser efetuada passadas mais de 48 horas (um a dois dias, no máximo). Santana *et al.* (2016) recomendam que se deva proceder à prévia fixação química da preparação citológica com e.g. metanol (durante cinco a dez minutos), antes de ser enviada para análise em laboratório de Patologia, caso esta não possa ser de imediato corada. Tal evitará a degradação das células até estas serem coradas. Em Citologia Veterinária existe uma panóplia de métodos de coloração, fáceis de aplicar e de reduzido custo, proporcionando uma boa qualidade de observação citológica, destacando-se os mais usados convencionalmente (Marcos & Santos, 2011):



Figura 47| Método de coloração por Diff -Quik® utilizado rotineiramente no laboratório do HVPT (Fotografia de autora).

- **Colorações do tipo Romanowsky** (e.g. Diff-Quik® ou panótico rápido (**Figura 47**); Giemsa, Wright, May- Grünwald - Giemsa);
- **Coloração de Papanicolau (CPN)** (coloração tricrômica);
- **Colorações vitais** (e.g. coloração com Novo Azul de Metileno).

Estas técnicas de coloração simples visam permitir a visualização e destaque dos componentes celulares, demonstrando a sua morfologia. Peleteiro & Rodrigues (1991) consideram que, fruto da sua experiência profissional, o tipo de coloração citológica mais recomendado é o Giemsa (GMS), uma vez que existem outros tipos de colorações que requerem uma fixação imediata, como é o caso das tricrómicas (coloração de CPN) (Teske, 2008). A coloração GMS proporciona uma “(...) coloração mais diferenciada do citoplasma e de inclusões nele contidas”, ainda que não permita corar o núcleo das células. Por seu turno, o método de CPN rotineiramente utilizado em citologias cervicais em Patologia humana, possibilita uma maior evidenciação dos núcleos, o que permite ao Patologista identificar, mais facilmente, a presença de anomalias morfológicas neste constituinte celular, nomeadamente, permitindo sobressair o padrão de cromatina (Marcos & Santos, 2011; Del Ojo, 2013c; Santana *et al.*, 2016). Todavia, as colorações do tipo Romanowsky são as mais usadas rotineiramente pelos Citologistas Veterinários, devido à acessível execução e por constituírem colorações rápidas (North & Banks, 2009; Marcos & Santos, 2011; Santana *et al.*, 2016). De entre estas, o tipo de coloração mais empregue é o Diff-Quik® (DQ) por constituir uma coloração rápida, de simples execução e que proporciona um excelente detalhe citoplasmático (De Lara & Rodríguez, 2011; Marcos & Santos, 2011; Santana *et al.*, 2016). Por seu turno, a coloração de CPN não é muito utilizada em Medicina Veterinária, já que é uma técnica que requer múltiplos procedimentos e envolve a aplicação de vários reagentes químicos (Marcos & Santos, 2011; Del Ojo, 2013c; Garret *et al.*, 2017).

As principais vantagens da aplicação prática de corantes do tipo Romanowsky encontram-se referidas no **quadro 10**. Neste tipo de colorações citológicas, são usados vários corantes destinados a corar especificamente, o citoplasma ou o núcleo das células, podendo denotar uma maior especificidade para alguns constituintes/estruturas celulares. Santana *et al.* (2016) aludem para a necessidade de preparação prévia de tecidos/

Quadro 10| Vantagens dos corantes do tipo Romanowsky (adaptado de Marcos & Santos, 2011)

- Fácil e simples realização técnica da coloração;
- Existe uma grande variedade de produtos corantes disponíveis comercialmente;
- Capacidade de permitir uma coloração permanente;
- Permitem boa visualização do citoplasma das células;
- Identificação de granulações, inclusões ou microrganismos.

amostras biológicas antes de proceder à coloração propriamente dita, já que é indispensável que a escolha do tipo de fixador a utilizar primariamente, bem como a natureza do (-s) corante (-s) a usar posteriormente, sejam apropriados para o tipo de tecido biológico a processar.

Preparações citológicas coradas por CPN, utilizando uma fixação química, podem ser submetidas a outros tipos de coloração especial (e.g. a imunocitoquímica - ICQ) (Marcos & Santos, 2011). De acordo com Skoog & Tani (2011), para obter um resultado ótimo em ICQ, a eleição do fixador constitui um elemento de grande importância a ter em consideração. Deste modo, tanto em citologia como em ICQ podem ser usados uma panóplia de fixadores químicos, de entre os quais se mencionam: o metanol, o etanol e a acetona (fixadores não aditivos), bem como o formaldeído (fixador aditivo).

Não raras vezes, pode suceder que esfregaços secos ao ar, que tenham sido anteriormente fixados com metanol ou etanol, podem ser alvo de deterioração celular posterior e exibam alguns

artefactos decorrentes da secagem das células, que podem comprometer a correta identificação das estruturas celulares (Marcos & Santos, 2011). Alguns autores sugerem que poderá ser minimizada esta deterioração se os esfregaços forem acondicionados, através de congelação ou utilizando gelo em *spray* – fixação física (Colley & Stead, 2013). Não obstante, segundo apontam Marcos & Santos (2011) bem como Del Ojo (2013c), está descrita a realização de fixação húmida dos espécimes usando um *spray* de fixação citológica (aplicado somente após secagem ao ar) ou metanol a 100%, caso as lâminas não sejam coradas *in loco* até 48 horas. No entanto, estes autores sublinham que o recurso a fixação húmida não deve ser o mais recomendado, visto que,

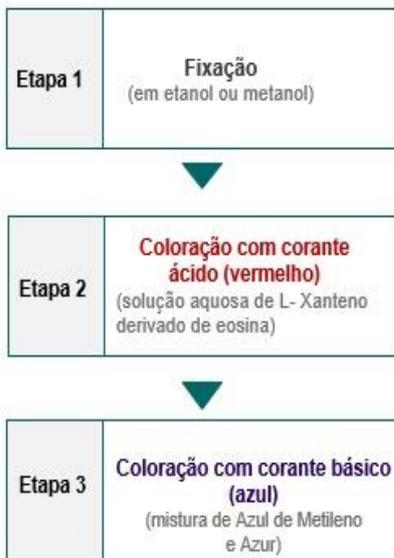


Figura 48| Etapas basilares da técnica de coloração DQ (Imagem de autora).

as células podem ficar plasmolisadas (*i.e.* retraídas devido à impregnação do fixador húmido), o que não será surpreendente que conduza a uma dificultada identificação microscópica das células. Também, pode ser utilizado um método simples de fixação rápida utilizando laca para o cabelo (pois, esta apresenta uma composição enriquecida em álcool e permite formar uma fina película protetora sobre o esfregaço) (Marcos & Santos, 2011).

As etapas genéricas de colorações do tipo DQ baseiam-se em: (i) *fixação*; (ii) *coloração com corante ácido (vermelho)* e (iii) *coloração com corante básico (azul)* (**Figura 48**). Primeiramente, os esfregaços são fixados pela ação de um álcool (*e.g.* etanol ou metanol) durante alguns segundos e posteriormente, são emersos por ordem, em soluções aquosas onde se encontram diluídos os corantes (Marcos & Santos, 2011). A utilização dos corantes

utilizados em colorações do tipo Romanowsky possibilita um bom detalhe celular, ainda que relativamente menor que o fornecido por colorações tricrómicas (Marcos & Santos, 2011), porém, a impregnação destes corantes pelo núcleo e nucléolos celulares revela-se suficiente, para que se consiga

posteriormente, diferenciar um processo inflamatório de um processo de caráter neoplásico, tendo por base a avaliação dos critérios citológicos de malignidade (Marcos & Santos, 2011; Santana *et al.*, 2016). A par das colorações clássicas referidas, outras colorações especiais usadas em métodos citoquímicos podem também, ser empregues para corar esfregaços citológicos, evidenciando determinadas estruturas celulares ou microrganismos específicos (Marcos & Santos, 2011), das quais se destacam algumas indicadas no **quadro 11**.

Quadro 11| Colorações específicas usadas em citologia (adaptado de Marcos & Santos, 2011)

- Técnica de coloração PAS (Periodic Acid Schiff)
- Técnica de Ziehl-Neelsen
- Técnica de coloração de Gram
- Coloração com Sudão
- Coloração com Vermelho do Congo
- Coloração com azul de Toluidina

2.5.6. Preservação definitiva de amostras citológicas em lâmina

Conforme mencionam Meyer *et al.* (2010), a correta precisão da observação por microscopia ótica, de um espécime obtido de um tecido, é em muito determinada pelo maneiço das preparações citológicas. Deste modo, em lâminas que necessitem uma segunda apreciação e que tenham que ser enviadas para laboratório especializado, é vital que se consiga alcançar a máxima preservação da morfologia celular da amostra da lesão colhida, que pode ser fixada previamente em lâmina, por tempo indefinido.

Independentemente do tipo de técnica de coloração aplicado, pode recorrer-se a um método eficaz de conservação indefinida e permanente das preparações citológicas que minimiza o risco de danos nos espécimes preparados, ou seja, pode proceder-se à montagem das preparações citológicas utilizando substâncias viscosas (resinas). Primariamente, deve-se proceder ao isolamento do material contido na lâmina de vidro, recorrendo-se à colocação de uma gota de xilol sobre a lâmina e posteriormente, de uma gota de líquido de montagem usado em histopatologia (e.g. Eukitt®, o Entellan® ou o DPX), cobrindo posteriormente, com uma lamela a preparação citológica, a qual fica preservada pela solidificação da resina em contacto com o ar (De Lara & Rodríguez, 2011; Marcos & Santos, 2011; Noli, 2011). Em amostras citológicas que tenham que ser submetidas para ICQ, é muito relevante que se consiga preservar a antigenicidade da amostra, bem como a morfologia das populações celulares presentes nos esfregaços através de fixação (Kumar & Rudbeck, 2009; Colley & Stead, 2013). Para tal foram descritos alguns métodos de conservação de amostras citológicas em lâmina, por tempo indeterminado (Kirbis *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2015; Barata *et al.*, 2017): (i) o método usando uma solução de Polietilenoglicol 1450 (PGE), (ii) o método pós-fixação por PreservCyt™ e (iii) o método usando ThinPrep®. As principais vantagens destes métodos baseiam-se no facto do PGE permitir a formação de uma fina película sobre o esfregaço que possibilita a preservação dos Ag, melhorando as reações imunocitoquímicas, não interferindo com a morfologia celular. Por outro lado, o método por PreservCyt™, quando aplicado diretamente, em amostras citológicas obtidas por PAAF, proporciona uma ótima manutenção da morfologia celular, não interferindo com as reações imunocitoquímicas (Kirbis *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2015).

2.5.7. Metodologia de envio de amostras para análise citopatológica

No caso de haver pretensão de submeter preparações citológicas a um laboratório externo, para obter uma segunda opinião por citologistas ou patologistas especializados, deverão ter-se algumas precauções no que diz respeito ao correto acondicionamento das lâminas para análise, para que cheguem ao laboratório intactas e a amostra obtida devidamente preservada. A coloração *in loco* das lâminas em laboratório interno antes do seu envio é opcional, podendo estas ser remetidas sem serem coradas previamente.

O procedimento mais aconselhável é proceder à preparação de vários esfregaços citológicos (Del Ojo, 2013c; Saraiva & Payan-Carreira, 2016), efetuando a coloração de uma delas, para dispormos de material suficiente para o colega citologista/patologista efetuar um estudo citológico fidedigno. Todavia, recomenda-se o envio das lâminas por corar, já que nem sempre o clínico detém o conhecimento de qual o corante mais apropriado a usar para o tipo de espécime em questão, podendo ser preciso usar colorações especiais (Marcos & Santos, 2011). As lâminas podem ser acondicionadas em caixas de plásticos destinadas ao efeito, que



Figura 49 | Diferentes tipos de caixas de plástico para acondicionamento de lâminas citológicas destinadas a expedição (Imagem adaptada de Marcos & Santos, 2011).

apresentam separadores indicados para preparações citológicas obtidas por diferentes técnicas ou mesmo para individualizar as lâminas umas das outras (**Figura 49**).

Todo o tipo de material destinado a análise citológica deverá ser previamente identificado, acompanhado de uma ficha de requisição de análise e de um relatório citológico (sucinto e claro), que evidencie dados relevantes para emissão de um diagnóstico mais rigoroso. Uma vez que poderá ocorrer acidentalmente, durante o

transporte, o derrame de líquidos de outras amostras a remeter para análise (e.g. formol de recipientes com peças cirúrgicas) é de suma relevância proteger estes documentos de eventuais incidentes, pelo que devem ser colocados num envelope ou dentro de um material plástico junto da respetiva amostra, para não se danificarem. Pires (2002) salienta que, caso não se disponha do tipo de material apropriado (em plástico ou cartão), as lâminas podem ser enviadas para laboratório, envolvidas em papel absorvente (e.g. papel higiénico), devendo depois ser remetidas dentro de um envelope de cartão internamente almofadado. Enfatiza ainda que, muito importante, é fazer menção no exterior do envelope do grau de fragilidade do material nele contido. Saraiva & Payan-Carreira (2016) frisam que o clínico ou patologista interno devem, sempre que possível, confirmar a representatividade da amostra que se pretende remeter para análise, tendo cuidado de avaliar se esta é representativa do aspeto global da lesão e assegurar a existência de células na preparação citológica efetuada, antes de proceder ao envio das lâminas para outro laboratório.

2.5.8. Principais erros técnicos em citologia oncológica veterinária

Quer durante a obtenção da amostra citológica quer nas fases de processamento a que é sujeita, alguns erros técnicos (pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos) podem ser cometidos podendo condicionar a qualidade do espécime obtido e a sua posterior, interpretação citológica. Caniatti (2007) refere alguns dos principais erros diagnósticos inerentes a fatores ligados à amostra e a fatores extrínsecos a esta.

No que se refere à amostra, o diagnóstico pode tornar-se dificultado devido a (Caniatti, 2007; Peleteiro, 2016):

- Uma colheita insuficiente para análise ou por esta se apresentar hemodiluída, sendo considerada tecnicamente inadequada para ser avaliada pelo citologista;
- Amostra contaminada por material patológico estranho;
- Amostra pouco representativa da lesão, apresentando pobre ou escassa celularidade;
- Amostra citológica com células em número suficiente porém, não dispostas em monocamada (material aspirado demasiado abundante ou não dispersado na lâmina);
- Má preservação celular da amostra, mesmo que as células sejam visíveis;
- Técnica de coloração usada não foi equilibrada, não permitindo identificar os detalhes celulares por má preservação das células ou incapacidade de retenção de corantes, devido a impregnação de vapores de formol contido em peças biopsiadas, transportadas em conjunto com as lâminas citológicas.

De entre os principais erros extrínsecos à amostra mais cometidos, mesmo quando os esfregaços citológicos se apresentam com qualidade ótima, destacam-se: o incorreto acondicionamento das lâminas durante o transporte até ao laboratório, conduzindo à chegada de lâminas partidas, bem como a inexperiência do citopatologista ou desconhecimento completo de informações vitais para emitir um diagnóstico correto, associado a falta de comunicação entre os elementos da equipa de trabalho (clínicos e citopatologistas). Somam-se a essas limitações técnicas, a escassez de tempo para proceder à avaliação cuidada das lâminas (elevada pressão diagnóstica) e a celeridade de emissão de um diagnóstico ainda que presuntivo. O insuficiente conhecimento do tipo de alterações estruturais que se verificam em diferentes tecidos, tal como o excesso de confiança na própria capacidade diagnóstica ou a incapacidade de reconhecimento de alguns padrões celulares mais raros, é fator conducente a erros de interpretação diagnóstica (Caniatti, 2007; Peleteiro, 2016). Deste modo, a fim de identificar as causas mais comuns de erros no diagnóstico citológico, e de os ultrapassar, seria relevante a implementação de controlos de qualidade internos e externos em laboratórios de citologia (Caniatti, 2007).

2.5.9. Vantagens e limitações diagnósticas da análise citológica

A informação obtida através da citologia é fortemente melhorada através de um bom conhecimento das vantagens que este método de diagnóstico aporta e das desvantagens que lhe estão associadas (Sharkey *et al.*, 2007). De acordo com McNeill (2011), uma das vantagens associadas ao uso corrente do diagnóstico citológico de amostras provenientes de lesões cutâneas e subcutâneas é permitir uma rápida colheita dos espécimes a avaliar em pacientes sem serem submetidos a anestesia ou analgesia. Para além disso, a execução de uma avaliação citológica pode facultar-nos resultados imediatos, minimizando a necessidade de recurso a outros testes de diagnóstico adicionais, que estão associados a métodos mais invasivos no

processo de colheita de amostras. No **quadro 12**, são apresentadas algumas das vantagens e limitações diagnósticas da análise citológica.

Quadro 12| Vantagens e limitações da análise citológica
(Masserdotti, 2006; Sharkey et al., 2007, 2014)

Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Análise simples e rápida de executar quer na recolha quer no processamento das amostras; ▪ Segura (denotando poucos riscos para o paciente); ▪ Associada a reduzidas taxas de complicações relacionadas com a colheita da amostra; ▪ Método de diagnóstico relativamente mais económico que a análise histopatológica → Relação custo-benefício elevada; ▪ Não requiere anestesia em pacientes instáveis; ▪ Procedimentos bem tolerados por parte dos pacientes; ▪ Aplicadas técnicas minimamente invasivas; ▪ Emissão de resultados em pouco tempo; ▪ Método de diagnóstico muito versátil (útil para identificar amostras de massas, fluidos ou lesões específicas, frequentemente sem causar danos no paciente) e permite a interpretação de variados processos patológicos, permitindo aferir quanto ao tipo e evolução; ▪ Diferencia doenças inflamatórias, proliferativas, infecciosas e neoplásicas; ▪ Possibilita um vasto leque de valiosas informações para emissão de um diagnóstico concreto.
Limitações	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Somente permite o estudo das células de modo isolado, por obtenção de um espécime relativo a uma área reduzida da lesão (pode não representar o <i>status</i> global da doença); ▪ Proporciona uma má interpretação da arquitetura do tecido lesionado, pois raramente esta não é preservada, não sendo verdadeiramente elucidada através da citologia (principal limitação característica); ▪ Dificil discernimento entre células reativas de células inflamatórias, em determinados tipos de neoplasias (e.g. sarcomas); ▪ Fornece resultados inconclusivos (associados a presença de artefatos na amostra ou baixa celularidade).

2.5.10. Relatório citológico: considerações relevantes

O relatório citológico constitui um documento de referência diagnóstica, onde o Citologista/Patologista Veterinário documenta e regista todas as informações fundamentais ao estabelecimento de um diagnóstico presuntivo ou definitivo, incluindo a interpretação dos aspetos macroscópicos da lesão, bem como a descrição microscópica dos aspetos morfológicos da amostra biológica por este observada. Deverá representar um arquivo permanente do quadro lesional observado no animal, devendo ser uma declaração redigida usando uma linguagem sucinta e uniformizada (baseada nas competências técnico-científicas dos intervenientes), recorrendo ao uso de terminologia científica adequada, para que a partilha de informação entre o Patologista e o clínico Veterinário, seja feita de modo claro, acessível, direto e com o cunho da responsabilidade de quem o efetua (Sharkey & Wellman, 2011). Para que um relatório citológico sirva a sua função é necessário que o meio de comunicação entre o Patologista e o clínico Veterinário estejam em contínuo funcionamento (Peleteiro, 2016). Existem algumas considerações cruciais que o Patologista Veterinário deverá ter em linha de reflexão, aquando da elaboração de um relatório clínico, a remeter ao médico veterinário que o requereu, através do envio de uma ficha de requisição de análise que acompanha a amostra. Neste sentido, o relatório citológico final deverá permitir uma correta elucidação dos aspetos considerados para o estabelecimento de um diagnóstico, através da menção a alguns parâmetros descritivos a referir (**Quadro 13**).

Quadro 13 | Estruturação de um relatório citológico (adaptado de Peleteiro, 2016)**Aspetos descritivos a considerar num relatório citológico**

- A. Referência clara à identificação do animal** - deverá ser mencionada a localização da (-s) lesão (-ões), tal como, o método de colheita da amostra usado);
- B. Descrição detalhada do tipo de material biológico recebido no laboratório** – deverá ser referida a quantidade de lâminas enviadas (para análise citológica) ou de líquido recebido (no caso de ser efusão);
- C. Descrição elucidativa do tipo de material observado microscopicamente e referência ao padrão lesional;**
- D. Indicação do diagnóstico emitido** – neste ponto pode ser indicado um leque de possíveis diagnósticos diferenciais no caso de o diagnóstico não ter sido devidamente fundamentado (podem ser usadas expressões como “compatível com” ou “sugestivo de”. Por outro lado, pode ser empregue a expressão “*não se exclui*”, nas situações em que o diagnóstico definitivo não foi determinado;
- E. Menção a observações/comentários ou recomendações finais** – neste campo o patologista pode indicar ou sugerir ao clínico a realização de determinados procedimentos a tomar, que considere pertinentes e que auxiliem a esclarecer o quadro clínico apresentado pelo animal.

Christopher & Hotz (2004) desenvolveram um estudo que visava estimar o grau de confiança no diagnóstico emitido por um grupo de patologistas. A realização deste estudo permitiu aos autores constatar que, utilizando expressões com uma terminologia elucidada, pode mostrar-se de grande importância para aperfeiçoar a comunicação entre o patologista e o clínico, bem como melhorar a qualidade dos dados expressos em relatórios citológicos, aumentando, assim, o nível de confiança no que concerne ao diagnóstico estabelecido. Em síntese, deve ser enfatizado que a responsabilidade do patologista é fornecer um relatório de citologia que permita ao clínico tomar as decisões apropriadas para o caso clínico em questão e tal requer a obtenção contínua de competências para emitir um diagnóstico credível (Sharkey *et al.*, 2007).

2.5.11. Aplicação clínica do diagnóstico citopatológico e do estadiamento tumoral na classificação de neoplasias cutâneas

2.5.11.1. Valor diagnóstico da análise citológica em Oncologia veterinária

A análise citológica denota um grau de fiabilidade diagnóstica própria que não deve ser menosprezada em detrimento da informação veiculada pelo exame histopatológico de tecidos lesionados. O seu valor diagnóstico prende-se com a probabilidade que este meio auxiliar de diagnóstico oferece para poderem ser emitidos diagnósticos corretos. Ao longo dos últimos anos, foram desenvolvidos diversos estudos quer em Medicina humana quer em Medicina Veterinária, que objetivaram avaliar a precisão diagnóstica da citopatologia em relação à histopatologia (Kabuusu *et al.*, 2016). Segundo documentam Cassali *et al.* (2007), a avaliação do rigor da técnica de citologia por PAAF ainda não é muito relatada na área da Medicina Veterinária.

A grande generalidade destes estudos demonstrou que a fiabilidade é muito variável atendendo ao tipo de lesões examinadas, particularmente em lesões cutâneas e subcutâneas em relação a lesões inerentes a órgãos internos (Cohen *et al.*, 2003; Griffiths, 2004; Ghisleni *et al.*, 2006; Peleteiro, 2016). Eich *et al.* (2000) desenvolveram um estudo o qual permitiu estimar o valor preditivo do diagnóstico citopatológico comparativamente ao diagnóstico histopatológico

convencional, tendo obtido 100 espécimes de massas de vários sistemas de órgãos escolhidas aleatoriamente, provenientes de 65 canídeos, 30 de felídeos e cinco de animais exóticos. Os resultados alcançados permitiram aferir que dos 100 espécimes colhidos no intraoperatório, em 42% destes, foi obtido um correto diagnóstico específico do processo patológico, tendo o diagnóstico citopatológico demonstrado elevada sensibilidade (89%) e especificidade (100%) na identificação rigorosa de neoplasias. Noutro estudo desenvolvido no ano 2003 por Cohen e seus colaboradores, de um total de 270 amostras submetidas a análise citológica, determinou-se que o exame citológico revelou-se mais efetivo no diagnóstico de doenças neoplásicas e menos fiável em condições de hiperplasia ou displasia, tendo-se estimado uma maior fiabilidade no diagnóstico de lesões com localização cutânea (43%) (Cohen *et al.*, 2003; Peleteiro, 2016).

Por outro lado, um estudo retrospectivo realizado por Ghisleni *et al.*, no ano 2006 procurou avaliar a correlação entre o diagnóstico citológico (por citologia aspirativa) e o histológico de 292 amostras de lesões neoplásicas cutâneas e subcutâneas, em gatos e cães tendo-se constatado que ambos os resultados da citologia e da AH foram concordantes, no que concerne à presença ou ausência de neoplasia subjacente em 91% dos casos (Peleteiro, 2016). Outros estudos mais recentes publicados permitiram enfatizar a importância do valor diagnóstico da citologia comparativamente à histopatologia (Santos *et al.*, 2009; Skeldon, 2009; Ventura *et al.*, 2012; Rosolem *et al.*, 2013; Braz *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2016). Num recente estudo desenvolvido por Borges *et al.* (2016) do total de 262 amostras de lesões palpáveis cutâneas provenientes de 186 animais aferiu-se que do total de análises citológicas efetuadas, 186 foram diagnosticadas como lesões neoplásicas, demonstrando a significativa precisão deste meio de diagnóstico. No que se refere ao valor preditivo da análise citológica, Teske (2008) refere que o valor preditivo positivo da citologia é superior ao seu valor preditivo negativo. De acordo com Nimwegen & Kirpensteijn (2017) todas as massas cutâneas e subcutâneas deveriam ser avaliadas através de PAAF, já que o exame citológico deste tipo de massas possui elevado valor preditivo no diagnóstico de processos neoplásicos, denotando um grau de precisão diagnóstica elevado em relação à AH, possibilitando diferenciar neoplasias de outras lesões em 90% dos casos.

2.5.11.2. Estadiamento clínico das neoplasias cutâneas

O estadiamento clínico das neoplasias cutâneas é um elemento diagnóstico de suma relevância no manejo geral de qualquer caso oncológico, o qual objetiva essencialmente, a determinação da extensão e progressão da doença tumoral, a partir do local primário e avaliar a presença ou ausência de metástases à distância (Moris & Dobson, 2001; Biller *et al.*, 2016; National Cancer Institute, 2017). Desta forma, a sua aplicação na prática clínica permite o estabelecimento de um prognóstico e de um tratamento dirigido ao tipo de tumor envolvido (Moris & Dobson, 2001). Geralmente, o estadiamento de um tumor é efetuado somente, depois de conhecido o comportamento biológico da neoplasia individual e o seu tipo histológico (Grandi & Rondelli, 2016).

2.5.11.2.1. Sistema de estadiamento tumoral de tumores malignos

Em Medicina Veterinária, o estadiamento clínico de neoplasias cutâneas malignas é baseado no **sistema de estadiamento tumoral TNM (Tumor-Node-Metastasis Classification)**, proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o qual apenas se refere aos tumores com origem na epiderme e na derme, à exceção do linfoma, do MTC, dos tumores mamários e do hemangiossarcoma (os quais possuem um sistema de classificação distinto e próprio, devido à importância do seu prognóstico). O princípio subjacente a este sistema tem por base o tamanho e as características do tumor primário, o envolvimento metastático em Lnn. regionais e a existência de metástases à distância (Moris & Dobson, 2001; Batschinsky & Tedardi, 2016; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017) (**Tabela 13**).

A avaliação clínica da doença local inicia-se com um cuidadoso exame físico, a fim de aferir acerca das características gerais do tumor (*i.e.* da sua aparência, do seu tamanho, da sua mobilidade e fixação do tumor primitivo aos tecidos adjacentes). A anamnese efetuada previamente ao exame físico do paciente é de extrema relevância, a qual deverá focar-se nos sinais manifestados pelo animal (que podem revelar existência de problemas de saúde sistémicos agudos ou crónicos), bem como permitir obter informação acerca da duração da lesão, da sua taxa de crescimento, do tipo de crescimento (expansivo ou invasivo), da existência de sinais inflamatórios, de prurido e de alteração na sua aparência ao longo do tempo (Biller *et al.*, 2016; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

É com base nesses achados clínicos, na informação obtida através da anamnese e na prévia análise citológica da lesão que podemos aferir se se trata de uma neoplasia de carácter maligno ou de uma neoplasia benigna, através da avaliação da extensão da lesão, ou seja, se apresenta rápido crescimento, fixação a planos tecidulares mais profundos, ulceração, limites ou margens mal definidos, entre outras características que permitam afirmar a existência de malignidade (Biller *et al.*, 2016). Sabe-se que a localização anatómica do tumor na pele pode ser um indicador prognóstico importante. Não obstante, é conhecido que os tumores cutâneos nos canídeos podem apresentar diferente comportamento biológico, comparativamente aos tumores do mesmo tipo na espécie felina (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Tradicionalmente, a realização de um exame físico minucioso revela-se suficiente para proceder à classificação do estágio T, porém a identificação dos estádios N e M, não é tão linear, pelo que correntemente se procede ao recurso a exames imagiológicos como adjuvantes dos dados clínicos obtidos pela exploração física do animal (*e.g.* radiografia digital, ultrassonografia, ressonância magnética ou TAC), para um estudo mais aprofundado (Biller *et al.*, 2016). Segundo referem Nimwegen & Kirpensteijn (2017) a TAC, comparativamente à radiografia convencional é um dos exames imagiológicos mais sensíveis para avaliar a extensão da lesão, pois permite detetar com maior detalhe a presença de nódulos metastáticos.

Tabela 13| Classificação TNM dos tumores cutâneos (OMS)
(adaptado de Grandi & Rondelli, 2016; Nimwegen & Kirpensteijn, 2017)

Estadio	Descrição
T	Tumor Primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma pré-invasivo (carcinoma <i>in situ</i>)
T1	Tumor com < de 2 cm de diâmetro, superficial ou exofítico
T2	Tumor com diâmetro entre 2-5 cm ou com mínima invasão independente do tamanho
T3	Tumor com > 5 cm de diâmetro ou com invasão da hipoderme, independente do tamanho
T4	Tumor que invade outras estruturas extradérmicas profundas (e.g. fáscia, cartilagem, músculo esquelético ou osso)
N	Lnn. Regionais
Nx	Lnn. não podem ser avaliados
N0	Sem evidência de metástases nos Lnn. regionais
N1	Existência metástases nos Lnn. regionais (Linfonodo. ipsilateral afetado móvel)
N2	Existência metástases nos Lnn. regionais (Linfonodo contralateral ou bilateral afetado móvel)
N3	Existência metástases nos Lnn. regionais (Lnn. fixos)
M	Metástases à distância
Mx	Presença de metástases não pode ser avaliada
M0	Sem evidência de metástases distantes
M1	Presença de metástases distantes

Paralelamente, em Medicina humana têm sido cada vez mais utilizados como preciosos meios auxiliares de diagnóstico, exames de medicina nuclear como a Tomografia por Emissão de Positrões (*Positron Emission Tomography/ Computed Tomography – PET/TC*), que consiste num exame imagiológico em que são usados radiofármacos (como o F-fluorodeoxiglicose - ^{18}F -FDG) e marcadores radioativos (radionuclídeos) em estudos dinâmicos, os quais são administrados endovenosamente no corpo do paciente. Estas moléculas permitem a deteção e localização de reações bioquímicas específicas, que estão relacionadas com determinadas doenças, particularmente, com o desenvolvimento tumoral (Rodrigues, 2015; Douglas *et al.*, 2017). A PET/TC apresenta como principal vantagem, o facto de proporcionar um elevado grau de caracterização bioquímica de todo o organismo, com alta resolução espacial. A sua utilidade diagnóstica em Oncologia Veterinária tem sido reportada em alguns trabalhos científicos (Castiglioni *et al.*, 2016; Borgatti *et al.*, 2017).

Quando é detetada uma neoplasia interna, não raras vezes, é necessário recorrer a este tipo de exames complementares de diagnóstico, para avaliar a extensão local da doença ou para avaliar a possível existência de metástases à distância (Biller *et al.*, 2016; Grandi & Rondelli, 2016). A realização de uma citologia de Lnn. regionais por PAAF deve, sempre que possível, ser realizada para avaliar a presença de doença metastática, após confirmado diagnóstico de neoplasia maligna, já que determinados tipos de tumores tendem a metastizar por via linfática para atingirem um novo local de estabelecimento, tais como os carcinomas (Teske, 2009b; Warland & Dobson, 2011; Selting, 2014). Geralmente, as neoplasias epiteliais apresentam uma tendência em metastizarem por via linfática, enquanto as neoplasias mesenquimatosas se disseminam comumente através de via hematogénica (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Importa sublinhar que se forem diagnosticadas metástases em Lnn. regionais palpáveis, tal é um forte indicador da existência de possíveis metástases sistémicas, pelo que a citologia por PAAF possui um valor preditivo diagnóstico e prognóstico (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

2.6. Outros métodos de diagnóstico complementares à citologia

Embora a citologia seja considerada um exame de diagnóstico idóneo para proceder à diferenciação de diferentes tipos de lesões neoplásicas de lesões inflamatórias, através de avaliação microscópica, face a algumas limitações que apresenta, não raras vezes, surge a necessidade de recorrer a outros métodos de diagnóstico para obtenção de informações mais detalhadas, quanto à estrutura íntima histológica e molecular das células e obter a perceção do grau de invasão tecidular de um processo neoplásico presente. Apresentam-se de seguida algumas técnicas que têm vindo, ao longo dos últimos anos, aprimorar os resultados obtidos a partir de um diagnóstico citopatológico.

2.6.1. A análise histopatológica

Desde sempre que a histologia tem sido geralmente descrita conjuntamente com a histopatologia e, na verdade, estas duas áreas encontram-se intrinsecamente fundidas, já que não é possível avaliar e interpretar um quadro lesional tecidular, sem o prévio conhecimento base da histologia normal (Musumeci, 2014). A AH representa o meio de diagnóstico considerado “*gold standard*”, desde há décadas, sendo utilizada como “*meio de recurso*” a seguir ao diagnóstico citológico de neoplasias cutâneas (Sharkey *et al.*, 2007; Kabuusu *et al.*, 2016). Werner & Werner (2016) aludem que a AH representa uma das únicas técnicas idóneas para proceder ao diagnóstico definitivo de uma neoplasia, através da identificação morfológica e bioquímica dos tecidos em estudo, bem como da arquitetura e arranjo celular que os compõem, por meio de uma observação macroscópica e microscópica dos tecidos. O valor preditivo desta análise encontra-se intrinsecamente associado à vantagem, que este apresenta face à citologia, de permitir avaliar em detalhe a arquitetura tissular, no que se refere às particularidades morfológicas e, por essa razão, os diagnósticos histopatológicos são considerados mais específicos e possibilitam um diagnóstico definitivo (Graça, 2007). Gama & Alves (2016) referem que a AH, essencialmente: “(...) *tem como principais objetivos o diagnóstico de processos neoplásicos e inflamatórios*”. Não será alheio a este facto que a histopatologia constitui uma ferramenta bastante versátil no diagnóstico de lesões obtidas a partir de biópsia, permitindo a determinação do grau histológico de neoplasias cutâneas, como é o caso dos sarcomas e dos MTC (Gama & Alves, 2016). De acordo com Liptak (2009), os resultados de uma AH deverão permitir ao patologista conseguir determinar os seguintes aspetos: o tipo tumoral envolvido; o comportamento biológico do tumor; o nível preciso de invasão/agressividade tecidular para se decidir sobre a resseção cirúrgica; avaliar a necessidade de instituir uma terapia coadjuvante,

bem como aferir acerca do prognóstico do processo a decorrer, já que a biópsia tem um valor preditivo no prognóstico do tipo de neoplasia.

No **quadro 14** apresentam-se os principais aspetos histológicos e celulares que são habitualmente avaliados microscopicamente por exame histopatológico. Conforme Alves (2002), as técnicas histológicas que são rotineiramente utilizadas para posterior, observação microscópica de amostras de tecidos ou órgãos fixados, provenientes de animais, são baseadas nos métodos convencionalmente aplicados no diagnóstico laboratorial em Patologia humana.

Quadro 14 | Aspetos histológicos avaliados por análise histopatológica
(adaptado de Pires et al., 2004)

- **Grau de diferenciação tumoral**
*Tumores diferenciados ou indiferenciados (anaplásicos)
- **Organização das células tumorais**
- **Comportamento biológico e tipo de crescimento**
*Crescimento expansivo ou infiltrativo
- **Grau de invasão tecidular**
- **Determinação dos limites do tumor**
*Tumores limitados (capsulados) ou não limitados
- **Avaliação da presença de vascularização e do estroma**

Após a preparação inicial de uma amostra de tecido biológico e posterior processamento faseado (que inclui a fixação dos tecidos com formol/formalina a 10%, a desidratação, a diafinização ou a inclusão em parafina e o corte por micrótomo), os cortes histológicos

obtidos são corados, utilizando a coloração com Hematoxilina (corante básico) e Eosina (corante ácido) – (HE), que continua a ser usada como o método de coloração de rotina para coloração de tecidos em histologia e histopatologia (Pires et al., 2004; Werner & Werner, 2016). Deste modo, Gama & Alves (2016) reforçam que a avaliação histopatológica como meio auxiliar no diagnóstico de uma neoplasia cutânea deverá reunir um conjunto de parâmetros informativos que foram alvo de análise:

- Tamanho do tumor (confirmação de tamanho macroscópico);
- Avaliação das margens cirúrgicas;
- Grau histológico e tipo de tumor classificado;
- Existência de invasão dos tecidos circunvizinhos;
- Avaliação do *status* nodal (ou seja, caso a biópsia enviada para análise seja acompanhada de linfonodo regional extirpado para análise).

Ayele et al. (2017) advogam que em relação à citologia, a histopatologia permite uma diferenciação mais rica dos tumores, possibilitando quase sempre identificar o tecido de origem e aferir quanto ao grau de diferenciação tecidular. Ao contrário do que se verifica na análise citológica, o exame histopatológico possibilita a obtenção de máximas informações clínicas quanto ao grau de invasibilidade tumoral, proporcionando uma exploração íntima dos padrões histológicos observados a partir de um corte histológico da lesão-alvo, o que permite aferir com maior grau de confiança, o grau de malignidade ou benignidade da lesão. Contudo, segundo afirmam Morrison & DeNicola (1993) conjuntamente, a *“histopatologia e a citologia são ferramentas de diagnóstico valiosas”*.

2.6.2. O Citobloco (CB)

O CB representa uma técnica com reconhecida aplicação no domínio do diagnóstico citopatológico em Medicina humana, já há longos anos, porém a utilização de CB de agarose em Medicina Veterinária permanece pouco explorada até a o momento (Zanoni *et al.*, 2013). O CB foi descrito pela primeira vez, em 1896 (Zanoni, 2012a; Jain *et al.*, 2014), tendo sido criado com o intuito de permitir transpor algumas limitações inerentes à utilização da citologia convencional no diagnóstico de determinados tipos tumorais, estando destinado a maximizar a informação alcançada através de uma pequena amostra citológica (Zanoni 2012a, Marcos, 2013).

É particularmente útil para a classificação de tumores quanto à sua organização celular e características citomorfológicas, que não é exequível através de esfregaços citológicos (Nathan *et al.*, 2000). É especialmente rentável a utilização do CB em casos de lesões que apresentem uma quantidade de líquido variável e cuja citologia aspirativa poderia conduzir ao surgimento de uma preparação citológica escassamente representativa, associada a particularidades anatómicas ou lesionais, gerando dificuldades no processamento posterior do espécime obtido (Peleteiro, 2011; Zanoni *et al.*, 2013). O CB pode ser largamente aplicado na prática diária em citopatologia, particularmente quando se está perante uma amostra citológica que se apresenta com baixa celularidade (Peleteiro, 2011). Pode ser utilizado em amostras provenientes de efusões cavitárias, lavados, conteúdo quístico, bem como de material colhido por PAAF. O processamento de CB constitui um elemento funcional em citopatologia laboratorial ao providenciar a obtenção de material celular fixado com formalina e impregnado em parafina, passível de ser usado para a uma variedade de estudos adjuvantes da citologia, como em técnicas histoquímicas complementares: em ICQ, em IHQ (para fenotipagem dos tipos celulares presentes), bem como em análises moleculares (Herbert, 2014; Jain *et al.*, 2014).

É possível, através do CB, proceder à fixação (com *e.g.* etanol a 70%) da amostra colhida, seguida da concentração por centrifugação das células nela contidas, utilizando posteriormente o condensado celular obtido que será convertido a um fragmento tecidual sólido, depois de embebido em gel de agarose líquida a 2% e submetida a nova centrifugação. O resultado final obtido é um bloco de agarose que será incluído em parafina (à semelhança do que é efetuado no processamento convencional para análise histológica), sendo posteriormente processado para análise citopatológica (Peleteiro, 2011; Zanoni, 2012, 2013) (**Figura 50**).

No campo da Medicina Humana as técnicas de CB têm sofrido um notório progresso, tendo sido desenvolvidos sistemas automatizados que permitem a formação de CB de parafina diretamente a partir de fluídos, como é o caso do descrito Cellient™ Automated Cell block (Wagner *et al.*, 2010; Marcos, 2013). Outros métodos já foram relatados incluindo técnicas que usam distintos géis (*e.g.* gelatina, agar comercial ou albumina), tais como, o método HistoGel™, o método colloidion bag, bem como o método plasma-trombina (Marcos, 2013; Jain *et al.*, 2014; Santos, 2016).

O uso do CB complementarmente às preparações citológicas rotineiras tem sido reportado



Figura 50| Representação esquemática das etapas do método agar para preparação de CB a partir de amostra de efusão (adaptado de Jain *et al.*, 2014).

em alguns estudos como um meio bastante proficiente aumentando o rigor do diagnóstico da citologia por PAAF em 12 a 15%, incrementando a representatividade da amostra e elevando a sensibilidade diagnóstica da análise citológica (Marcos, 2013; Zanoni *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2014).

Ainda que a literatura faça menção a escassos estudos acerca da aplicabilidade diagnóstica do CB no diagnóstico oncológico veterinário, Zanoni *et al.* (2013) desenvolveram um estudo que objetivava avaliar a utilidade diagnóstica do CB de agarose, como um meio complementar no diagnóstico citopatológico de tumores mamários em canídeos.

Estes autores relataram que, quando combinados, os métodos de CB e preparações citológicas, permitiram obter melhores resultados quanto ao diagnóstico definitivo, tendo sido alcançada uma sensibilidade de 97,7%, aumentando a correlação cito-histológica. Masserdotti (2006) frisa que as particularidades que o CB proporciona são especialmente relevantes na determinação da histogénese de tumores mesenquimais e glandulares, pelo que a sua aplicabilidade diagnóstica em Medicina Veterinária como complemento à citologia tem-se demonstrado também, um forte adjuvante à AH, nomeadamente no reconhecimento íntimo de alguns tumores cutâneos (e.g. neoplasias mamárias).

No **quadro 15**, apresentam-se as principais vantagens e limitações do método do CB no diagnóstico citopatológico.

Quadro 15| Principais vantagens e limitações diagnósticas do método de citobloco em citologia (adaptado de Masserdotti, 2006; Peleteiro, 2011; Zaroni, 2012; Jain et al., 2014)

Vantagens

- Simplicidade de execução (pode ser processado como qualquer bloco de tecido uma vez preparado);
- Utiliza material laboratorial de rotina;
- Otimização da amostra citológica;
- Comparativamente à citologia, o CB permite a manutenção da arquitetura celular preservando os padrões de arranjo celular e evidencia com maior exatidão as relações entre as diferentes populações celulares, contribuindo para uma representação geral do tecido a partir de agregados celulares presentes na amostra;
- Possibilita um arquivo da amostra viável, por tempo indeterminado para futuros exames complementares (e.g. IHQ, testes de biologia molecular, etc.);
- Material biológico da amostra não é desperdiçado durante o processamento devido a maior representatividade da amostra, o que permite aprimorar a capacidade de diagnóstico.

Limitações

- Não permite a rápida emissão de um diagnóstico tal como na análise citológica;
- Existe risco de perda de material citológico durante o processamento dos tecidos ou corte, devido ao reduzido volume da amostra;
- Nem todas as amostras biológicas são suscetíveis de serem submetidas a processamento para CB;
- Um volume significativo de preparações de CB, não possui celularidade tumoral suficiente para realização de futuros testes auxiliares;
- Associada a um maior custo em relação à citologia convencional.

2.6.3. A imunocitoquímica (ICQ) e a imunohistoquímica (IHQ)

A ICQ e a IHI constituem duas técnicas de extrema relevância no diagnóstico citopatológico que se baseiam em métodos citoquímicos e imuno-histoquímicos que permitem o estudo da localização de determinados compostos químicos dentro e fora das células, através de técnicas de preparação histológica, que possibilitam a sua identificação e observação por microscopia ótica ou eletrónica (Mescher, 2013). Possibilitam o estudo mais aprofundado dos processos biopatológicos que estão subjacentes a uma neoplasia, possibilitando a análise das células e tecidos de um modo mais detalhado, do que através da análise citológica convencional (Koss, 2005; Ferro, 2013). Estas técnicas baseiam-se na utilização de um Ac específico para proceder à identificação de determinados Ag tumorais, por meio de uma reação Ag-Ac. Contudo, estas podem também ser aplicadas para a exposição de outras substâncias ou estruturas celulares específicas (e.g. proteínas, enzimas, iões, ácidos nucleicos, entre outros compostos químicos) (Mescher, 2013).

Tanto a ICQ como a IHQ, possibilitam o estudo mais aprofundado dos processos biopatológicos que estão subjacentes a uma neoplasia, possibilitando a análise das células e tecidos de um modo mais detalhado, do que através da análise citológica convencional (Koss, 2005; Ferro, 2013). Para que cada uma destas técnicas aplicadas seja um êxito é fundamental que o método usado seja específico para a substância ou componente químico a ser analisado, de modo a que a interpretação dos resultados não seja errada; a distribuição química deverá ser preservada, *i.e.*, a substância não se deverá difundir da sua localização original; a preservação da composição química (reatividade de grupos químicos) deverá ser assegurada e para além disso, o produto de reação deverá ser colorido e eletrodensso, para que possa ser identificado e observado por microscopia (caraterística de detetabilidade).

A **ICQ** possui variadas aplicações em Citopatologia, tendo particular interesse no diagnóstico diferencial e identificação de neoplasias (Ferro, 2013), sendo também utilizada para auxílio na avaliação sugestiva do prognóstico de tumores, constituindo um elemento indicador com valor preditivo, quanto à terapêutica a instituir. Ferro (2013) refere que a ICQ consiste num conjunto de “(...) metodologias que usam imunoensaios para co-localizar um epítipo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas (e.g. cytospin™) ou preparações em monocamada (e.g. ThinPrep®)”. A sua aplicação pode abranger amostras resultantes de técnicas citológicas esfoliativas ou aspirativas por PAAF (Koss, 2005). Gartner & Hiatt (2012) referem que a ICQ é passível de ser empregue recorrendo a microscopia eletrónica, embora seja necessário usar um metal pesado (e.g. ferritina), em vez de um marcador de fluorescência ou enzimático.

A **IHQ** é uma técnica que assenta basicamente, na utilização de Ac primários que conseguem reconhecer determinados Ag *in situ* num determinado tecido-alvo, os quais integram a composição íntima de um tumor, permitindo a sua localização e marcação local, em cortes histológicos previamente processados (fixados em formalina e incluídos em parafina) ou em amostras submetidas a congelação (Ferro, 2013; Amorim *et al.*, 2016). O reconhecimento de um Ag específico pode ser feito por dois métodos: (i) método direto - em que um Ac primário é marcado diretamente por uma enzima ou substância fluorescente ou (ii) método indireto - é o método imuno-histoquímico mais frequentemente usado, em que o Ac primário funciona como um Ag para um Ac secundário utilizado, originário de outro animal. Geralmente utiliza-se como marcador a enzima peroxidase e a diaminobenzidina como cromogénio. Desta reação química forma-se um produto precipitado insolúvel que produz uma coloração acastanhada no local do tecido marcado (Capela e Silva, 2008; Gartner & Hiatt, 2012). Posteriormente ao método imuno-histoquímico, os cortes tecidulares da lesão podem ser novamente corados, mas com hematoxilina ou verde-luz, sendo efetuada a preparação e posterior, montagem em lâmina para observação microscópica (Capela e Silva, 2008). Estes compostos marcados podem ser identificados através de observação por microscopia ótica ou, como referido, por microscopia eletrónica, como também por microscopia confocal de fluorescência, a qual possibilita a visualização nítida da morfologia celular (Musumeci, 2015). Por possuírem grande valor no diagnóstico anatomopatológico, ao permitirem avaliar o *status* de preservação dos Ag de um tecido específico e a sua expressão numa dada localização das células (membranar, nuclear ou citoplasmática), os métodos imunohistoquímicos têm sofrido uma contínua evolução e adquirido maior ênfase por parte dos investigadores nos últimos anos, nomeadamente no campo da Oncologia Veterinária (Gartner & Hiatt, 2012; Musumeci, 2015).

Parte 3. A propósito de um estudo de caso: Abordagem diagnóstica

3.1. RELATO DE CASO CLÍNICO: Cistoadenoma das glândulas apócrinas

Relata-se um caso de um canídeo macho (não castrado), de nove anos de idade, de raça Rottweiler, vacinado, desparasitado, *indoor*, que se apresentou a consulta no HVPT, no dia 23 de Janeiro de 2017, por apresentar uma massa cutânea solitária na região cervical dorsal.

I. História clínica, sinais clínicos e exames complementares de diagnóstico

O tutor do animal descreveu tratar-se de uma lesão não muito recente (não sabendo precisar o momento do seu aparecimento) e verificou um aumento do tamanho da massa, no último mês (depreendendo-se que se trata de um processo em desenvolvimento arrastado no tempo). O paciente não denotava a presença de mais nenhuma lesão cutânea observável à vista desarmada, nem sinais clínicos locais exuberantes (e.g. ulceração cutânea ou dor localizada). Todavia, manifestava prurido e a lesão apresentava-se ligeiramente eritematosa. Ao exame físico não foram detetadas alterações consideráveis do estado geral de saúde, não apresentando linfadenomegália generalizada, porém o animal apresentava-se letárgico e com perda de condição corporal. Foram efetuadas análises sanguíneas (hemograma completo, perfil bioquímico sérico geral – GLI, CREA, URE, PT, FA, ALT e ALB), bem como urianálise do tipo I e tipo II, cujos achados clínicos revelaram presença de anemia regenerativa, ligeira azotémia e um aumento das enzimas hepáticas ALT e FA. Realizou-se também um esfregaço sanguíneo, o qual revelou a existência de pleomorfismo, anisocitose (variação no tamanho dos eritrócitos - esferócitos) e hipocromasia, assim como a presença de hemoplasmas do género *Mycoplasma* spp., cujo diagnóstico de micoplasmose foi confirmado por PCR. Foram também avaliadas as mensurações séricas das hormonas endógenas tT4 e TSH, tendo-se observado que o animal se apresentava normotiroideu (*i.e.* as hormonas da tiróide encontravam-se dentro dos limites normais referenciados para a espécie canina).

II. Exame macroscópico da lesão

A lesão exibida pelo paciente tinha aspeto nodular com tamanho semelhante a uma tangerina, compatível com uma neoplasia em curso, apresentando-se como uma massa exofítica (encontrando-se à superfície dos tecidos), móvel, de consistência mole, similar a um quisto. Superficialmente, denotava ligeira alopecia.

III. Abordagem diagnóstica

Tendo por base que a lesão cutânea superficial que o canídeo denotava, era facilmente identificável e palpável exteriormente, tratando-se de um nódulo cutâneo (lesão cutânea primária) de origem desconhecida, a primeira abordagem diagnóstica seria a realização de um

exame citológico de uma amostra representativa da lesão, colhida por PAAF (método particularmente preconizado nos casos de lesões cutâneas nodulares palpáveis exteriormente, de consistência branda, permitindo aspirar possível conteúdo líquido presente no interior de estruturas quísticas existentes). Por se tratar de uma massa com tamanho significativo, está indicada a execução da aspiração em mais de um local (separadamente, selecionando localizações distintas para proceder à colheita das amostras e efetuar vários esfregaços) (Peleteiro & Rodrigues, 1991). Dadas as manifestações clínicas e aspeto macroscópico da lesão foram efetuados outros exames dermatológicos complementares de diagnóstico (de segunda linha), tais como a raspagem cutânea profunda (cujo resultado foi negativo para ácaros do género *Demodex* spp.) e um teste de fita-cola (citologia por aposição), o qual revelou a presença de múltiplos cocos, porém foi negativo para presença de microrganismos do género *Malassezia* spp. Não foi realizado teste DTM para identificação de dermatófitos.

Posto isto, o exame dermatológico de primeira linha que foi realizado foi a PAAF cutânea da massa, sendo efetuadas posteriormente, três preparações citológicas a partir da amostra colhida da lesão, cujo resultado do exame citológico é mostrado de seguida.

IV. Exame microscópico – Citologia cutânea

Seguiu-se o exame microscópico dos espécimes obtidos corados no laboratório do HVPT, pelo método de coloração DQ, por forma a conseguirmos observar as características morfológicas da população celular presente na amostra. Observou-se na amostra colhida, presença de alguns macrófagos com quantidade variável de pequenos vacúolos lipídicos (macrófagos espumosos) e muitos neutrófilos não degenerados, de contorno arredondado, bem como de um **infiltrado piogranulomatoso**, com células gigantes (**Figura 51**). Este infiltrado corresponde a uma acumulação anómala de células (maioritariamente polimorfonucleares – neutrófilos) no tecido cutâneo acometido, o qual pode surgir como resposta à presença de pêlos que estejam em contato com a derme, a queratina ou a corpos estranhos não infetados (Peleteiro, 2011; Marcos *et al.*, 2011). Não foram encontradas células atípicas, nem figuras de mitose. A evidenciação de macrófagos espumosos num aspirado de uma lesão cutânea de carácter inflamatório granulomatoso é muito comum em processos patológicos arrastados no tempo. Segundo Marcos *et al.* (2011) a existência de células inflamatórias em processos de natureza neoplásica é não raras vezes comum e nalgumas vezes, o número de células inflamatórias observadas sobrepõe-se ao número de células neoplásicas presentes, contribuindo esta heterogeneidade celular para uma interpretação diagnóstica mais complexa.

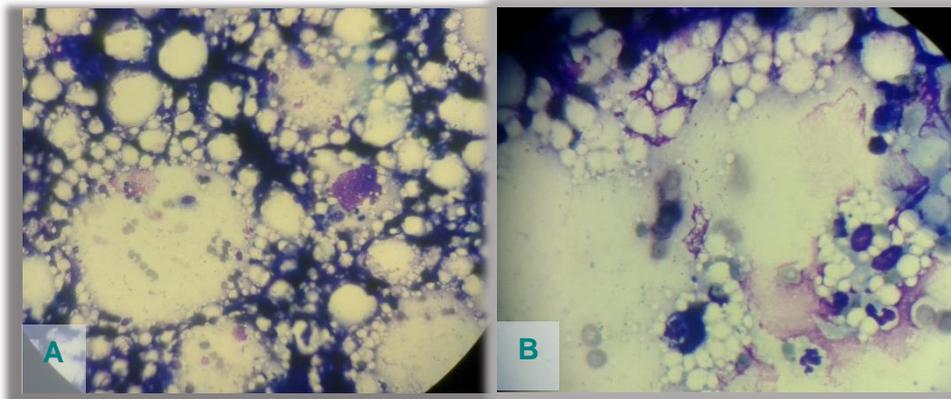


Figura 51 | Imagens citológicas da lesão obtidas por PAAF: (A) evidência de escassa celularidade denotando pleomorfismo e de múltiplos vacúolos com aspeto lipídico (coloração branca) e (B) notar a presença de células polimorfonucleares (neutrófilos) no canto inferior direito; DQ, x1000 (Fotomicrografia original, HVPT).

➤ Diagnóstico citopatológico:

A observação detalhada das três preparações citológicas sugere não se tratar de um processo tumoral maligno, face ao tipo de celularidade presente. Porém, sugere, desde logo, a possível existência de uma reação piogranulomatosa, ainda que, em primeira análise, o diagnóstico seja dúbio, já que não se sabe exatamente a origem histológica da massa. De entre os principais diagnósticos diferenciais possíveis que foram considerados atendendo aos dados facultados pela citologia foram: (i) inflamação cutânea de etiologia não infecciosa (e.g. paniculite); (ii) cistoadenoma apócrino (CGA); (iii) adenoma ductal apócrino (ADA); (iv) quisto cutâneo e (v) epitelioma sebáceo (EP).

DECISÃO CLÍNICA

→ Com base nos achados citológicos e nas características da lesão nodular decidiu-se realizar exérese total da massa (biópsia excisional intraoperatória) sob sedação, no dia 25 de Janeiro de 2017 e procedeu-se também, à execução de uma **citologia por aposição** a partir do retalho cutâneo excisado, para posterior avaliação microscópica da morfologia celular e comparação com os achados citológicos obtidos a partir da amostra colhida por PAAF.

→ A peça cirúrgica conservada em formalina a 10% foi posteriormente, enviada num contentor hermeticamente fechado, para exame histopatológico a realizar em laboratório externo.

V. Exame histopatológico

→ A peça cirúrgica excisada da região cervical dorsal do canídeo no HVPT foi enviada ao laboratório DNAtch (**Figura 51**), onde foi efetuada uma análise macroscópica e microscópica da lesão por um Patologista especializado, que remeteu o relatório histopatológico para o HVPT.



Figura 52| Peça cirúrgica extirpada conservada em formalina
(Cortesia de HVPT).

→ Descrição macroscópica da lesão

De acordo com os dados referidos no relatório histopatológico efetuado e recebido dia 26 de Janeiro de 2017, as características macroscópicas observadas da porção da massa cutânea (com 9x6x5 cm – margens do corte) recebida para AH correspondiam a uma **estrutura multinodular**, de **limites mal definidos** e **áreas poliquísticas** de **conteúdo castanho gelatinoso**, que media 6x4 cm e distava 2 cm da margem lateral observada e 1 cm da margem profunda do retalho cutâneo observado.

→ Descrição microscópica da lesão

Ao exame microscópico observou-se a proliferação de células epiteliais glandulares dispostas em quistos. As células possuíam aspeto cubóide, com citoplasma acidófilo e um núcleo redondo com a cromatina grumosa. **Não foram identificadas mitoses**. No estroma identificaram-se vários infiltrados inflamatórios piogranulomatosos, ricos em neutrófilos e macrófagos com pigmento ceróide (ou seja, pigmento que se encontra no interior de células macrofágicas como resultado de fagocitose de lípidos insaturados) (Pires *et al.*, 2004).

➤ **Diagnóstico histopatológico:** Da análise histopatológica realizada concluiu-se que o retalho cutâneo analisado apresentava ao nível da derme e tecido subcutâneo, uma neoplasia poliquística não capsulada e mal demarcada, tendo sido estabelecido como **diagnóstico definitivo: cistoadenoma das glândulas apócrinas (CGA) com dermatite piogranulomatosa exuberante**.

3.2. Discussão e considerações finais

Em primeiro lugar, deverá ser mencionado que a eleição do caso clínico aqui relatado, prendeu-se essencialmente com o facto de a autora considerar que não tem sido dada a relevância diagnóstica merecida às neoplasias com localização nas glândulas anexas à pele, talvez por se apresentarem com menor prevalência, em relação a outros tipos de neoplasmas cutâneos (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017). Por outro lado, esta escolha deveu-se ao desafio que apresenta a diferenciação citológica, entre este tipo de neoplasias glandulares e outros tipos de lesões cutâneas nodulares não neoplásicas e lesões não inflamatórias, conduzindo a maior dificuldade diagnóstica para um citopatologista menos experiente.

O presente caso pretende alertar para uma afeção tumoral pouco frequente nas consultas de medicina interna de pequenos animais (Raskin, 2010) e para a abordagem

diagnóstica a adotar de modo sistemático, a fim de descartar possíveis diagnósticos diferenciais de CGA, destacando a relevância de outros exames complementares de diagnóstico adjuvantes da citologia. O relato apresentado refere-se a um paciente canino, de idade avançada, ostentando uma lesão cutânea de origem desconhecida e de evolução progressiva. A citologia aspirativa da massa cutânea observada foi o primeiro exame complementar de diagnóstico efetuado, o qual foi motivado pela natureza da lesão e por permitir uma avaliação microscópica célere, das características que as populações celulares presentes na amostra da lesão podem exibir, permitindo-nos assim, estabelecer um diagnóstico presuntivo no próprio dia da realização do exame. Acresce o facto desta análise citológica nos possibilitar descartar algumas hipóteses de diagnóstico e colocar em primeiro plano, outros diagnósticos diferenciais mais prováveis.

O exame citológico da amostra recolhida evidenciou a existência de um infiltrado piogranulomatoso não séptico, com escassa celularidade presente na amostra, denotando células gigantes com pleomorfismo, revelando a presença de macrófagos, múltiplos vacúolos com aspeto lipídico de coloração branca, bem como a presença de células polimorfonucleares (neutrófilos). Tendo em consideração as características e o tipo de população celular presente, consideraram-se como principais diagnósticos diferenciais, a existência de uma inflamação cutânea de etiologia não infecciosa (e.g. paniculite); cistoadenoma apócrino (CGA); adenoma ductal apócrino; quisto cutâneo e epiteloma sebáceo.

A consideração de se tratar de uma possível inflamação ao nível do pânículo cutâneo (*i.e.* paniculite) esteve relacionada em primeiro lugar, com a localização da lesão, já que a região cervical é um local habitual de administração subcutânea de fármacos/vacinas, podendo assim ter etiologia traumática. Para além disso, microscopicamente traduz-se pela presença de raros neutrófilos, de macrófagos com quantidade variável de pequenos vacúolos lipídicos, de perfil arredondado, achados estes que condizem com os obtidos na prática (Marcos *et al.*, 2011).

Os achados citológicos observados neste caso particular, ainda que não tenham revelado na sua totalidade concordância com os achados histopatológicos da lesão cutânea biopsiada, dada a escassa celularidade exibida na amostra da lesão, permitiram evidenciar aspetos celulares muito similares aos que os CGA exibem, bem como se revelaram sugestivos da existência de uma inflamação piogranulomatosa associada. Os CGA são um tipo de adenomas apócrinos que evidenciam diferenciação do epitélio secretor apócrino, localizando-se dentro da derme e do tecido subcutâneo (Goldschmidt & Goldschmidt, 2017), sendo menos frequentes comparativamente com os ADA, que macroscopicamente denotam uma aparência nodular similar a um quisto apócrino, sendo comum apresentarem-se como massas isoladas, bem circunscritas e que microscopicamente relevam maior riqueza celular do que os CGA (Raskin, 2010; Marcos *et al.*, 2011; Ruano, 2015).

Porém, estas neoplasias, ao corte histológico, geralmente apresentam uma fina serosidade clara, com pobre celularidade, que pode ser evidenciada no interior de cavidades quísticas separadas por um fino septo interlobular de tecido conjuntivo. As cavidades quísticas dos adenomas quísticos assemelham-se às evidenciadas em preparações citológicas de lesões

quísticas mamárias, constituídas por células colunares ou cuboidais, que podem conter secreção granular e denotar mineralização distrófica (Raskin, 2010; Marcos *et al.*, 2011). Por seu turno, microscopicamente, os aspirados obtidos de CGA apresentam escassa celularidade ou mesmo acelularidade, pelo que o diagnóstico diferencial com quistos apócrinos geralmente, não é possível somente por citologia (Marcos *et al.*, 2011). As células secretoras observadas na presença de um CGA, possuem um núcleo basofílico localizado e abundante citoplasma eosinofílico (Goldschmidt & Goldschmidt, 2017).

De salientar, que também se colocou a hipótese de se tratar de um quisto cutâneo de origem glandular, que poderia ter resultado como consequência de um bloqueio nos ductos secretores e que pudesse ter levado a uma distensão das gls. apócrinas e dos ácinos locais, já que os achados do aspirado neste tipo de lesão, revelam geralmente acelularidade, denotando presença de células glandulares vacuolizadas e de perfil arredondado (Marcos *et al.*, 2011). Pelo que, verificámos existiram alguns achados concordantes com este possível diagnóstico.

A suspeita da existência de um EP foi motivada pela observação microscópica de achados celulares compatíveis com as características desta neoplasia, denotando presença de células de perfil basalóide com citoplasma intensamente basófilo e verificando-se a existência de células semelhantes a sebócitos bem diferenciados (Marcos *et al.*, 2011).

Poderia ainda ter-se considerado um diagnóstico de exclusão, como a presença de hiperplasia quística das gls. apócrinas, que embora seja considerada uma afeção cutânea rara em cães, é de índole não neoplásica e consiste na formação de quistos ao nível das gls. sudoríparas, que se apresentam dilatadas (Gruchouskei *et al.*, 2017). Estes, macroscopicamente, podem apresentar-se como nódulos solitários, com localização preferencial na cabeça e ao nível do pescoço, cujos aspirados são secreções fluídas e translúcidas provenientes dos seus quistos (Gross *et al.* 2005), diferentes do aspirado castanho viscoso (gelatinoso) recolhido no caso reportado. Ginn *et al.* (2007) referem que na espécie canina este tipo de afeção é mais frequente em animais de meia-idade, dado este que, aliado à localização típica da lesão e às suas características macroscópicas corrobora a contemplação deste diagnóstico diferencial, na lista de um potencial diagnóstico citopatológico.

Pelo facto de existir uma panóplia de diagnósticos presuntivos em hipótese decidiu-se efetuar uma biópsia da massa. Neste tipo de casos de índole oncológica, com origem cutânea ou subcutânea está aconselhada uma abordagem cirúrgica como metodologia terapêutica, ou seja, o ideal é proceder à excisão completa da massa e não marginal, já que o grau de malignidade e de invasão tecidual somente poderá ser determinado posteriormente, por exame histopatológico.

Caso tal se revele positivo (*i.e.* com caráter maligno), poderá correr-se o risco de não ter removido todos os planos tecidulares envolvidos e deixar células neoplásicas locais, que pode resultar numa elevada reincidência (Nimwegen & Kirpensteijn, 2017).

Mesmo não tendo sido detetadas evidências de características celulares de malignidade na análise citológica, após excisada, a lesão deverá prosseguir para histopatologia (sempre que possível), a fim de confirmar as iniciais suspeitas de benignidade ou malignidade.

O diagnóstico definitivo da lesão neste caso foi concluído através de exame histopatológico, já que se preconiza o recurso a análise histopatológica sempre que a citologia não se mostre elucidativa do tipo de processo lesional em curso (Henry & Higginbotham, 2010; Raskin, 2010). Deste modo, se depreendeu que se tratava de uma neoplasia glandular benigna, sem risco de metastização à distância e cuja abordagem cirúrgica se mostrou efetiva para um prognóstico bastante favorável para o paciente.

Importa referir que após se ter realizado a PAAF cutânea da massa, foi efetuado um estudo radiográfico ao tórax usando duas projeções ortogonais e uma ecografia abdominal, tal como se preconiza neste tipo de caso, a fim de determinar a extensão da doença e avaliar possível metastização pulmonar e à distância, já que não sabíamos a natureza do tumor presente. Estes exames imagiológicos não revelaram quaisquer lesões detetáveis.

Concluimos que no caso clínico apresentado se constatou que, a raça do animal em estudo não se encontra no conjunto das raças mais predispostas a evidenciar cistoadenoma das glândulas apócrinas (Raskin, 2010). No entanto, o facto de se tratar de um animal de meia-idade e do tipo de lesão cutânea presente sugerir um processo neoplásico em curso, levou à suspeita e a investigar cuidadosamente esta hipótese quer durante o exame físico do animal, quer através de meios auxiliares de diagnósticos implementados.

O aparecimento de neoplasmas espontâneos na pele de animais geriátricos tem-se revelado comum, pelo que a faixa etária em que o paciente se encontrava constituía um fator de risco importante para o desenvolvimento tumoral (Martínez de Merlo *et al.*, 2015).

Goldschmidt & Goldschmidt (2017) referem que não é reconhecida predisposição sexual para o surgimento de CGA e que o pico de incidência do seu aparecimento em canídeos ocorre entre os oito e os 12 anos de idade, pelo que a faixa etária do animal acompanhado se encontrava dentro do intervalo descrito. Outro dado importante a realçar que corrobora o diagnóstico definitivo de CGA neste paciente, é o facto da localização do neoplasma neste canídeo se apresentar ao nível da região cervical dorsal, cujo surgimento tem sido descrito frequentemente no pescoço, na cabeça e nos membros posteriores (Henry & Higginbotham, 2010; Ruano, 2015; Goldschmidt & Goldschmidt, 2017).

Em virtude das limitações financeiras do tutor do animal, não se considerou a hipótese de realização de outros métodos auxiliares de diagnóstico oncológico mais específicos, nomeadamente a IHQ (coadjuvante da AH) e a TAC. A resolução cirúrgica mostrou-se eficaz, porém o animal continuará a ser seguido no HVPT, para averiguar possíveis recidivas.

O estudo de caso relatado direciona-nos para a necessidade da aplicação da citologia aspirativa como ferramenta diagnóstica primária, sempre que o exame físico isolado não nos permita conhecer o tipo de massa cutânea (Teske, 2008), o que é particularmente determinante na identificação de um processo neoplásico. A análise citológica oncológica constitui um meio

complementar de diagnóstico rápido, facilmente exequível, associado a baixo custo, minimamente invasivo constituindo uma modalidade diagnóstica com aplicação prática quer em Medicina humana como em Medicina Veterinária (Sharkey *et al.*, 2014b), que quando aplicada ao diagnóstico de lesões cutâneas e subcutâneas permite fundamentalmente, uma precisa diferenciação entre um processo lesional de cariz inflamatório, de um processo de índole neoplásica, não substituindo o valor diagnóstico proporcionado pela análise histopatológica (Ayele *et al.*, 2017). Mesmo que nem sempre consigamos alcançar um diagnóstico definitivo através da avaliação citológica *per se*, tal permitir-nos-á definir quais os melhores testes de diagnóstico secundários a eleger (Garret, 2010). Uma das grandes vantagens que a citologia aspirativa veio proporcionar em contraste com a citologia esfoliativa, é o fornecimento de células dispostas mais profundamente nos tecidos lesionados, permitindo obter amostras com células menos superficiais e recolher conteúdo de lesões nodulares com aspeto quístico, o que indubitavelmente, veicula poderosas informações celulares para explorar com mais detalhe a amostra recebida.

O diagnóstico citológico de afeções neoplásicas é desafiante e não raras vezes, depende da experiência do Patologista Veterinário e das técnicas de colheita e processamento das amostras recolhidas no paciente. Deveremos também, referir que o sucesso de um diagnóstico citológico se deve muito em parte ao aperfeiçoamento da técnica de colheita praticada para obter o material biológico, refletindo-se determinantemente nos resultados atingidos, pois o que se pretende em primeira instância é obter uma boa amostra, com o máximo de celularidade possível. Tal evidência sugere uma contínua aplicação prática dos conhecimentos inerentes à citologia e uma correta realização de técnicas citológicas de modo a alcançarmos um diagnóstico confiável e válido em termos clínicos. Para além disso, este caso clínico permite-nos refletir sobre diferentes exames complementares de diagnóstico que podem constituir importantes aliados à citologia, nomeadamente o estudo imagiológico prévio à análise histopatológica.

Conclusão

Nesta última fase do mestrado pretendeu-se que o estágio curricular permitisse à autora a consolidação do conhecimento que foi adquirido ao longo de todo o período académico, possibilitando desenvolver o raciocínio clínico e aprender a interiorizar a relevância da eficaz comunicação intra-profissional entre clínicos internos e técnicos laboratoriais, através de um sólido trabalho em equipa. Uma constante troca de informação clínica é crucial para o fornecimento posterior de um diagnóstico credível e conclusivo. Deste modo, a aluna estagiária beneficiou de uma introdução ao exercício prático da sua futura profissão, proporcionando uma visão mais aproximada ao contexto laboral na área da Medicina Veterinária, aplicada em ambiente hospitalar, o que se revelou bastante enriquecedor, permitindo aferir quanto às áreas no contexto do diagnóstico laboratorial, que suscitaram maior interesse. Os objetivos principais delineados para um estágio de índole laboratorial foram alcançados com sucesso.

A Dermatologia foi uma das especialidades médicas mais acompanhadas durante o estágio, pelo que os testes dermatológicos e análises citológicas cutâneas apresentaram elevada representatividade face a outros exames complementares de diagnóstico laboratorial realizados. O estudo estatístico relativo às neoplasias cutâneas e subcutâneas diagnosticadas por citologia no período de estágio no HVPT, revelou que as neoplasias das células redondas foram o tipo tumoral mais diagnosticado na espécie canina, seguidas de outras lesões não neoplásicas. As neoplasias das glândulas anexas evidenciaram elevada representatividade também na espécie canina. A escolha do tema da monografia foi motivada por um interesse particular nas áreas da Dermatologia, Oncologia, Histologia e em particular, pela Citologia, incentivados durante o curso.

O diagnóstico de tumores cutâneos tem-se tornado uma parte proeminente na clínica de animais de companhia, o que justifica a aplicação prática de meios de diagnóstico cada vez mais proficientes, que possibilitem aferir com precisão o prognóstico e extensão da doença.

Pretende-se com este trabalho académico estimular, de certo modo, os futuros Médicos Veterinários e restante comunidade veterinária a encararem o mundo da citologia como um objeto de estudo e de investigação que se pode tornar fascinante e realmente crucial, como coadjuvante no diagnóstico de neoplasias cutâneas e outras demais entidades clínicas, na prática clínica diária de pequenos animais. Procurou-se, fundamentalmente proporcionar uma perspetiva generalista dos principais achados citológicos de alguns tumores cutâneos mais frequentes em canídeos e felídeos, bem como, uma abordagem abrangente sobre a citologia oncológica, enfatizando os seus principais aspetos citopatológicos, que permitem alcançar um diagnóstico definitivo.

Perspetivas futuras

A autora perspetiva que seria interessante poderem ser desenvolvidas investigações na área da Patologia Veterinária, nomeadamente concernentes à contribuição que a comunicação entre os clínicos Veterinários e os Citopatologistas Veterinários exerce no estabelecimento de diagnósticos citopatológicos de processos neoplásicos, a fim de determinar as principais limitações comunicativas e diagnósticas que conduzem a resultados citopatológicos com baixo grau de confiança.

Bibliografia

- **Ackerman L (2008)** Atlas de Dermatologia en Pequeños Animales, 1ª Edición. InterMédica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Republica Argentina, ISBN: 978-950-555-333-4. pp.1-5.
- **Affolter VK & Moore K (1994)** Histologic features of normal canine and feline skin. *Clin. Dermatol*, 12:491-497.
- **Aldarra CF (2010)** Casos clínicos de citologia en el perro y el gato, Servet, Grupo Asís Biomedica, España, ISBN: 978-84-92569-37-3, pp. 72-73.
- **Aldarra CF (2014)** Autoevaluación Citológica en pequeños animales, Servet, Grupo Asís Biomedica, España, pp. 6-27.
- **Alleman AR (1990)** The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents, *Vet Med*, 85:1272.
- **Allison RW & Meinkoth JM (2007)** Hematology without the numbers: in-clinic blood film evaluation. *Vet Clin Small Anim*, 37, pp. 245-266.
- **Allison RW (2009)** Haemathologic Problems. In: *Small Animal Medical Diagnosis*, ed. Lorenz, MD; Neer, TM & DeMars, P, Third Edition, Willey-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-0-83138-1338-7, pp.479-481.
- **Alves A (2002)** Análises histopatológicas: porque demoram os resultados. Congresso de Ciências Veterinárias, Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, SPCV, Oeiras, 10-12 Out., pp. 239-247.
- **Alves A, Pires I, Gama A & Prada J (2016)** Técnica de necrópsia em mamíferos. In: *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp. 19-39.
- **Amorim RL, Neto RT & Kiupel M (2016)** Imuno-Histoquímica no Diagnóstico Oncológico. In *Oncologia Veterinária em cães e gatos*, 2ª Edição, ed. Daleck, CR & De Nardi, AB, Roca, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 133-146.

- **Angus JC (2005)** Better results from fungal cultures. In North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, 8-12 Jan. 2005. Acedido a 27 de Maio de 2017. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/087.pdf?LA=1>.
- **Arnold CF (2011)** Manual de Urgências em Pequenos Animales; Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, España, ISBN: 978-84-96344-35-8, pp. 431-463.
- **Ayele L, Mohammed C & Yimer L (2017)** Review on Diagnostic Cytology: Techniques and Applications in *Veterinary Medicine, J Vet Sci Technol*, 8:408. doi: 10.4172/2157-7579.1000408.
- **Baker D (2015)** Diagnósticos das Anormalidades da Hemostasia. In: *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, 2ª Edição. ed Thrall MA; Weiser G.; Allison RW, Campbell TW, Roca, São Paulo, ISBN:978-0-8138-1027-0; pp.174-176.
- **Baker M & Lawhead JB (2017)** Introduction to Veterinary Science, 3rd Edition. Cengage Learning.
- **Barata C, Anágua M, Ferro A & Roque R (2017)** Imunocitoquímica em ThinPrep®: Comparação de Diferentes Métodos de Pós-fixação, *NewsLab*, (141):24-8.
- **Barger (2012)** Cytology of Neoplasia – An Essential Component of Diagnosis. In *Today's Veterinary Practice*, September/ October: 12-18.
- **Barr SC & Bowman DD (2012)** Dermathophytosis: Keratinophilic Mycosis. In *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Canine and Feline Infectious Diseases and Parasitology, Second Edition*, Willey-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2012-5, pp. 193-199.
- **Barsati JA, Lees GE, Willard MD & Green RA (2004)** Urinary Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Fourth Edition ed. Willard MD & Tvedten H, Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 0-7216-8903-5, pp. 135-164.
- **Bassett JM & Thomas J (2014)** McCurnin's Clinical Textbook for Veterinary Technicians, 8th Edition, Elsevier, ISBN: 978-1437726800.
- **Batschinski, K & Tedardi, MV (2016)** Estadiamento Clínico das Neoplasias. In *Oncologia Veterinária em cães e gatos, 2ª Edição*, ed. Daleck, CR & De Nardi, AB, Roca, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 55-61.
- **Bauer N (2014)** Cytological Collection Techniques and Sample Preparation. In *Manual of Diagnostic Cytology of The Dog and Cat*. ed. Dunn, J. John Wiley & Sons, Ltd., Wiley-Blackwell, Oxford, UK, ISBN: 978-0-470-65870-3, pp. 1- 16.
- **Bellwood B & Andrasik-Catton M (2014)** Veterinary Technicians Handbook of Laboratory Procedures, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-1-1183-4193-3, pp. 17-70.
- **Besinger, E & Germain PA (2009)** Enfermedades del oído del perro y del gato. Servet, Grupo Asís Biomedica, España, ISBN: 978-84-92569-16-8, pp. 48-107.
- **Biller B, Berg J, Garrett L, Ruslander D, Wearing R, Abbott B, Patel M & Smith D, Bryan C (2016)** 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc*, 52(4):181-204. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6570.

- **Blackwood L (2011)** Tumors of Skin and Subcutaneous tissues. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology, 3th Edition*, ed. Dobson, JM, Lascelles, BDX & Lascelles, D. ISBN: 9781905319213, pp. 130-159.
- **Boes KM (2013)** Skin Masses Diagnosed With In-House Cytology. NAVAC, *Clinician's Brief*. pp. 15-17.
- **Borgatti A, Winter AL, Stuebner K, Scott R, Ober CP, Anderson KL, Feeney DA, Vallera DA, Koopmeiners JS, Modiano JF & Froelich J (2017)** Evaluation of 18-F-fluoro-2-deoxyglucose (FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) as a staging and monitoring tool for dogs with stage-2 splenic hemangiosarcoma – A pilot study. In *PLoS ONE* 12(2): e0172651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172651>.
- **Borges IL, Ferreira JS, Matos MG, Pimentel SP, Lopes CEB, Viana DA & Sousa C (2016)** Diagnóstico citopatológico de lesões palpáveis de pele e partes moles em cães. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 10 (3): 382-395.
- **Bouer N (2014)** Cytological Collection Techniques and Sample Preparation. In *Manual of Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*, ed. Dunn J, Wiley- Blackwell, Oxford, UK, pp.1-16.
- **Braz PH, Brum KB, Souza AI & Abdo MAGS (2016)** Comparação entre a citopatologia por biópsia com agulha fina e histopatologia no diagnóstico das neoplasias cutâneas e subcutâneas de cães. *Pesq. Vet.Bras.*, 36 (3):197-203.
- **Branco S (2015)** Aspetos gerais mais relevantes da necrópsia de pequenos ruminantes. *Revista Portuguesa de Buiatria*, Abril, pp.26-35. Acedido em 27 de Abril de 2017. Disponível em: <http://dspace.uevora.pt/rdpc/handle/10174/16293>.
- **Capela e Silva F (2008)** Evidenciação de estruturas celulares em microscopia ótica. Departamento de Biologia. Universidade de Évora, Évora.
- **Carretón E & Juste MC (2015)** Bioquímica y Enzimología Clínica Básica. In *Fundamentos de análisis clínicos en animales de compañía*, ed. Santa-Ana, JMC & Gómez, EC, Multimédica Ediciones Veterinaria, ISBN: 978-84-96344-16-7, pp. 101-
- **Cassali GD, Gobbi H, Malm C & Schmitt FC (2007)** Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, 18: pp.191–196.
- **Castiglioni MCR, Silva JP, Fogaça JL, Vettorato MC & Machado VMV (2016)** Uso da PET/TC com ¹⁸F-FDG na Medicina Veterinária – Revisão de Literatura. 5ª Jornada Científica e Tecnológica da FATEC de Botucatu, 24 a 27 de Outubro de 2016, Botucatu – São Paulo, Faculdade de Tecnologia de Botucatu, Brasil, pp.1-2.
- **Catharine RJ, Scott M & Yoran LG (2004)** Hipotireoidismo. In *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato, 5ª Edição*, ed. Ettinger, SJ & Feldman, EC, São Paulo, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2, ISBN: 9788527709019.
- **Cavalcanti MP, De Lorena VMB & Gomes YM (2008)** Avanços Biotecnológicos das Doenças infecciosas e Parasitárias, Vol. 37 (1): 1-14. jan.-abr. 2008, 1-14.

- **Christopher MM & Hotz CS (2004)** Cytologic diagnosis: expression of probability by clinical pathologists. *Veterinary Clinical Pathology*, 33, 84-95. Doi: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00354.x.
- **Cochran PE (2011)** Laboratory Manual for Comparative Veterinary Anatomy & Physiology (Veterinary Technology): A Clinical Laboratory Manual, 2nd Edition. Delmar, New York, USA, ISBN-13: 978-1435464339.
- **Cohen M, Bohling MW, Wright JC (2003)** Evaluation of sensitivity and specificity of Cytologic examination: 269 cases (1999–2000). *J Am Vet Med Assoc*, 222(7):964–7.
- **Colley EC & Stead RH (2013) Fixation and Other Pre-Analytical Factors.** In *Dako's Immunohistochemical Staining Methods, 6 th Edition*, ed. Taylor CR & Rudbeck KL. Dako, Denmark, pp. 20-29.
- **Correia J & Pissarra H (2016)** Seleção, recolha e envio de material para laboratório. In *Manual de Necropsia Veterinária*, ed. Silva, JF, Dias-Pereira, P, Carvalho, T, Faustino, A, Correia, J, Pissarra, H & Stiwell, G. LIDEL, ISBN: 978-989-752-196-6, pp. 131-138.
- **Couto G & Moreno N (2013)** Oncologia Canina y Felina: De la teoría a la práctica, Servet, Grupo Asís Biomedica, España, ISBN: 978-84-92569-26-7.
- **Cunha NMP (2010)** Immunoprofile In Effusion Cytology. Corso di dottorato di ricerca in Igiene Veterinaria e Patologia Animale, Università degli studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano, Itália.
- **Cunha MV & Inácio J (2014)** Visão geral e aplicação das tecnologias moleculares no diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas. In *Abordagens Moleculares em Veterinária, como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infeção*, ed. Cunha, MV & Inácio, J, LIDEL, Edições Técnicas, Lisboa, ISBN: 9789897520341.
- **Cunha S, Requicha JF & Oliveira JT (2015)** Hipertiroidismo Felino: Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Região da Grande Lisboa. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* 7: 05-14.
- **De Lara FCM & Rodríguez JH (2011)** Nociones básicas en citología y citología oncológica. In *Oncologia Veterinaria – Manuales clínicos por especialidades*, ed. Albertus, JCC, Servet, Grupo Asís Biomedica, Zaragoza, España, pp. 63-77
- **Dempsey SM & Ewing PJ (2011)** A review of the pathophysiology, classification, and analysis of canine and feline cavity effusions. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(1):1-11. doi: 10.5326/JAHA-MS-5558.
- **Del Ojo PC (2013a)** Citología paso a paso: Conceptos generales de citología. *Revista CITOS*, Octubre, 2013. 30-36.
- **Del Ojo PC (2013b)** Citología paso a paso: Conceptos generales de citología. *Revista CITOS*, Enero, 2013, 1: 8-12.
- **Del Ojo PC (2013c)** Citología paso a paso : Conceptos generales de citología. *Revista CITOS*, Abril, 2013, 2: 21-24.

- **Douglas A, Lau E, Thursky K & Slavin M (2017)** What, where and why: exploring fluorodeoxyglucose-PET's ability to localize and differentiate infection from cancer. In *Wolters Kluwer*, Vol.30, Nr 00: 1-13. doi.org/10.1097/QCO.0000000000000405.
- **Dyce, KM (2010)** Tratado de Anatomia Veterinária, 4ª Edição. Elsevier, ISBN: 9788535236729.
- **Ehrhart JM & Withrow SJ (2007)** Biopsy Principles. In *Withrow and McEwen's Small Animal Clinical Oncology*, ed. Withrow, J. & Vail, DM, Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, ISBN-13: 978-0-7216-0558-6, pp. 147-153.
- **Eich CS, Whitehair JG, Moroff SD & Heeb LA (2000)** The accuracy of intraoperative cytopathological diagnosis compared with conventional histopathological diagnosis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 36(1):16–8.
- **Feldman E & Nelson R (2004)** Feline Hyperthyroidism (Thyrotoxicosis). In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3 Ed.*, ed. Feldman E & Nelson R, Saunders, Philadelphia, pp.152-218.
- **Ferguson DC (2007)** Testing for Hypothyroidism in Dogs. *Veterinary Clinical Small Animal*, 37:633-645. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.05.015.
- **Fernández C, Jiménez de la Puerta JC & Aguijar A (2003)** Citología cutánea veterinária. *AVEPA*, vol. 23 (2): 75-87.
- **Ferro AB, Barata C, Anágua M & Roque RR (2013)** Imunocitoquímica de secreções brônquicas processadas em ThinPrep™: comparação de três métodos de pós-fixação. Disponível em: <http://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/4043> (Consultado dia 12 de Junho de 2017).
- **Ferro, AB (2014)** Imunohistoquímica, ed. Amadeu Borges Ferro, ISBN: 978-989-20-5416-2, pp-1-128.
- **Figueiredo ACS, Pedro LMG, Barroso JMG & Oliveira MMMG (2014)** Guia Prático de Biologia Celular, 2ª Edição. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Departamento de Biologia Celular, Centro de Biotecnologia Vegetal, ISBN: 978-989-99127-1-2.
- **Frable, WJ (1995)** Integration of Surgical Cytopathology: A Historical Perspective. *Diagnostic Cytopathology*, 13 (5): 376-378.
- **Gama A & Alves A (2016)** Descrição macro e microscópica das lesões de pele. In *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp. 110- 119.
- **Ganjei-Azar P, Jorda M, Krishna A (2011)** Effusion cytology - A Practical Guide to Cancer Diagnosis, New York, USA, ISBN: 9781933864655.
- **Garrett L (2010)** Fine-Needle Aspiration. Procedures Pro, *NAVC Clinician's Brief*, pp. 61-66.
- **Garrett L, Berent L & Barger, AM (2017)** Sample Acquisition and Preparation. In: *Small Animal Cytologic Diagnosis*, ed. Barger, AM & MacNeil, AL. CRC Press, Colorado, USA, ISBN: 978-1-4822-2575-4, pp. 1-21.
- **Gartner LP & Hiatt JL (2012)** Histologia Essencial. Saunders, Elsevier, ISBN: 978-85-352-4464-9, pp.2-8.

- **Ghisleni G, Roccabianca P, Ceruti R, Stefanello D, Bertazzolo W, Bonfanti U & Caniatti M. (2006)** Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 35 (1):24-30.
- **Ginn PE, Mansel JEKL. & Rakich PM (2007)** Skin and appendages. In Maxie MG ed. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. p.771.
- **Goldschmidt, MH & Goldschmit KH (2017)** Epithelial and Melanocytic tumors of the skin. In *Tumors in Domestic Animals, Fifth Ed.*, ed. Meuten DJ, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp.115-122.
- **Gómez N, Feijó S & Wolberg A (2014)** Síndromes clínicas en caninos y felinos: Algoritmos, Editorial Inter-médica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina, ISBN: 978-950-555-431-7, 7, pp. 44 - 55.
- **Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard A et al.(1998)** Histologic classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In *World Health Organization International Histologic Classification of Tumors of Domestic Animals*, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC.
- **Graça RF (2007)** Citologia para clínicos: como utilizar esta ferramenta diagnóstica. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35 (2): 267-269.
- **Graham P Refsal KR & Nachreiner RF (2007)** Etiopathologic Findings of Canine Hypothyroidism. *Veterinary Clinical Small Animal*, 37:617-631. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.05.002.
- **Graham, P (2009)** Canine hypothyroidism: diagnosis and therapy. In practice, 31:77-82.
- **Grandi F & Rondelli MCH (2016)** Neoplasias Cutâneas. In *Oncologia Veterinária em cães e gatos*, 2ª Edição, ed. Daleck CR & De Nardi AB. Roca. ISBN: 978-85-277-2937-6. Rio de Janeiro, Brasil, pp. 339- 362.
- **Griffiths G Lumsden J.& Vall V (2004)** Fine Needle Aspiration Cytology and Histologic Correlation of Canine Tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 13, 13-17. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.1984.tb00628.x>.
- **Griffiths K (2011)** Sugestões para realizar raspagens e biópsias cutâneas com êxito. *Today's Veterinary Practice*, Jul/Aug. 2011.
- **Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ & Affolter VK (2005)** Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis, 2nd ed. Blackwell, Oxford. p.932.
- **Gruchouskei L, Carvalho AL; Viott AM; Delgado LES; Krasinski F; Matos MR (2017)** Cistomatose de glândula apócrina em onça-pintada (*Panthera onca*). In *Pesq. Vet. Bras.* 37(9):991-994, setembro 2017. Doi: 10.1590/S0100-736X2017000900015.
- **Hajdu SIH & Ehya H (2008)** A Note from History: Foundation of Diagnostic Cytology. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 38 (3): 297-299.

- **Hargis AM & Ginn PE (2012)** The integument. In *MacGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease, 5th Ed.*, ed. Zachary JF & McGavin MD, Elsevier, Mosby, St Louis, Missouri, ISBN: 978-0-323-67533-6, pp. 972- 1084.
- **Harvey JW (2001)** Atlas of Veterinary Haemathology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals, Elsevier Saunders, Philadelphia, USA, ISBN: 978-0-7216-6334-0, pp. 7-43.
- **Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM et al. (1998)** Histologic classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. In *World Health Organization International Histologic Classification of Tumors of Domestic Animals*, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC.
- **Henry CJ & Higginbotham ML (2010)** Cancer Management in Small Animal Practice, Saunders, Elsevier, Missouri, ISBN: 978-1-4160-3183-3.
- **Herbert A (2014)** Cell blocks are not a substitute for cytology: why pathologists should understand cytopathology particularly in their chosen speciality. *Cytopathology*, 25: 351-355. Doi: 10.1111/cyt.12222.
- **Herring J & McMichael M (2012)** Diagnostic Approach to Small Animal Bleeding Disorders. Topics in Companion Animal Medicine, 27:73–80. Doi 10.1053/j.tcam.2012.07.004.
- **Hnilica KA (2012)** Técnicas de Diagnóstico. In *Dermatologia de Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico, 3ª Edição*, Saunders Elsevier, ISBN: 978-85-352-4513-4, pp. 22-76.
- **Hohenhaus AE, Kelsey JL, Haddad J, Barber L, Palmisano M, Farreley J & Soucy A (2016)** Canine Cutaneous and Subcutaneous Soft Tissues Sarcoma: An Evidence-Based Review of Case Management. *JAAHA*. American Hospital Association, pp.77-89.
- **Hospital Veterinário de Portimão:** <https://www.hospitalveterinariodeportimao.com/> (Portimão, Portugal) Acedido dia 28 de Dezembro de 2016.
- **Houston DM & Radostitis OM (2002)** Exploración clínica de la piel: Estructura y Función de la Piel. In *Examen y Diagnóstico Clínico en Veterinaria*, ed. Radostitis, OM, Mathew, IGJ & Hounston, DM, Saunders Elsevier Science, Ediciones Harcourt, España, ISBN:84-8174-586-3, pp. 213-243.
- **Jain D, Mathur SR & Iyer VK (2014)** Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies. *Cytopathology*, 25: 356–371. Doi: 10.1111/cyt.12174.
- **Jensen M, Di Crescenzo V, Brañas M, Nahas M (2014)** Hemorragia y Coagulopatias. In *Síndromes clínicos en caninos y felinos: Algoritmos*, Ed Gómez, N, Feijóo, S & Wolberg, A, Editorial Inter-médica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina, ISBN: 978-950-555-431-7, 7, pp. 44 - 55.
- **Jolly DW (1969)** The management of cases of suspected poisoning. *The Veterinary Record*, 84 (7), 166-168.
- **Johnson MC & Myers AN (2016)** Cytology of Skin Neoplasms. *Vet Clin Small Anim*, 47: 85-110. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.006>.

- **Kabuusu R, Volger T, Kumthekar S, Tirwarik K, Chikweto A, Bhaiyat M, De Allie C, Alexander R, Richards C, Sharma R (2016)** Evaluation of Sensitivity and Positive Predictive Values of Cytopathologic Diagnosis of Solid Masses in Dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 95-98. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.66012>
- **Kerr MG (2002)** Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Biochemistry and Haematology, Second Edition, Blackwell Science, Iowa, USA, ISBN: 0-632-04023-8, pp. 1-34.
- **King JM, Roth-Johnson L, Dodd DC & Newsom ME (2013)** The Necropsy Book: A Guide for Veterinary Students Residents, Clinicians, Pathologists, and Biological Researchers. College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, pp.1-4.
- **Kirbis IS, Maxwell P, Fležar MS, Miller K & Ibrahim M (2011)** External quality control for immunocytochemistry on cytology samples: a review of UK NEQAS ICC (cytology module) results. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol*, 22(4): 230-237. Doi: 10.1111/j.1365-2303.2011.00867.x.
- **Koss LG & Melamed MR (2005)** Koss' Diagnostic Cytology And Its Histopathologic Bases, 5a ed. 2 vol. set, ed. Lippincott W & Wilkins.
- **Kroft SH (2002)** Infectious diseases manifested in the peripheral blood. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22: 253-277. doi.org/10.1016/S0272-2712(03)00074-X.
- **Kumar G & Rudbeck KL (2009)** Dako's Guidebook to Immunohistochemical Staining Methods, 5th edition. ed. Kumar GL & Rudbeck KL. Dako. pp. 10-29.
- **Kusewitt DF (2017)** Neoplasia and Tumor Biology. In Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6th Ed. Zachary JF. Elsevier. Cap. 6. pp-289-290.
- **Liptak JM (2009)** The Principles of surgical oncology: Diagnosis and Staging. *Compend Contin Educ Vet.*, Sep, 31(9):E1-12.
- **Little SE & Lindsay DS (2012)** Protozoal Diseases: Laboratory Diagnosis of Protozoal Infections. In Infectious diseases of the dog and cat, 4th edition, ed. Greene CE, Elsevier Saunders, Saint Louis, ISBN: 978-1-4160-6130-4, pp. 711-717.
- **Littlewood JD (2003)** Investigative and laboratory techniques. In *BSAVA Small Animal Dermatology*, ed. Foster, AP & Foil, CS, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0 905214 58 7, pp. 20-24.
- **Lorenz M & Meinkoth J (2009)** Bleeding Disorders. In *Small Animal Medical Diagnosis*, ed. Lorenz, M.; Neer, T. & DeMars, P., Third Edition, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1338-7, pp.15-123.
- **Loures FH & Conceição LG (2013)** Biópsia de pele: quando, onde e como – Maximizando benefícios. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, Dezembro (71): 32-44.
- **Lucas R (2014)** Semiologia da Pele. In *Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico*, 3^a Edição, ed. Leydson, F & Feitosa, F. Roca, Brasil, ISBN: 9788541203999, pp. 641-676.
- **MacNeill AL (2011)** Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Top Companion Anim Med*. 26(2):62-76. doi: 10.1053/j.tcam.2011.02.004.

- **MacWilliams PS & Thomas CB (1992)** Basic principles of laboratory medicine, *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 7:253.
- **Mardell E (2013)** Diagnosis and management of feline hyperthyroidism. *In practice*, 35:162-170. doi: 10.1136/inpf.2013.
- **Marcos R & Santos M (2011)** Técnicas de Colheita e Coloração de Esfregaços. In *Atlas de Citologia Veterinária*, ed. Peleteiro, ed. MC, Marcos, R, Santos, M, Correia, J, Pissarra, H & Carvalho, T, Lisboa, LIDEL, Edições Técnicas, Lisboa, ISBN: 978-972-757-728-6, pp. 1-27.
- **Marcos R (2013)** Cell tube: a new technique for making cell blocks from needle rinses. *Veterinary Clinical Pathology*, 42: 401-402. doi: 10.1111/vcp.12095.
- **Marcos R, Santos M, Marrinhas C, Correia-Gomes C & Caniatti M (2016)** Cytocentrifuge preparation in veterinary cytology: a quick, simple, and affordable manual method to concentrate low cellularity fluids. *Vet Clin Pathol*, American Society for Veterinary Clinical Pathology, ISSN: 0275-6382, 1-7. doi:10.1111/vcp.12423.
- **Marrinhas CSR (2015)** Diagnóstico citológico em efusões de cães e gatos: Aproximando a clínica e o laboratório para um melhor diagnóstico. Relatório Final de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- **Martínez de Merlo E, Arconada L, Alenza DP & Bermejo CA (2015)** Manual Prático de Oncología en Pequeños Animales, 1ª Edición, Axon Comunicación, ISBN: 9788461486984.
- **Masserdotti C (2006)** Architectural patterns in cytology: correlation with histology. *Veterinary Clinical Pathology*, 35: 388-395.
- **Maxie MG & Miller MA (2016)** Introduction to the Diagnosis Process. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1, Sixth Edition*, Elsevier, ISBN: 978-0-7020-5317-7. **MacNeill AL (2011)** Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Top Companion Anim Med*. 26(2):62-76. doi: 10.1053/j.tcam.2011.02.004.
- **McDonough, SP & Southard, T (2017)** Necropsy Guide for Dogs, Cats, and Small Mammals. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, ISBN: 978-1-119-11565-6.
- **Meinkoth JH, Cowell RL & Tyler, RD (2014)** Sample collection and preparation. In *Cowell & Tyler's: Diagnostic cytology and haematology of the dog and cat*, ed. Valenciano, AC & Cowell, RL. Elsevier, Mosby, St Louis, Missouri.
- **Mescher AL (2013)** Histology & Its Methods of Study. In Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 13th edition. Ed. McGraw-Hill Education, USA. ISBN: 978-0-07-180720-3.
- **Meyer DJ, Connolly SL, Heng HG (2010)** The acquisition and management of cytology specimens. In *Canine and Feline Cytology: A color atlas and interpretation guide, second edition* ed. Raskin RE & Meyer DJ. Saunders, Elsevier, St Louis, Missouri, ISBN: 078-1-4160-4985-2, pp.1-13.
- **Miller WH, Griffin CE & Campbell KL (2013)** Diagnostic Methods. In *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 7th Edition*, Saunders Elsevier, Philadelphia, ISBN: 978-1-4160-0028-0, pp. 57-91.

- **Mills J (2012)** Diagnostic cytology of body cavity fluids in dogs and cats. Murdoch University, Australia, pp.11-14.
- **Montanha FP & Lopes APS (2011)** Hipotireoidismo canino – Revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, ISSN: 1679-7353, 17: 1-21.
- **Mooney CT (2008)** Interpreting Tests For Thyroid Disorders. *Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress*, WSAVA, FECAVA World Small Animal Congress, Dublin, Ireland, 18: 387-389.
- **Mooney CT (2011)** Feline Hyperthyroidism: An Update and What's New. *British Small Animal Veterinary Congress*. BSAVA, Glasgow.
- **Mooney, CT & Shiel, RE (2012)** Canine Hypothyroidism. In *BSAVA manual of Canine and Feline Endocrinology (4ª edição)*, C.T., Mooney & M.E., Peterson, pp. 63-85. Gloucester, BSAVA.
- **Moore A (2007)** Quantitative analysis of urinary calculi in dogs and cats. *Veterinary Focus*, 17 (1): 22-27.
- **Moriello KA (2001)** Diagnostic Techniques for Dermatophytosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 16 (4): pp. 219-224.
- **Moriello K & DeBoer D (2012)** Cutaneous Fungal Infections. In **Infectious diseases of the dog and cat, 4th Edition**, ed. Greene, CE, Elsevier Saunders, Saint Louis, Missouri, ISBN: 978-1-4160-6130-4, pp.588-595.
- **Moriello KA, Coyner K, Paterson S & Mignon B (2017)** Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary Dermatology*, 28:266–e68. doi: 10.1111/vde.12440.
- **Morrison WB & DeNicola DB (1993)** Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*, Small Animal, Saskatoon, 8 (4): 222-227.
- **Morris J & Dobson J (2001)** Small Animal Oncology. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-0-632-05282-0.
- **Munday JS, Gwythert S, Thomson NA & Malik R (2016)** Bilateral pre-auricular papillary squamous cell carcinomas associated with papillomavirus infection in domestic cat. *Veterinary Dermatology*, ESVD and ACVD, 1-6. Doi: 10.1111/vde.1201.
- **Murphy K & Pappasoulitis K (2011)** Pleural effusions in dogs and cats: 1. Diagnostic investigation. *In Practice*, 33: 462-469. doi: 10.1136/inp.d6057.
- **Murray PR Rosenthal KS & Pfaller MA (2013)** Medical Microbiology, 7th Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, ISBN: 978-0-323-08692-9, pp.32-33.
- **Musumeci G (2014)** Past, present and future: overview on histology and histopathology. *Journal of Histology & Histopathology*, 1-3. doi: 10.7243/2055-091X-1-5.
- **Musumeci G (2015)** The old and the new concepts of histochemistry. *Journal of Histology & Histopathology*, 2: 1-3. doi: 10.7243/2055-091X-2-10.

- **Nathan NA, Narayan E, Smith MM & Horn MJ (2000)** Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Anatomic Pathology, Am J Clin Pathol*, 114 (4): 599-606.
- **National Cancer Institute (2017)** About Cancer - Diagnosis and Staging: Cancer Staging. (Consultado dia 16 de Agosto de 2017). Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>.
- **Naylor B (1999)** The Century of Cytopathology. *Acta Cytologica*. pp.709-725.
- **Nelson R & Couto C (2006)** Distúrbios da hemostasia. In *Manual de Medicina Interna de Pequenos Animais, 3ª Edição*, Elsevier Mosby, Rio de Janeiro, ISBN: 8535219765, pp. 911-913.
- **North S & Banks T (2009)** Introduction to Small Animal Oncology. Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, ISBN: 978-0-7020-2800-7.
- **Nichols J, Weng HY, Litster A, Leutenegger C & Guptillcorresponding L (2016)** Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Polymerase Chain Reaction Tests for Detection of Feline Immunodeficiency Virus Infection. *J Vet Intern Med*, 31(1): 55–59. doi: 10.1111/jvim.14579.
- **Nimwegen V & Kirpensteijn S (2017)** Specific disorders. In *Veterinary Surgery: Small Animal, Volume Two*, ed. Tobias, KM & Johnston, SA, Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, ISBN: 9780323320528, pp. 1303-1304.
- **Noli C (1999)** Structure and functions of skin and coat. In *A Practical Guide to Feline Dermatology* ed., Guaguere, E & Prelaud, P. Merial, England, pp. 1-10.
- **Noli C (2011)** Cytology in Dermatology: How to perform and interpret it correctly. *Proceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress*, WSAVA, FASAVA World Congress Proceedings Oct. 14 - 17, Jeju, Korea, pp.30- 312.
- **Ochoa LN (2007)** Patología Clínica Veterinária, 1ª Edição, ed. Ochoa, LN & Bouda, J. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autonoma de México, México, ISBN: 978-970-4550-5.
- **Oliveira P, Oliveira J & Colaço A (2002)** Recolha e envio de amostras biológicas para o diagnóstico de intoxicações em carnívoros domésticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97 (544): 161-169.
- **Patel A & Forsythe P (2010)** Dermatología en Pequeños Animales, Elsevier, ISBN: 978-84-8086-482-4.
- **Peleteiro MC & Rodrigues AIP (1991)** O Exame citológico em medicina veterinária: punção aspirativa com agulha fina. *Veterinária Técnica*, 2: pp. 30-36.
- **Peleteiro MC (1996)** Técnicas de Biópsia de Pele: Excisão com Bistúri ou com “Punch”. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal, pp. 1-5.
- **Peleteiro MC & Carvalho T (2002)** Biópsia de pele – relevância para o diagnóstico em dermatologia. Congresso de Ciências Veterinárias, *Proceedings of the Veterinary Sciences Congress*, SPCV, Oeiras, 10-12 Out., pp. 223-228.

- **Peleteiro MC, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H & Carvalho T (2011)** Atlas de Citologia Veterinária. Lidel, Lisboa. ISBN: 978-972-757-728-6.
- **Peleteiro MC (2016)** Descrição no diagnóstico em citologia: Vantagens e limitações deste exame. In *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp.103 -110.
- **Peterson ME (2013a)** Diagnostic Testing for Feline Thyroid Disease: Hyperthyroidism. *Feline Focus*, Compendium: Continuing Education for Veterinarians, 35 (8)1-6.
- **Peterson ME (2013b)** More Than Just T4: Diagnostic testing for hyperthyroidism in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15, 765–777. doi:10.1177/1098612X13500426.
- **Peterson ME & Ward CR (2007)** Etiopathologic Findings of Hyperthyroidism in Cats. *Veterinary Clinical Small Animal*, 37:633-645. doi: 10.1016/j.cvsm.2007.05.001.
- **Pinheiro C, Roque R, Adriano A, Mendes P, Praça M, Reis I, Pereira T, Srebotnik Kirbis I, André S (2015)** Optimization of immunocytochemistry in cytology: comparison of two protocols for fixation and preservation on cytospin and smear preparations. *Cytopathology*. Feb, 26 (1):38-43. doi: 10.1111/cyt.12156.
- **Pires MA (2002)** Recolha e envio de material para análise histopatológica. *Anatomia Patológica*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, pp. 229-237.
- **Pires MA, Gartner FC & Travassos FS (2004)** Atlas de Patologia Veterinária. Lidel, Lisboa. ISBN: 978-972-757-281-6.
- **Pires AE & Alves M (2015)** Testes Moleculares no Apoio à Clínica Veterinária. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 7: 15-19.
- **Planellas M (2015)** Protocolo diagnóstico. In *Enfermedades de las vias urinarias inferiores del gato*, ed. AL Bachs, MP Anselmi, C Stevens, PM Moliner, CM Bermejo, LS Haro, CLU Abad, MH. Servet Editorial, Grupo Asís Biomédica, Zaragoza, España, pp.7-13.
- **Poppenga RH & Braselton WE (1990)** Effective use of analytical laboratories for the diagnosis of toxicologic problems in small animal practice. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 20(2): 293-306.
- **Prater R & Tvedten H (2004)** Hemostatic Abnormalities. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, Fourth Edition*, ed Willard, MD & Tvedten H, Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 0-7216-8903-5, pp. 92-111.
- **Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ & Leonard FC (2005)** Diagnóstico laboratorial das infeções virais. In *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*, ed. Quinn, PJ, Markey, BK, Carter, ME, Donnelly, WJ & Leonard, FC. Artmed, Porto Alegre, ISBN:9788536309279, pp. 301-305.
- **Radin MJ & Wellman ML (2004)** Interpretation of Canine and Feline Cytology, Nestlé Purina Pet Care Company, Saint Louis, Missouri, ISBN: 0-9678005-2, pp. 25-78.
- **Radin MJ & Wellman ML (2014)** Clinical Chemistry Serology and Urinalysis. In *McCurnin's Clinical Textbook for Veterinary Technicians, 8th Edition*, Bassert, JM, Thomas, J, Elsevier, St. Louis, ISBN: 9781455728848,397, pp. 423-437.

- **Raskin RE (2010)** General categories of cytologic interpretation. In *Canine and Feline Cytology: A color atlas and interpretation guide*, second Edition, Raskin, RE & Meyer, DJ, Saunders, Elsevier, St Louis, Missouri, ISBN: 978-0-323-07533-6, pp.15-25.
- **Rebar A (2003)** Interpretación del Hemograma Canino y Felino. Wilmington, Delaware: Nestlé Purina PetCare Company.
- **Rebar AH & Raskin RE (2006)** Cytology, Haematology & Clinical Pathology: Cytology of Effusions. 2006 World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, pp.659-666.
- **Rebar AH & Thompson CA (2010)** Body cavity fluids. In *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*, 2nd Edition, ed. Raskin RE & Meyer DJ, Saunders Elsevier, St Louis, Missouri, ISBN: 978-1-4160-4985-2.
- **Reppas G & Foster SF (2016)** Practical Urinalysis In The Cat 2:Urine microscopic examination 'tips and traps'. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 18:373-385.
- **Rizzi TE, MeinkothJH, Clinkenbeard KD (2010)** Normal Hematology of the Dog. In *Schalm's Veterinary Hematology, 6ª Edição*, ed. Weiss, DJ; Wardrop, KJ, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 799-809.
- **Rizzi TE (2014a)** Urinalysis in companion animals: Part 1: Collection, Sample Handling & Initial Evaluation. *Today's Veterinary Practice*, 64-68.
- **Rizzi TE (2014b)** Urinalysis in companion animals: Part 2: Evaluation of Urine Chemistry & Sediment. *Today's Veterinary Practice*, 86-91.
- **Rodrigues, ACS (2015)** A Importância de Estudos Dinâmicos em PET/CT para Avaliação de Doenças Oncológicas. Dissertação de Mestrado em Ciências Nucleares Aplicadas na Saúde, Escola Superior de Tecnologia da Saúde Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- **Rosenfeld A & Dial S (2010)** Clinical Pathology For The Veterinary Team, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1008-9, pp.19-91.
- **Roselem MC, Moroz LR, Rodigheri SM, Neto UJC, Porto CD & Hanel JS (2013)** Estudo retrospectivo de exames citológicos realizados em um Hospital Veterinário Escola em um período de cinco anos. *Arq. Bras.Med. Zootec.*, 65 (3): 735-741.
- **Rosenkrantz W (2016)** Chronic Otitis: A Dermatologist's Perspective on Surgery. *Today's Veterinary Practice*, vol 6 (3): 24-30.
- **Ruano R (2015)** Tumores derivados de glândulas apócrinas. *Revista CITOS*, Abril 2015, pp. 25-28.
- **Ruiz-Argüelles GJ & Ruíz-Delgado GJ (2014)** Interpretación de la citometria hemática. Índices y parámetros eritrocíticos. Definición de la anemia. In *Fundamentos de Hematología*, ed. Ruiz-Argüelles, GJ; Reyes, GR & Ruiz Delgado, GJ, 5ª Edición, Editorial Médica Panamericana, México, ISBN: 9786079356088, pp. 13-24.
- **Santana AE, Seki MC, Gama FGV, Sobreira MFR, Canesin APM & Santana LAS (2016)** Citologia Aspirativa por agulha fina aplicada ao estudo de neoplasias. In *Oncologia Veterinária*

em cães e gatos, 2ª Edição, ed. Daleck, CR & De Nardi, AB, Roca, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 63-75.

- **Santa-Ana JMC & Gómez EC (2015)** Fundamentos de Análisis Clínicos en Animales de Compañía, Multimédica Ediciones Veterinarias, ISBN: 978-84-96344-16-7.
- **Santos ACC, Alvim APV, Ferreira MLG, Pliego CM, Alencar NX & Oliveira TE (2009)** Retrospective study of cytological diagnosis in dogs and cats. *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress*, WSAVA 2009, São Paulo, Brazil.
- **Santos M & Marcos R (2011)** Derrames Cavitários. In *Atlas de Citologia Veterinária*, ed. Peleteiro, MC, Marcos, R, Santos, M, Correia, J, Pissarra, H & Carvalho, T, Lisboa, LIDEL, Edições Técnicas, Lisboa, ISBN: 978-972-757-728-6, pp. 233-248.
- **Santos MAS (2016)** Cell blocks in pleural effusions: comparing agar gel and cell tube methods. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- **Saraiva AL & Payan-Carreira R (2016)** O Clínico e o Anatomopatologista. In *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp.267-280.
- **Scott DW, Miller WH & Griffin CE (2001)** Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th Edition, Philadelphia, Saunders Elsevier, pp. 1528.
- **Seixas F & Pires MA (2016)** Alterações post mortem ou fenómenos cadavéricos. In *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp. 9-17.
- **Selting KA (2014)** Lymphnode Cytology: What Should & Should Not be There. *Today's Veterinary Practice*, May/June 2014, pp. 18-22.
- **Sharkey LC, Dial SM, Matz ME (2007)** Maximizing the diagnostic value of cytology in small animal practice. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 37: 351-372.
- **Sharkey LC & Wellman ML (2011)** Diagnostic cytology in veterinary medicine: a comparative and evidence-based approach. *Clinical Laboratory Medicine*.
- **Sharkey LC, Seelig DM, Overmann J (2014a)** All lesions great and small, part 2. Diagnostic cytology in veterinary medicine", *Diagnostic Cytopathology*, 42:544-52.
- **Sharkey LC, Seelig DM, Overmann J (2014b)** All lesions great and small, part 1: diagnostic cytology in veterinary medicine, *Diagnostic Cytopathology*, 42:535-43.
- **Shiel RE & Mooney CT (2007)** Testing for Hyperthyroidism in Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4):671-691. doi:10.1016/j.cvsm.2007.03.006.
- **Siegel RL, Miller KDM & Jemal A (2016)** Cancer Statistics, 2016. *CA CANCER J CLIN*, 66 (1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332.
- **Sink CA & Weinstein NM (2012)** Practical Veterinary Urinalysis, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, ISBN: 978-0-470-95824-7.
- **Silveira ACP, Roldão CDR, Ribeiro SCA & Freitas PFA (2008)** Flora bacteriana aeróbia em otites caninas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 103 (567-568): 171-175.

- **Sinowatz Hyttel, P Sinowatz F & Vejsted M (2010)** *Essentials of Domestic Animal Embriology*. Saunders Elsevier, ISBN: 978-07020-2899-1, pp. 317-329.
- **Skeldon N Dewhurst E (2009)** The perceived and actual diagnostic utility of veterinary cytological samples. *Journal of Small Animal Practice*, 50:180-185.
- **Skoog L & Tani E (2011)** Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, 22(4): 215-229. doi: 10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x.
- **Souza TM, Figuera RA, Kommers GD & Barros CSL (2009)** Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. *Pesq. Vet. Bras.*, 29 (2):177-190.
- **Stone, B & Reppas, G (2010)** Cytology sample collection an preparation for veterinary practioners, *QML Pathology*, 803: 1-8.
- **Szladovits, B (2014)** Cytology in Practice course notes, WSAVA CE, March 2014, Belgrade, Serbia. pp. 3-41.
- **Tasker S (2010)** Haemotropic Mycoplasmas – What’s their real significance in cats? In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12: 369-381. doi:10.1016/j.jmfms.2010.03.011.
- **Tenreiro A, Chaves S & Tenreiro R (2014)** Princípios básicos da deteção e análise de ácidos nucleicos. In *Abordagens Moleculares em Veterinária, como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infeção*, ed. Cunha, MV & Inácio, J, LIDEL, Edições Técnicas, Lisboa, ISBN: 9789897520341.
- **Teske E (2008)** Clinical Cytology of Companion Animals: Part I. Introduction. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 18: 127-134.
- **Teske E (2009a)** Clinical Cytology of Companion Animals: Part II. Cytology of subcutaneous swellings, skin tumours and skin lesions. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 19 (1): 21-29.
- **Teske E (2009b)** Clinical Cytology of Companion Animals: Part 3. Cytology of the Lymph Node. *The European Journal of Companion Animal Practice*, 19(2): 1-8.
- **Tighe MM & Brown M (2015)** *Moby’s Comprehensive Review for Veterinary Technicians*, 4th Edition, Elsevier Mosby, ISBN: 978-0-323-17138-0.
- **Tizard IR (2014)** *Imunologia Veterinária*, 9ª Edição, Saunders Elsevier, São Paulo, Rio de Janeiro, ISBN: 978-1-4-557-0362-3, pp.1031-1075.
- **Thomas JS (2004)** Introduction to Serum Chemistries: Artifacts in Biochemical Determinations. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Fourth Edition, ed. Willard MD & Tvedten H, Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 0-7216-8903-5, pp. 113-115.
- **Torrance A (2000)** Overview of Haematological Diagnostic Techniques. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, ed. Day, Mackin, MA & Littlewood J, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-39-0, pp. 12-17.
- **Uranovet (2016)**: Uranotest Dermatophytes – Advantages. (Consultado dia 27 de Dezembro de 2016) Disponível em: <https://uranovet.com/en/uranotest/dermatophytes/>

- **Vail DM & Withrow SJ (2007)** Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In Withrow, SJ. & Vail DM. *Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology*. 4Ed, Saint Louis. Saunders. Cap. 18, pp.375-401.
- **Vala H & Pires MA (2016)** Recolha e envio de material para o laboratório de Anatomia Patológica. In *Descrição Anatomopatológica em Medicina Veterinária*, ed. Payan-Carreira, R & Pires, MA. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CECAV, Vila Real, pp. 65-75.
- **Vap LM & Shropshire SB (2017)** Urine Cytology, Collection, Film Preparation, and Evaluation. *Vet Clin Small Anim* 47: 135–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.009>.
- **Ventura RFA, Colodel MM & Rocha MS (2013)** Exame citológico em medicina veterinária: estudo retrospectivo de 11.468 casos (1994-2008). *Pesq. Vet. Bras*, 32 (11): 1169-1173
- **Villalobos A & Kaplan L (2007)** Canine and Feline Geriatric Oncology: Honoring The Human-Animal Bond. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, ISBN: 978-0-8138-0266-4, PP. 3-22.
- **Viveiros M, Couto I & Inácio J (2014)** Microbiologia Médica, Volume 1. LIDEL, Edições Técnicas, pp. 182-184.
- **Viveiros M, Couto I, Rossetti ML & Silva PEA (2014)** Otimização, validação e controlo de qualidade de testes moleculares de diagnóstico. In *Abordagens Moleculares em Veterinária, como desvendar a etiologia e a epidemiologia da infeção*, ed. Cunha, MV & Inácio, J, LIDEL, Edições Técnicas, Lisboa, ISBN: 9789897520341, pp. 51-64.
- **Wagner DG, Russell DK, Benson JM, Schneider AE, Hoda RS & Bonfiglio TA (2010)** Cellient™ Automated Cell Block versus Traditional Cell Block Preparation: A comparison of Morphologic Features and Immunohistochemical Staining. *Diagnostic Cytopathology*, 39 (10): 730-736. Doi: 10.1002/dc.
- **Wagner PR & Wagner J (2016)** Avaliação Histopatológica. In *Oncologia Veterinária em cães e gatos, 2ª Edição*, ed. Daleck, CR & De Nardi, AB, Roca, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 113-127.
- **Warland J & Dobson J (2011)** Tumores cutâneos caninos e felinos. *Veterinary Focus*, vol. 21, nº3, pp. 34-41.
- **Weiss D & Tvedten H (2004)** The Complete Blood Count and Bone Marrow Examination: General Comments and Selected Techniques. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, ed. Willard, MD & Tvedten, H, Fourth Edition, Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 0-7216-8903-5, pp. 15-20.
- **Weiser G (2015a)** Coleta e processamento da amostra e análise das opções de serviços laboratoriais. In *Hematologia e Bioquímica Clínica*, ed. Roca, São Paulo, Brasil, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 28-33.
- **Weiser G (2015b)** Interpretação da resposta leucocitária na doença. In *Hematologia e Bioquímica Clínica*, ed. Roca, São Paulo, Brasil, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 108-119.
- **Wellman ML & Radin MJ (2014)** Haemathology and Cytology. In *McCurnin's Clinical Textbook for Veterinary Technicians*, 8th Edition, Bassert, JM, Thomas, J, Elsevier, St. Louis, ISBN: 9781455728848,p.397.

- **Zanoni DS, Grandi F & Rocha, NS (2012)** Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an old and forgotten method. *Veterinary Clinical Pathology*, 41: 307-310. Doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00456.x.
- **Zanoni DS, Kleeb SR & Xavier JG (2013)** Emprego do cell block de agarose como método complementar no diagnóstico citológico de tumores mamários caninos. *Ciência Rural*, Santa Maria, 3: 489-495.
- **Zarka & Field (2017)** Introduction to the practical algorithmic pattern recognition approach to fine needle aspiration biopsy. In *Practical Cytopathology: An Diagnostic Approach*, ed. Field, AS & Zarka, MA. Elsevier, Philadelphia. ISBN: 978-1-4160-5769-7, pp.1-3.
- **Zarka MA (2017)** Fine Needle Aspiration Biopsy Cytology of Salivary Gland: A Diagnostic Approach Based On Pattern Recognition. In *Practical Cytopathology: An Diagnostic Approach*, ed. Field, AS & Zarka, MA. Elsevier, Philadelphia. ISBN: 978-1-4160-5769-7, pp.5-51.
- **Zuccari DAPC, Jardim-Perassi BV, Lopes JR, Colombo J & Silva CL (2016)** Biologia do Câncer. In *Oncologia Veterinária em cães e gatos, 2ª Edição*, ed. Daleck, CR & De Nardi, AB, Roca, Rio de Janeiro, Brasil.