**JOANA DA SILVA MATIAS**

# DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO EM NÓDULOS CUTÂNEOS E SUBCUTÂNEOS - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS: PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA E PUNÇÃO NÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA

**Orientador: Professora Doutora Ana Godinho**

**Co-orientador: Mestre Ana Oliveira**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2013**

**JOANA DA SILVA MATIAS**

# DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO EM NÓDULOS CUTÂNEOS E SUBCUTÂNEOS - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS: PUNÇÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA E PUNÇÃO NÃO ASPIRATIVA COM AGULHA FINA

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Professora Doutora Ana Godinho
Co-Orientadora: Mestre Ana Oliveira

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa**

**2013**

# AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pela força que me deu durante todos os estes anos. Por saberes exactamente o que fazer para me ajudar nos bons e maus momentos, por acreditares que sou sempre capaz de tudo e me fazeres sentir a filha mais sortuda do mundo!

Ao meu pai, por permitir que realizasse este sonho. Obrigada por acreditares em mim, por todo o orgulho que tens em mim.

À minha irmã, obrigada pela tua paciência e cumplicidade. Juntas somos imparáveis!

Aos meus tios Toni e Leta, os meus segundos pais. Obrigada por tudo, desde sempre! Nunca conseguirei retribuir tudo aquilo que fazem por mim.

Ao Rui, pelo teu apoio e optimismo, fazes sempre parecer tudo tão mais fácil! Obrigada por estares sempre ao meu lado, por me deixares fazer parte da tua vida.

À Professora Ana Oliveira, pela orientação notável que me deu ao longo deste trabalho, sempre com tanto ânimo e disponibilidade para me ajudar.

Ao Dr. Luís Montenegro pela disponibilidade em me receber para estágio, por me transmitir os seus conhecimentos e permitir que assistisse ao trabalho da sua equipa exemplar.

Um grande obrigado a toda a equipa do Hospital Veterinário Montenegro por me ter recebido com tão boa disposição, por tudo o que me ensinaram e princípios que me transmitiram. Parabéns, são uma equipa admirável! Um especial obrigado à Dra. Cláudia Rodrigues que me apoiou desde o início deste trabalho e pela preocupação comigo ao longo de todo o estágio. Obrigada também a todos os meus colegas estagiários que tornaram aqueles intensos meses de trabalho tão gratificantes e divertidos!

A todos os meus colegas de curso que de alguma maneira tornaram estes cinco anos tão únicos e inesquecíveis.

À Filipa Manteigas, muito mais que uma colega de curso e de estágio, uma grande amiga. Obrigada por todos os momentos, por todo o apoio e amizade. Obrigada por estares sempre lá, foste fundamental para que a recta final deste percurso corresse tão bem! Continuaremos juntas nas mil batalhas que ainda nos esperam, com bandas sonoras e sorrisos infinitos!

À Cookie, à Missy e à Coxinhas, as minhas grandes paixões que me inspiram todos os dias.

# RESUMO

A técnica de punção pode ser realizada de duas formas distintas: aplicando pressão negativa para permitir aspiração da amostra, Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF), ou baseando-se apenas no princípio da capilaridade, Punção Não Aspirativa por Agulha Fina (PNAAF). Este trabalho teve por objectivo comparar as amostras de nódulos cutâneos e subcutâneos obtidas pelas técnicas de PAAF e PNAAF e consequente capacidade de fornecer diagnóstico citológico. Para tal, foram analisados 30 nódulos cutâneos executando ambas as técnicas, perfazendo um total de 60 amostras citológicas. Avaliaram-se os seguintes critérios de comparação: presença ou ausência de células representativas, densidade celular, identificação do tipo de massa consoante o tipo celular presente e obtenção ou não de diagnóstico definitivo. Os resultados demonstraram que a técnica de PNAAF teve igual capacidade na classificação do tipo de massa assim como na obtenção de diagnóstico citológico definitivo. O número de amostras com presença de células representativas e a densidade celular foi igual para ambas as técnicas. Subjetivamente, a PNAAF recolheu amostras com menor contaminação sanguínea.

Os resultados não sugerem que uma das técnicas seja superior em relação a outra. No entanto, para obter resultados mais seguros, recomenda-se que se executem as duas técnicas em simultâneo.

**Palavras-chave:** citologia, nódulos cutâneos e subcutâneos, PAAF, PNAAF

# ABSTRACT

The punction technique may be performed in two different ways: applying of negative pressure in order to allow the specimen aspiration, Fine-Needle Aspiration Puncture (FNAP), or relying solely on the capillary principle, Fine-Needle Nonaspiration Puncture (FNNP). This study had the objective to compare the specimens of cutaneous and subcutaneous nodules collected by FNAP and FNNP and their ability to provide a cytological diagnosis. In order to achieve that, 30 cutaneous nodules were analyzed executing both techniques in tandem, thus constituting a total of 60 cytological specimens. The following comparison criteria were documented: presence or absence of representative cells, cellular density, identification of the type of mass according to the cell type observed and the obtention, or not, of a definitive diagnosis. In the outcome, FNNP revealed equal capacity to classify the type of mass as well as to obtain a definitive cytological diagnosis. The number of specimens showing representative cells and the cellular density was the same for both techniques. Subjectively, FNNP obtained specimens with lower blood contamination.

The results do not suggest that neither technique is superior to the other. However, in order to achieve safer results, it is recommended to perform both techniques in tandem.



**Key words:** cytology, cutaneous and subcutaneous nodules, FNAP, FNNP

# LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm - Centímetro

*et al.* (*et aliae*) – e outros (para pessoas)

GLR – Gânglios linfáticos regionais

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PNAAF – Punção não aspirativa por agulha fina

PNST – Tumor da bainha dos nervos periféricos

OMS – Organização Mundial de Saúde

TAC – Tomografia axial computorizada

α – Nível de significância

% – Por cento

< – Inferior

> – Superior

# ÍNDICE GERAL

**1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** **1**
1.1. ABORDAGEM GERAL AO ANIMAL COM NÓDULO CUTÂNEO 1
1.2. METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO DE NÓDULOS CUTÂNEOS 5
1.2.1. ANÁLISE CITOLÓGICA – ABORDAGEM GERAL 5
1.2.1.1. TÉCNICAS DE COLHEITA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE CITOLÓGICA 6
1.2.1.1.1. Técnica de Aposição 6
1.2.1.1.2. Técnica de Raspagem 7
1.2.1.1.3. Recolha com Auxílio de Zaragatoa 7
1.2.1.1.4. Punção Aspirativa por Agulha Fina 8
1.2.1.1.5. Punção Não Aspirativa por Agulha Fina 11
1.2.1.2. TÉCNICA DE ESFREGAÇO PARA ANÁLISE CITOLÓGICA 13
1.2.1.3. TÉCNICA DE FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS 15
1.2.2. AVALIAÇÃO CITOLÓGICA GERAL DE NÓDULOS CUTÂNEOS 16
1.2.2.1. CARACTERÍSTICAS INFLAMATÓRIAS 19
1.2.2.2. CARACTERÍSTICAS NEOPLÁSICAS 22
1.3. NÓDULOS CUTÂNEOS 26
1.3.1. NEOPLASIAS DE ORIGEM MESENQUIMATOSA 26
1.3.2. NEOPLASIAS DE ORIGEM EPITELIAL 28
1.3.3. NEOPLASIAS DE ORIGEM EM CÉLULAS REDONDAS 30
1.3.4. LESÕES NÃO INFLAMATÓRIAS NÃO NEOPLÁSICAS MAIS COMUNS 31
1.3.4.1. QUISTOS EPIDÉRMICOS E FOLICULARES 32
1.4 OBJETIVOS 35
**2. MATERIAL E MÉTODOS** **36**
2.1. POPULAÇÃO DE ANIMAIS 36
2.2. PROTOCOLO DE COLHEITA DAS AMOSTRAS 36
2.3. PROTOCOLO LABORATORIAL ADOTADO 38
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 39
**3. RESULTADOS** **40**
3.1. ANÁLISE DA POPULAÇÃO 40

3.1.1. ESPÉCIE E IDADE 40
3.1.2. GÉNERO E ESTADO FÉRTIL 40
3.1.3. RAÇA 40
3.2. ANÁLISE DERMATOLÓGICA – NÓDULOS CUTÂNEOS 40
3.2.1. LOCALIZAÇÃO ANATÓMICA 40
3.2.2. DIMENSÃO 41
3.2.3. CONSISTÊNCIA 41
3.2.4. PRURIDO 41
3.2.5. MOBILIDADE 42
3.2.6. ULCERAÇÃO 42
3.2.7 ALTERAÇÃO DE COR 43
3.3 ANÁLISE CITOLÓGICA 43
**4. DISCUSSÃO 50**
**CONCLUSÃO 54**
**BIBLIOGRAFIA 56**
**APÊNDICES i**
APÊNDICE A: FICHA CLÍNICA DE RECOLHA DE AMOSTRAS ii

# ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Resultados comparativos entre a possibilidade de identificação do tipo de massa e variáveis físicas dos nódulos._____ 46

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Distribuição dos nódulos por localização anatómica. _____ 41
**Gráfico 2:** Avaliação dos nódulos quanto à sua mobilidade. _____ 42
**Gráfico 3:** Avaliação dos nódulos quanto à presença de sinais de ulceração. _____ 42
**Gráfico 4:** Avaliação dos nódulos quanto à alteração da cor cutânea. _____ 43
**Gráfico 5:** Capacidade de classificação dos nódulos cutâneos citologicamente. _____ 44
**Gráfico 6:** Distribuição dos nódulos tumorais consoante células de origem. _____ 44
**Gráfico 7:** Distribuição dos nódulos inflamatórios consoante células predominantes. _____ 44
**Gráfico 8:** Proporção dos níveis de densidade celular obtidos pelas técnicas de PNAAF e PAFF. _____ 48

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Nódulo subcutâneo na zona do dorso num cão. _____ 4
**Figura 2:** Preparação pré-cirurgia para nodulectomia num cão. _____ 4
**Figura 3:** Execução da técnica de PAAF num nódulo na extremidade do membro anterior de um cão. _____ 9
**Figura 4:** Técnica para recolha de amostra em nódulos cutâneos por punção por agulha fina. _____ 9
**Figura 5:** Deposição da amostra numa lâmina de vidro. _____ 10
**Figura 6:** Execução do esfregaço pela técnica de esmagamento._____ 13
**Figura 7:** Identificação das lâminas de amostra._____ 14
**Figura 8:** Diagrama das etapas básicas na avaliação citológica. Fonte: adaptado de MacNeill (2011)._____ 18
**Figura 9:** Citologia de inflamação do tipo neutrofílico. Observam-se também algumas células epiteliais (coloração Giemsa, ampliação x400). _____ 20
**Figura 10:** Citologia de um processo inflamatório do tipo piogranulomatoso. Observam-se vários neutrófilos e macrófagos (coloração Giemsa, ampliação x400). _____ 21
**Figura 11:** Citologia de nódulo cutâneo inflamatório. Observam-se fibroblastos reativos com sinais semelhantes a características de malignidade (coloração Giemsa, ampliação x400). 27
**Figura 12:** Nódulo cutâneo do tipo quístico na extremidade distal do membro anterior de um cão. _____ 33
**Figura 13:** Citologia de um nódulo cutâneo quístico: observação de um fundo proteináceo abundante (coloração Giemsa, ampliação x100). _____ 34
**Figura 14:** Citologia de um nódulo cutâneo quístico onde se observa grande quantidade queratina sem presença de células (coloração Giemsa, ampliação X100). _____ 34
**Figura 15:** Citologia compatível com lipoma. Observação de gotícula de gordura e adipócito com vários vacúolos, no centro do campo microscópico (coloração Giemsa, ampliação X100). _____ 45
**Figura 16:** Citologia compatível com mastocitoma. Observam-se mastócitos com os seus grânulos citoplasmáticos basofílicos bem evidentes. (coloração Giemsa, ampliação X400). 45

# ÍNDICE DE QUADROS

**Quadro 1**: Características de comportamento biológico comparativas entre nódulos cutâneos benignos e malignos. Fonte: adaptado de Dobson and Scase (2011). 2

**Quadro 2:** Sistema de estadiamento clínico de tumores cutâneos em cães e gatos da OMS. Fonte: adaptado de Hauch (2012). 3

**Quadro 3:** Vantagens e desvantagens da análise de nódulos cutâneos e subcutâneos por citologia. Fonte: adaptado de Graça (2007), North & Banks (2010) e Friedrichs & Young ( 2012). 5

**Quadro 4:** Alterações citomorfológicas de malignidade. Fonte: adaptado de DeNicola (2007), Fry (2009) e Rakich & Latimer (2011). 23

**Quadro 5:** Neoplasias cutâneas mais comuns de origem mesenquimatosa em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011). 28

**Quadro 6:** Neoplasias cutâneas de origem epitelial mais comuns em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011). 30

**Quadro 7:** Neoplasias cutâneas mais comuns de origem em células redondas em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011). 31

**Quadro 8:** Lesões não inflamatórias não neoplásicas em cães e gatos. Fonte: adaptado de Scott *et al.* (2001b), Gross, (2005) e Paterson (2008). 32

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. ABORDAGEM GERAL AO ANIMAL COM NÓDULO CUTÂNEO

É bastante comum, na avaliação clínica de rotina, o Médico Veterinário detetar uma massa cutânea durante o exame físico num animal aparentemente saudável. A abordagem a este tipo de situações depende de diferentes fatores que conduzem ao método de diagnóstico mais apropriado (Couto, 2009). Os tumores cutâneos representam cerca de um terço de todos os tumores caninos, sendo a pele o local mais comum de surgimento de neoplasias em cães e o segundo mais comum em gatos (Scott *et al.*, 2001b). Cerca de dois terços de todos os tumores cutâneos são solitários e representam lesões benignas epiteliais ou de estruturas anexas como sejam as glândulas sebáceas, apócrinas e folículos pilosos. Na espécie felina observa-se uma maior incidência de nódulos malignos (Morris & Dobson, 2001). O processo de diagnóstico de nódulos cutâneos inicia-se pela anamnese do animal, exame físico e por fim, exames complementares de diagnóstico. É importante considerar a espécie, idade, raça e sexo do animal uma vez que certas patologias apresentam diferentes predisposições e apresentações clínicas (Carlotti, 2005). A recolha cuidadosa destes dados é crucial para qualquer paciente dermatológico. Na anamnese deve-se conseguir também a informação da região anatómica de origem de onde surgiu a lesão e sua progressão no tempo (Lewis, 2003). As principais diferenças em termos de comportamento biológico entre nódulos cutâneos malignos e benignos estão discriminadas no Quadro 1.

| | Tumor Benigno | Tumor Maligno |
|---|---|---|
| **Taxa de Crescimento** | Relativamente baixa ou torna-se nula | Alta; Raramente estabiliza e pára de aumentar de dimensão |
| **Tipo de Crescimento** | Expansivo; com margens bem definidas podendo tornar-se encapsulado | Invasivo, com margens mal definidas; células tumorais extendem-se e espalham-se pelos tecidos adjacentes |
| **Efeito nos Tecidos Adjacentes** | Efeito mínimo; pode causar necrose por pressão e deformação anatómica | Efeito severo; o crescimento e invasão tumoral leva a destruição dos tecidos adjacentes que se manifesta como ulceração dos tecidos superficiais |
| **Metastização** | Não ocorre | Ocorre frequentemente |
| **Efeitos Sistémicos** | Mínimos | Potencialmente graves pela capacidade destrutiva do tumor de orgãos vitais após metastização |

Quadro 1: Características de comportamento biológico comparativas entre nódulos cutâneos benignos e malignos. Fonte: adaptado de Dobson and Scase (2011).

O exame físico deve iniciar-se pelo exame geral do animal e depois incluir uma avaliação mais detalhada do nódulo em si e também dos gânglios linfáticos regionais (GLR) e outros sistemas mais distantes como, por exemplo, os pulmões para considerar possível processo de metastização. A Organização Mundial de Saúde (OMS) criou um sistema de estadiamento clínico adaptado para tumores cutâneos em cães em gatos tendo em conta as características do tumor em si e quanto ao envolvimento de GLR e a presença ou ausência de metástases distantes do local de origem, representado no Quadro 2 (Hauch, 2012).

| | | |
|---|---|---|
| **Tumor Primário** | T0 | Sem evidência de tumor |
| | T*is* | Carcinoma *in situ* |
| | T1 | Tumor < 2 cm de diâmetro máximo; exofítico ou superficial |
| | T2 | Tumor com 2 a 5 cm de diâmetro máximo ou com mínima invasão local |
| | T3 | Tumor > 5 cm de diâmetro máximo ou com invasão tecidual subcutânea |
| | T4 | Tumor com invasão em outras estruturas (fáscia muscular, tecido muscular, ósseo ou cartilagíneo) |
| **Envolvimento de GLR** | N0 | Sem evidência de envolvimento de GLR |
| | N1 | Gânglio ipsilateral móvel |
| | N1a | Gânglios considerados não-metastáticos |
| | N1b | Gânglios considerados metastáticos |
| | N2 | Gânglios contralaterais ou bilaterais móveis |
| | N2a | Gânglios considerados não-metastáticos |
| | N2b | Gânglios considerados metastáticos |
| | N3 | Gânglios não móveis |
| **Metástases Distantes** | M0 | Sem evidência de metástases à distância |
| | M1 | Com metástases à distância |

Quadro 2: Sistema de estadiamento clínico de tumores cutâneos em cães e gatos da OMS. Fonte: adaptado de Hauch (2012).

A lesão propriamente dita deve ser examinada macroscopicamente quanto à sua localização anatómica, dimensão, forma, aparência (coloração, alopécia, relevo, entre outros), consistência (firme ou branda), bordos (circunscrita ou infiltrativa), profundidade, mobilidade (móvel ou aderente) e presença ou não de ulceração (Carlotti, 2005). Na Figura 1 observa-se a deteção e imobilização de um nódulo subcutâneo ao nível do dorso de um cão.



Figura 1: Nódulo subcutâneo na zona do dorso num cão.

Segundo Couto (2009), a abordagem primária deve incluir sempre avaliação citológica do nódulo uma vez que, na maioria dos casos, se consegue obter um diagnóstico presuntivo e por vezes, mesmo definitivo. A partir deste resultado e determinando a natureza da lesão como inflamatória ou neoplásica benigna ou maligna, o Médico Veterinário opta por exames de diagnóstico mais adequados. Posteriormente, o maneio de neoplasias cutâneas pode variar entre tratamento médico conservativo ou cirurgia convencional, criocirurgia, eletrocirurgia, radioterapia, terapia por laser, quimioterapia, imunoterapia, termoterapia, fototerapia, ou qualquer combinação entre estas (Scott *et al.*, 2001b). Na Figura 2 observa-se a preparação pré-cirúrgica de um cão com um nódulo cutâneo ao nível da face para excisão.



Figura 2: Preparação pré-cirurgia para nodulectomia num cão.

## 1.2. METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO DE NÓDULOS CUTÂNEOS

### 1.2.1. ANÁLISE CITOLÓGICA – ABORDAGEM GERAL

A citologia compreende-se como a análise morfológica de células pertencentes a um tecido sem presença da arquitetura tecidual de origem. As vantagens e desvantagens associadas à utilização da citologia como meio de diagnóstico para nódulos cutâneos e subcutâneos estão sumarizadas no Quadro 3.

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| • Técnicas de recolha de mínima invasão | • Perda da arquitetura tecidual |
| • Baixo custo económico | • Possíveis resultados falsos negativos |
| • Não exige muita experiência pelo clínico | • Incapacidade de obtenção de diagnóstico definitivo frequente |
| • Técnicas de recolha de simples execução | • Incapacidade de avaliar grau de metastização |
| • Rapidez na execução | • Incapacidade de avaliar grau de invasão vascular e tecidual |
| • Rapidez na obtenção de resultados | • Amostra em quantidade limitada |
| • Alto nível de capacidade de diagnóstico presuntivo | • Difícil distinção entre processos inflamatórios reativos e neoplásicos |

Quadro 3: Vantagens e desvantagens da análise de nódulos cutâneos e subcutâneos por citologia. Fonte: adaptado de Graça (2007), North & Banks (2010) e Friedrichs & Young ( 2012).

Existem diferentes métodos de recolha de amostra para obtenção de diagnóstico citológico em nódulos cutâneos. O resultado final interpretativo será de qualidade proporcional à da amostra enviada para laboratório. Aquando a colheita de amostra, independentemente da técnica utilizada, deve-se ser rigoroso em todas as etapas de maneira a se obter uma amostra de qualidade significativa, desde a própria técnica em si, à utilização de material apropriado, aplicação correta na lâmina de microscópico da amostra e consequente fixação e colorações adequadas, com protocolos predefinidos (Graça, 2007; Teske, 2009). Sumariamente, para que se conquistem resultados satisfatórios em alcançar o diagnóstico em nódulos cutâneos e subcutâneos por citologia, deve-se ser capaz de obter amostras de boa qualidade, estabelecer uma colaboração adequada entre o clínico e o patologista e que este tenha um forte conhecimento científico nas áreas de histopatologia e citologia (Simeonov, 2010).

As técnicas aplicáveis para recolha de amostra para diagnóstico por citologia são a raspagem, a técnica "swab" com auxílio de zaragatoa, a técnica por aposição, e punção por agulha fina, aspirativa ou não aspirativa. As lesões cutâneas e subcutâneas são geralmente de fácil acesso e em nenhuma das técnicas está descrita qualquer contraindicação (Carlotti, 2005; Meinkoth *et al.*, 2008a). O diagnóstico citológico permite uma identificação rápida do tipo celular presente em que, obtendo uma alta celularidade e população homogénea, se consegue caracterizar a lesão (Carlotti, 2005). Raramente é necessário recorrer a tranquilização ou anestesia dos animais para recolha de amostras por estas técnicas e todo o processo de recolha, preparação, coloração e exame microscópico demora poucos minutos e pode providenciar informações valiosas de diagnóstico, prognóstico e indicação de maneio/terapia a instituir (Meinkoth *et al.*, 2008a).

As desvantagens da citologia são também uma realidade que o clínico deve ter ciente. Existe a possibilidade de se obterem falsos negativos e de não se atingir muitas vezes um diagnóstico definitivo, classificando a lesão de uma forma muito generalista. Por vezes, pode até não ser capaz de diferenciar tecido normal de situações de hiperplasia, displasia ou neoplasia. A citologia também não consegue determinar o grau de invasão vascular (Viadel *et al.*, 2005; Skeldon & Dewhurst *et al.*, 2009; Simeonov, 2010). Ainda, a amostra recolhida para estudo citológico é muito inferior em termos de quantidade em comparação com os processos de biópsia, pelo que pode não ser completamente representativa (Friedrichs & Young, 2012). Outra limitação que deve ser considerada é a dificuldade inerente em distinguir, apenas por características citomorfológicas, um processo inflamatório reativo de um processo neoplásico (Simeonov, 2010).

### 1.2.1.1. TÉCNICAS DE COLHEITA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE CITOLÓGICA

#### 1.2.1.1.1. Técnica de Aposição

A citologia por aposição ou impressão é um processo simples e está indicada em lesões superficiais ulceradas ou exsudativas assim como em tecidos obtidos por excisão em cirurgia ou necrópsia (Teske, 2008; Graça, 2007). As desvantagens deste método são que, por somente recolher células superficiais, em lesões inflamatórias secundárias apenas se obtêm células inflamatórias não dando qualquer informação do processo primário. Ainda, muitos tumores neoplásicos podem não esfoliar ao nível da ulceração nem por exsudado, não se obtendo qualquer amostra celular representativa. Por isso, é recomendado que, em adição à técnica de aposição, se realize também a técnica de punção por agulha fina mais profundamente na lesão (Meinkoth *et al.*, 2008a). Caso seja necessário, para aumentar a

celularidade da amostra, pode-se recorrer a uma lâmina de bisturi para avivar a lesão raspando ligeiramente (Teske, 2008).

A técnica consiste em encostar uma lâmina de vidro diretamente na lesão, fazendo uma pressão ligeira. Não se deve proceder à limpeza da úlcera antes de realizar a recolha por eliminar material potencialmente diagnóstico. Deve-se fazer, nesse caso, duas impressões: uma antes da limpeza do local e outra após limpeza. No caso de uma massa excisada cirurgicamente, procede-se à aposição desta diretamente numa lâmina permitindo uma avaliação imediata da amostra (Meinkoth *et al.*, 2008a; Rakich & Latimer, 2011).

#### 1.2.1.1.2. Técnica de Raspagem

A técnica de raspagem está indicada em lesões superficiais ou em tecidos obtidos por excisão cirúrgica ou necrópsia e geralmente obtêm-se amostras com maior celularidade que aquelas pela técnica de aposição. Uma das desvantagens desta técnica é que há uma grande probabilidade de contaminação da amostra e acresce o risco de provocar inflamação quando se tratam de lesões de facto superficiais ou ulceradas. O seu valor diagnóstico é mais limitado em comparação com outras técnicas por colher apenas material superficial (Peteleiro *et al.*, 2011).

A técnica em si é feita com auxílio de uma lâmina de bisturi colocada em posição perpendicular à pele e fazendo pressão. É feita raspagem várias vezes em direção ao próprio operador. A raspagem deve ser executada com uma profundidade o suficiente para provocar a exsudação de sangue/líquido seroso. De seguida, o material colhido na lâmina de bisturi é transferido para uma lâmina de vidro para ser feito o esfregaço e posterior observação a microscópio (Meinkoth *et al.*, 2008a; Rakich & Latimer, 2011).

#### 1.2.1.1.3. Recolha com Auxílio de Zaragatoa

O método de colheita por zaragatoa é raramente utilizada com propósito de diagnóstico em nódulos cutâneos e recorre-se a esta técnica apenas quando não é possível utilizar outra que forneça melhor amostra. Assim, na área da dermatologia, a técnica de "swab" é aplicada em zonas de difícil acesso, tais como o canal auditivo externo, vagina e tratos fistulosos (Meinkoth *et al.*, 2008a). Tal como a técnica de raspagem, também esta está sujeita a um grande risco de contaminação bacteriana e recolhe apenas células superficiais (Peteleiro *et al.*, 2011).

A técnica para colheita de amostra é feita através de uma zaragatoa estéril, humedecida com uma solução salina para diminuir a ocorrência de lesões mecânicas nas células. Move-se, cuidadosamente, rolando a zaragatoa de um lado para o outro sobre a lesão e depois transfere-se a amostra para uma lâmina de vidro realizando o mesmo tipo de

movimento, apenas numa direção sem fazer demasiada pressão, várias vezes (Meinkoth *et al.*, 2008a; Rakich & Latimer, 2011).

#### 1.2.1.1.4. Punção Aspirativa por Agulha Fina

A técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) está indicada, na área da dermatologia, em lesões cutâneas e subcutâneas e é atualmente o método mais comum para recolha de amostras citológicas (Friedrichs & Young, 2012). Em relação às técnicas esfoliativas de recolha de amostras citológicas já descritas, a sua maior vantagem é ter capacidade de recolher células em profundidade e com mínima contaminação celular e bacteriana superficial (Meinkoth *et al.*, 2008a). Muitos dos nódulos de pele podem não ser apenas distinguidos com esta técnica mas também classificados, como é o caso do mastocitoma, histiocitoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma das células basais e melanoma. Já em situações de proliferação mesenquimatosa, é difícil distinguir se se trata de um processo tumoral ou apenas reativo (Teske, 2008). Em qualquer situação, para obtenção de um diagnóstico mais fiável e definitivo está sempre indicado o estudo histopatológico por biópsia (Tvedten, 2012).

A técnica consiste em utilizar uma agulha de baixo calibre para diminuir o risco de hemorragia (21G a 25G) acoplada a uma seringa de 3 a 12 ml de volume. Após introdução da agulha na massa, aplica-se pressão negativa puxando o êmbolo da seringa até cerca de três quartos do seu volume. São recomendadas agulhas de maior calibre (18G a 20G) em massas com matriz abundante ou fibróticas como, por exemplo, massas de consistência muito firme ou sarcomas (Friedrichs & Young, 2012). A área deve ser previamente limpa, se necessário, com álcool ou um agente desinfetante como a clorhexidina. O processo de limpeza e preparação da área é desvalorizado por muitos autores. No entanto, segundo Dobson & Scase (2011) este deve ser cuidadoso e especialmente prudente em situações em que se lide com nódulos do tipo quístico que se localizem anatomicamente perto de articulações ou cavidades corporais pelo alto risco de contaminação. Para o processo de recolha, utilizam-se dois dedos da mão não dominante (dedo polegar e terceiro ou segundo dedo) para imobilizar e individualizar o nódulo a puncionar. A Figura 3 demonstra o posicionamento da mão e da agulha no nódulo para execução da técnica.



Figura 3: Execução da técnica de PAAF num nódulo na extremidade do membro anterior de um cão.

A agulha deve ser redirecionada várias vezes sem nunca atingir a superfície, mantendo sempre o vácuo, para que se consiga coletar diferentes áreas teciduais do nódulo. A execução dos movimentos desenha um cone em que a base é a lesão e o ápice é a superfície cutânea (Graça 2007; Rakich & Latimer, 2011). Na Figura 4 está esquematizado o tipo de movimento a executar com a agulha no nódulo, para obtenção de amostra por punção por agulha fina, com ou sem aspiração.

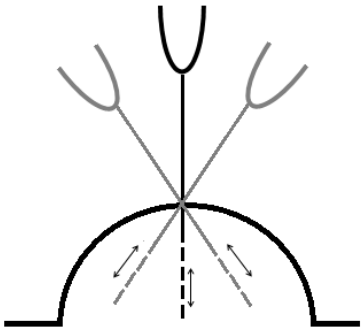


Figura 4: Técnica para recolha de amostra em nódulos cutâneos por punção por agulha fina.

Exceto nos casos em que o nódulo tenha conteúdo líquido (lesões quísticas, necróticas ou muito hemorrágicas), o material aspirado estará reservado apenas na zona da agulha, não sendo visível ao nível da seringa. Caso se observe sangue na seringa, deve-se libertar imediatamente a pressão negativa para prevenir que ocorra diluição do material aspirado com células sanguíneas (Rakich & Latimer, 2011; Friedrichs & Young, 2012). Deve-se ter sempre o cuidado de libertar a pressão negativa antes de remover a agulha do nódulo para evitar que haja contaminação da amostra com detritos de tecido e pele superficiais e para que o material não seja aspirado para o interior da seringa e que, assim,

se perca a amostra. De seguida, a agulha é removida da seringa, enche-se a seringa de ar e voltam-se a acoplar as duas partes para promover a expulsão do material recolhido para uma lâmina de vidro (Meinkoth *et al.*, 2008b; Rakich & Latimer, 2011). A mão não dominante é utilizada para segurar firmemente a agulha de maneira a impedir que esta se desloque ao ser aplicada pressão. A ponta da agulha deve estar posicionada num ângulo de 45 a 90º com a lâmina tocando ligeiramente nesta para que se forme uma gota quando se expele o material que, de outra maneira, seria expelido em spray, o que levaria à formação de pequenas gotículas que dessecam rapidamente (Graça, 2007). A Figura 5 ilustra a deposição do material recolhido para a lâmina de vidro.

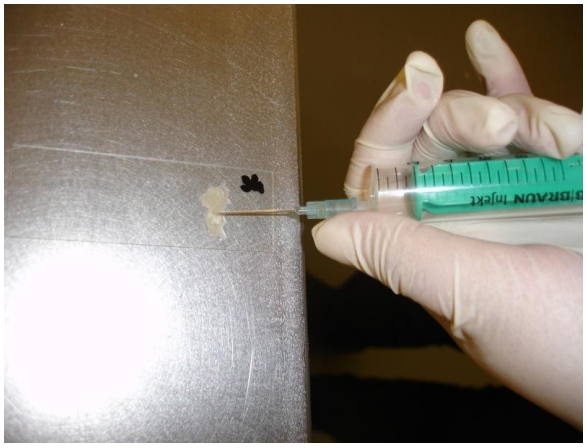


Figura 5: Deposição da amostra numa lâmina de vidro.

O posicionamento da agulha na lesão é um fator crítico para a qualidade da amostra obtida. É aconselhado que se façam múltiplas recolhas por aspiração da mesma lesão e em nódulos de grandes dimensões deve-se tentar recolher material do centro da lesão e da periferia, independentemente, realizando várias vezes o mesmo processo para aumentar a hipótese de se obter uma amostra representativa (Teske, 2008; MacNeill, 2011). Na periferia da lesão é expectável que se obtenham amostras de menor celularidade mas que podem ser de grande utilidade uma vez que os tumores de crescimento muito rápido tendem a necrosar no centro (Teske, 2008).

Em nódulos que se apresentem ulcerados ou com sinais de inflamação, a coleta deve ser feita num nível mais profundo à úlcera. Neste tipo de lesões, há o risco de se obter amostras apenas com tecido necrosado sem informação diagnóstica da causa subjacente (MacNeill, 2011).

O valor preditivo positivo desta técnica é maior que o seu valor preditivo negativo. Ou seja, a ausência de células de cariz maligno numa preparação citológica é menos fiável que a sua presença (Teske, 2008). As desvantagens desta técnica incluem a possibilidade de se aspirar células em redor do tumor em vez de células pertencentes ao tumor em si.

Também, zonas inflamadas ou necróticas, ou mesmo o nódulo propriamente dito, podem ser de consistência difícil de aspirar. Estas características podem levar a resultados falsos negativos. Outra limitação desta técnica é que a sua amostra não permite um estudo estrutural histológico nem o estadiamento de lesões neoplásicas, e é também sensível a erros do operador (Joyce, 2010). Ainda assim, as vantagens da PAAF fazem com que seja a técnica de eleição pela maioria dos clínicos. É um método bastante fácil de aprender e realizar, de rápida execução, baixo custo económico e providencia resultados em poucos minutos. Tal como outras técnicas de recolha de amostras para citologia, a PAAF não requer anestesia ou qualquer outro tipo de restrição química o que permite que seja executada mesmo durante uma consulta clínica (Teske, 2008; Patel *et al.*, 2010). O esfregaço obtido não necessita de ser processado imediatamente e pode ser reservado para mais tarde. O processo é considerado de tão mínima invasão que a possibilidade de induzir metastização é desprezível (Teske, 2008.) Os riscos, ainda que pequenos, associados a esta técnica são a rutura de um processo inflamatório encapsulado, disseminação de agentes infeciosos e hemorragia. Os fatores de risco devem ser sempre considerados tendo em conta o benefício de obtenção de diagnóstico e o impacto a longo prazo (Meyer *et al.*, 1999). Esta técnica apresenta-se também como muito vantajosa em nódulos do tipo quístico ou com conteúdo líquido em que se obtém facilmente amostra desse líquido para recolha em tubo estéril permitindo cultura fúngica ou bacteriana, se necessária (MacNeill, 2011).

#### 1.2.1.1.5. Punção Não-aspirativa por Agulha Fina

A técnica de PNAAF, também denominada de citologia por capilaridade ou citopunctura, é uma derivação da PAAF e tem vindo a ser preferida por muitos Médicos Veterinários, apresentando um igual ou mesmo maior nível de especificidade e sensibilidade diagnóstica em diferentes estudos de Medicina Humana comparativos das técnicas aspirativa e não aspirativa (Raghuveer *et al.*; 2002; Meinkoth *et al.*, 2008; LeBlanc *et al*., 2012). De uma forma geral, a PNAAF tem ganho popularidade também devido ao facto de ser de rápida e fácil execução (Tauro *et al*., 2012). Esta técnica baseia-se no princípio de capilaridade do material e não é aplicada pressão negativa para recolha da amostra (Raskin & DeNicola, 2006; Meinkoth *et al.*, 2008a). De acordo com este princípio, uma substância fluída ou semi-fluída ascende espontaneamente por um tubo estreito, na proporção inversa do diâmetro desse tubo (Raghuveer *et al.*, 2002). De modo consensual entre os autores, consegue obter técnicas de igual ou melhor qualidade em comparação com aquelas obtidas pela técnica *standard*.

A técnica em si é semelhante à PAAF e utiliza uma agulha de calibre igualmente pequeno. Deve-se ter a seringa perto do operador, previamente cheia de ar para que, assim que se remove a agulha da lesão, se acoplarem as duas partes e permitir a rápida expulsão

do material para a lâmina de vidro. Por preferência do clínico, a seringa pode estar já cheia de ar conectada à agulha desde que não se exerça qualquer pressão no êmbolo (Meinkoth *et al.*, 2008a; Rakich & Latimer, 2011) Nesta técnica, muitos autores optam por não redirecionar a agulha em vários ângulos dentro da lesão, realizando o movimento de "vaivém" seguindo sempre o mesmo trajeto. Esta opção é justificada pelo facto de permitir que, assim, as células sejam recolhidas por corte e pressão contra o tecido. É igualmente recomendado que se realize mais do que uma prova de recolha por este método para aumentar a probabilidade de obter mais material diagnóstico (Meinkoth *et al.*, 2008a).

Em comparação à PAAF, a maioria dos estudos indica a PNAAF como sendo mais fácil de realizar na prática e geralmente as amostras recolhidas são menos contaminadas com células sanguíneas e têm igual ou maior celularidade representativa (Rakich & Latimer 2011; Friedrichs & Young, 2012; Tvedten, 2012). A menor contaminação sanguínea é apontada pela maioria dos autores. Já em termos de celularidade, os resultados obtidos por cada técnica são mais variáveis (LeBlanc, 2009). Está descrito também que este método diminui o risco de rutura das células (Raskin, 2006). No entanto, em termos quantitativos, de qualidade ou não, a PAAF tende a recolher amostras maiores (Pothier & Narula, 2006). A PNAAF tem vindo a ser preferencialmente indicada para massas altamente vasculares, de pequenas dimensões que requerem um controlo mais preciso da agulha e massas de consistência muito sólida (Pothier & Narula, 2006; Meinkoth *et al.*, 2008a; Alleman, 2011; MacNeill, 2011). A técnica permite ainda, ao clínico, uma melhor sensação táctil em relação à textura e consistência da massa (Raghuveer *et al.*, 2002; Al-Khattab & Hussein, 2004; Graça, 2007). Tauro *et al*. (2012) considera esta técnica, em comparação com a PAAF, como sendo menos traumática e dolorosa. No entanto, aponta como desvantagem o facto de obter menor concentração celular. Se não se conseguir obter amostra com este tipo de técnica, recomenda-se que se repita executando a punção aspirativa (Graça, 2007).

Ainda assim, segundo o estudo de Al-Khattab & Hussein (2004), a PAAF demonstrou melhores resultados a nível citológico para recolha de amostras em nódulos muito fibróticos e pouco celulares/esfoliativos. Em lesões quísticas também foi preferida a técnica por aspiração por diminuir o risco de derramamento e perda de fluídos tendo antes a capacidade de drenar o material para futuro estudo citológico, bioquímico ou microbiológico. Foi também registado, por estes autores, que a técnica não aspirativa preserva menos a estrutura celular que a técnica convencional.

### 1.2.1.2. TÉCNICA DE ESFREGAÇO PARA ANÁLISE CITOLÓGICA

Existem diferentes técnicas de preparação de esfregaços, independentemente da técnica de colheita de amostra utilizada, que variam consoante o tipo e características da lesão a analisar assim como a experiência e prática do operador. O objetivo do esfregaço é obter uma amostra em que as células se disponham numa única camada fina sobre a lâmina, sem que ocorra rutura celular, que permita uma boa visualização dos constituintes celulares (Meinkoth *et al.*, 2008a; Friedrichs & Young, 2012).

A técnica de esmagamento é considerada a melhor a aplicar em amostras recolhidas através agulha fina ou raspagens de uma massa sólida (Meinkoth *et al.*, 2008a). Utiliza-se uma segunda lâmina de vidro limpa, numa posição perpendicular à lâmina que contém a amostra, diretamente em cima da amostra, como se observa na Figura 6 (Friedrichs & Young, 2012).

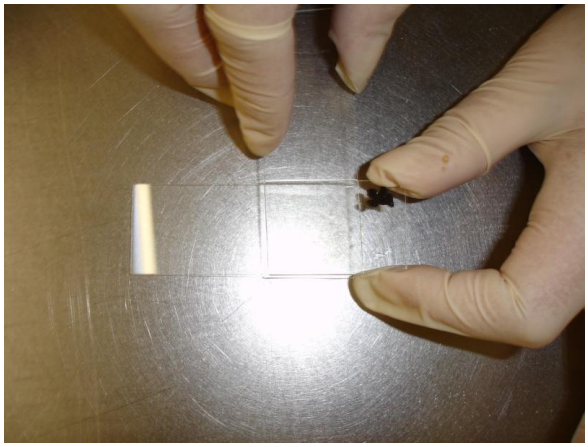


Figura 6: Execução do esfregaço pela técnica de esmagamento.

Não se deve aplicar pressão pois a amostra espalha-se pela área em contacto somente devido ao peso da própria lâmina. Apenas em casos em que a amostra seja muito granulosa ou espessa se pode realizar uma ligeira pressão (Rakich & Latimer, 2011; Meinkoth *et al.*, 2008a). De seguida, procede-se ao esfregaço deslizando, num movimento único e contínuo, a lâmina sobre a lâmina de base (Tvedten, 2012). Quando bem executada, esta técnica oferece ótimos resultados espalhando uniformemente as células mesmo quando estas se agrupam em agregados o que permite uma melhor visualização dos pormenores celulares microscópicos. A maior desvantagem descrita é, de facto, a rutura celular que é muito fácil de ocorrer, especialmente quando se aplica pressão sobre a amostra (Meinkoth *et al.*, 2008a).

Está descrita outra técnica de preparação de esfregaços, semelhante à dos esfregaços sanguíneos, que é mais indicada em casos em que a amostra obtida seja muito

fluida ou sanguinolenta (Rakich & Latimer, 2011). Nestes casos, obtém-se uma menor incidência de rutura celular e assim, esfregaços de melhor qualidade com células intactas e bem dispersas. A técnica consiste em utilizar uma outra lâmina e encostar o seu bordo mais pequeno à frente da amostra, de maneira a que esta se disperse no seu comprimento por capilaridade. Num ângulo de 45º, desliza-se a lâmina sobre a que contém a amostra ligeiramente para trás e de seguida, num único movimento, para a frente por toda a lâmina (Meinkoth *et al.*, 2008a).

Na preparação de qualquer esfregaço deve ter-se em atenção para não permitir que a amostra coagule ou seque na superfície da lâmina. Para isso, deve-se proceder ao esfregaço imediatamente após a deposição da amostra na lâmina. As células podem não dispersar o suficiente para permitir a sua posterior observação e o processo de coloração ser insuficiente dado que as células estão incorporadas num coágulo. Outro ponto a ter em atenção é a quantidade de amostra que se depositou na lâmina uma vez que, se for muito grande, pode levar à formação de esfregaços muito densos o que torna a visualização celular impossível (Scott *et al.*, 2001a; Friedrichs & Young, 2012). Geralmente, isto sucede em amostras contaminadas por sangue periférico ou a partir de lesões muito esfoliativas. Idealmente, dever-se-ia aplicar apenas uma gota na lâmina e ao realizar o esfregaço não deveria de ter quantidade suficiente para preencher toda a lâmina. Todo o processamento de maneio da amostra e posterior transporte deve ser realizado longe de recipientes ou amostras que contenham formol a 10% uma vez que pode provocar alterações permanentes a nível citológico (Meinkoth *et al.*, 2008a).

Todas as lâminas devem de estar identificadas e/ou irem anexadas com a identificação do paciente e outras informações relevantes para o patologista que não observou o animal nem a lesão *in situ*. A interpretação dos resultados é, assim, mais dirigida à patologia em si o que confere maior valor à análise (Tvedten, 2012). Na Figura 7 é apresentado um par de lâminas devidamente identificadas, para o presente estudo, com o número código do nódulo que corresponde a uma ficha clínica com toda a informação recolhida e técnica de amostragem utilizada.

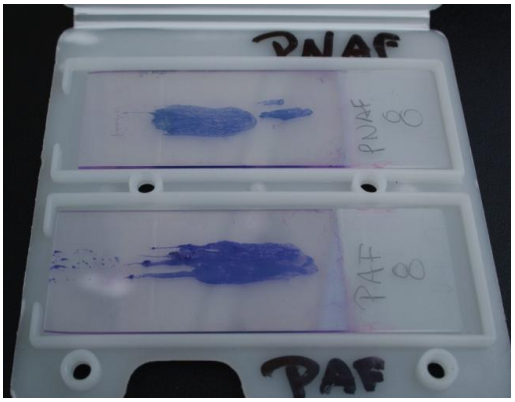


Figura 7: Identificação das lâminas de amostra.

### 1.2.1.3. TÉCNICA DE FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS CITOLÓGICOS

Os esfregaços obtidos devem ser secos ao ar para as colorações do tipo Romanowski e Azul de Metileno, de maneira a que a amostra adira à lâmina e não seja perdida durante o processo de coloração (Meinkoth *et al.*, 2008; Tvedten, 2012). A secagem ao ar deve ser feita naturalmente num ambiente controlado para evitar distorção celular. Caso se deseje acelerar o processo, pode-se usar um secador elétrico mas longe o suficiente para não aquecer a amostra, alterando-a. Os esfregaços não devem ser armazenados em refrigeração nem expostos a pó, insetos ou outros contaminantes (Tvedten, 2012).

Existem diferentes tipos de colorações aplicáveis a esfregaços citológicos. Os tipos mais comuns são as colorações do tipo Romanowsky (Wright, Giemsa e Diff-Quik), vitais (Azul de Metileno) e tricrómicas (Papanicolau e Sano). Os corantes do tipo Romanowski são os mais populares e amplamente utilizados na comunidade Veterinária por serem práticos e de fácil acesso. As colorações do tipo tricrómicas fornecem excelente detalhe na observação nuclear celular e são rotineiramente utilizadas em Medicina Humana. No entanto, a sua técnica é complexa e requer muitas etapas de coloração e não tem grande capacidade de corar muitos microrganismos e citoplasma o que a torna pouco prática para uso Veterinário (Meinkoth *et al.*, 2008a).

As colorações do tipo Romanowski são pouco dispendiosas, de uso imediato para o clínico e fáceis de preparar, manter e utilizar. Em termos de características, têm uma excelente capacidade de corar citoplasma celular e microrganismos. No entanto, obtém-se uma menor perceção de detalhe a nível de núcleo e nucléolo celular ainda que suficiente para a diferenciação entre neoplasia e inflamação, e para avaliar células neoplásicas quanto ao seu grau de malignidade (Scott *et al.*, 2001a; Meinkoth *et al.*, 2008a). Todas as apresentações comerciais de colorações do tipo Romanowski são indicadas para a coloração de esfregaços citológicos. O único pormenor apontado é o facto de o Diff-Quik não incluir reação metacromática o que pode levar a alguma deficiência na coloração de mastócitos. Deste modo, os grânulos dos mastócitos podem não corar e serem, assim, mal classificados como macrófagos ou plasmócitos e interferir no processo de diagnóstico em suspeita de mastocitoma, por exemplo (Meinkoth *et al.*, 2008; Friedrichs & Young, 2012).

As colorações do tipo Romanowski são classificadas como policromáticas pelo que conferem características de basofilia e eosinofilia aos esfregaços semelhante às observadas nos esfregaços sanguíneos (Tvedten, 2012). Existem vários problemas com que o clínico, especialmente se for inexperiente, se pode deparar quando tenta analisar um esfregaço citológico corado. Quando se obtém um esfregaço bem corado, os núcleos celulares devem

ser de fácil distinção em comparação com o citoplasma, de cor roxa escura (Meinkoth *et al.*, 2008a).

Cada tipo de coloração tem o seu próprio protocolo de procedimentos que deve ser respeitado para que se obtenha o resultado desejado. De forma geral, há certas adaptações que podem ser feitas consoante o tipo de amostra que se pretende analisar. Por exemplo, quanto mais fino for o esfregaço e menor concentração proteica tiver a amostra, menos tempo necessita para corar (Meinkoth *et al.*, 2008a; Friedrichs & Young, 2012).

O corante Azul de Metileno não é tão comummente utilizado mas traz algumas vantagens na observação citológica de alguns nódulos cutâneos, como é o caso dos lipomas, dado que é solúvel em água e não dissolve lípidos. Permite também uma boa visualização de fungos, bactérias e grânulos de mastócitos. Em casos de alta contaminação por sangue da amostra, torna-se útil dado que os eritrócitos são fracamente corados por este corante (Raskin & DeNicola, 2006).

### 1.2.2. AVALIAÇÃO CITOLÓGICA GERAL DE NÓDULOS CUTÂNEOS

A avaliação citológica é uma tarefa visual em que cada clínico, consoante a sua experiência, vai desenvolvendo uma metodologia de estudo e observação organizada de maneira a que obtenha sempre conclusões coerentes e fidedignas (Tvedten, 2012).

Numa primeira abordagem a amostra deverá ser representativa. Para isso, deve-se ser capaz de determinar se existe um número suficiente de células intactas, bem coradas e potencialmente pertencentes à massa. O Médico Veterinário nunca deve basear a sua decisão clínica a partir de resultados de amostras pouco celulares ou com alta incidência de lise celular. Inicia-se a observação microscópica com pouca ampliação para avaliar o tipo de conteúdo e distribuição celular na lâmina. O estudo mais pormenorizado a nível celular deve ser iniciado numa área em que as células se encontrem em monocamada, bem dispersas, intactas e com coloração de boa qualidade. Estas são as zonas mais promissoras de se obter um diagnóstico. No entanto, todos os campos da lâmina devem ser observados, de maneira sistemática, para que se possa chegar a um resultado mais conclusivo (Meinkoth *et al.*, 2008b; Friedrichs & Young, 2012; Tvedten, 2012).

O facto de a amostra ser de celularidade adequada ou não depende também da natureza da massa em estudo. Por exemplo, tumores de origem mesenquimatosa são constituídos por bastante matriz extracelular e tendem a ser menos celulares que tumores epiteliais. O grau de celularidade está diretamente relacionado com a fiabilidade e nível de confiança na interpretação final pelo que os comentários dos resultados obtidos são

expressos na forma de “provável” e “possível” para amostras pouco celulares e expressos como “diagnóstico de” em amostras altamente celulares (Friedrichs & Young, 2012).

De uma forma geral, uma investigação citológica pode ser definida em três fases: diferenciação da lesão como inflamatória ou tumoral; determinação da origem celular (epitelial, mesenquimatosa ou células redondas) ou tipo de tecido; classificação do processo inflamatório ou tumoral mais especificamente (Teske, 2008). O objetivo principal da interpretação citológica de nódulos cutâneos e subcutâneos é categorizar a massa como tecido normal, inflamação, neoplasia ou concluir se as amostras são não diagnósticas. Como causas de ausência de informação citológica aponta-se a falta de material na amostra ou a contaminação excessiva por sangue periférico (Graça, 2007).

Segundo MacNeill (2011), a avaliação citológica de amostras de nódulos cutâneos e subcutâneos pode apresentar quatro aparências básicas: acelular, com débris celular, celular inflamatória ou celular não inflamatória. Uma amostra acelular pode ser devido a falha na recolha ou tratar-se de uma estrutura quística. Citologias com abundante débris celular de tecido lesado ou necrosado são consideradas não diagnósticas e é aconselhado que se volte a recolher amostra de outro local na lesão. Por fim, em amostras celulares, deve conseguir-se determinar se há presença de células inflamatórias. Caso não se trate de um processo inflamatório, deve-se determinar, consoante a morfologia, o tipo celular predominante. A Figura 8 representa um diagrama de interpretação citológica básica para diagnóstico de nódulos cutâneos.

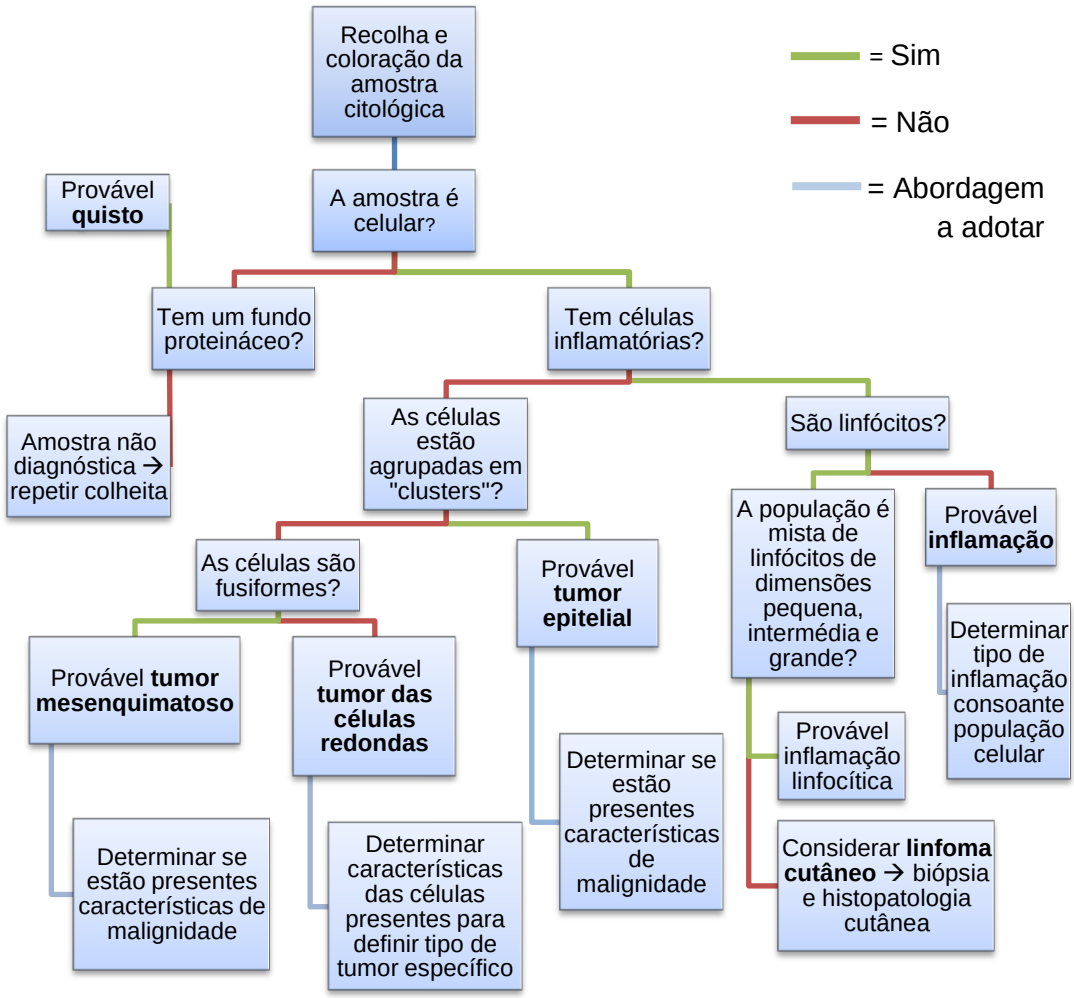



Figura 8: Diagrama das etapas básicas na avaliação citológica. Fonte: adaptado de MacNeill (2011).

É importante estar familiarizado com as características citológicas normais da pele para que se consiga reconhecer alterações anormais. A maioria das preparações da superfície cutânea contém células do epitélio superficial denominadas de queratinócitos. Os queratinócitos são células grandes, poligonais e translúcidas e muitas vezes contêm grânulos de melanina que não devem ser confundidos com bactérias - estas coram sempre de cor azul com a coloração Diff-Quik. Podem ainda observar-se folículos pilosos e microrganismos como leveduras (*Malassezia* spp.) e bactérias (cocos e bacilos) (Patel *et al.*, 2010). É normal que também se observem artefactos e células que o clínico não consiga identificar como, por exemplo, fibroblastos (Tvedten, 2012).

### 1.2.2.1. CARACTERÍSTICAS INFLAMATÓRIAS

As reações inflamatórias são respostas citológicas em que as células inflamatórias são as células predominantes do processo (Harvey & Rebar, 2008).

Na avaliação geral citológica é prudente, em especial para técnicos com pouca experiência, determinar inicialmente se o esfregaço é, de facto, composto na sua totalidade por células inflamatórias. Geralmente, é mais comum recolher amostras de massas inflamatórias que de massas neoplásicas e é também mais fácil para o clínico reconhecer células típicas inflamatórias. A interpretação deve ser baseada em toda a população celular presente e não apenas na observação de um único campo. Caso uma lesão seja constituída apenas por células inflamatórias, deve-se ter perceção das percentagens relativas de cada tipo de célula inflamatória que indica, muito provavelmente, a etiologia do processo. Deve-se também pesquisar para a presença de agentes infeciosos (Meinkoth *et al.*, 2008b; Alleman, 2011).

De uma forma geral, os processos inflamatórios podem ser agrupados em três tipos consoante o género celular predominante: purulenta/neutrofílica, neutrofílica macrofágica ou eosinofílica (Alleman, 2011; Teske, 2008). A inflamação pode ser diferenciada consoante a sua etiologia em bacteriana, parasitária ou fúngica (Teske, 2008).

A inflamação neutrofílica é caracterizada pela presença maioritária, geralmente superior a 85%, de neutrófilos na amostra. Em situações de inflamação crónica a sua percentagem pode diminuir para 30 a 50%. Podem ainda ser observados macrófagos sem que isso indique cronicidade, ao contrário dos plasmócitos e linfócitos que apenas atingem os locais de inflamação 1 a 2 semanas depois (Alleman, 2011; Teske, 2008). Os neutrófilos são células muito frequentemente observadas em citologias e a sua morfologia é muito semelhante à de esfregaços sanguíneos. O seu núcleo cora de roxo escuro e é lobado. Podem ser observadas bactérias fagocitadas e apesar de serem células com grânulos citoplasmáticos, estes não tendem a revelar-se com as colorações citológicas. A alteração mais comummente observada nesta célula é a degenerescência que ocorre em ambientes que sejam lesivos para a célula em si. Isto é uma alteração celular adquirida e não deve ser confundida com sinais de toxicidade como ocorre a nível do sangue periférico nem com neutrófilos envelhecidos. A degenerescência ocorre quando a célula é incapaz de controlar a homeostase e sofre degenerescência hidrópica e a principal característica morfológica observada é aumento do tamanho do núcleo que se torna ligeiramente eosinofílico e perde a sua lobulação, conhecida como cariólise (Meinkoth *et al*, 2008b; Latimer, 2011; Noli, 2011). Este fenómeno ocorre em inflamações severas em que há libertação de substâncias tóxicas e proliferação bacteriana pelo que se deve reforçar uma pesquisa por agentes infeciosos. Ao invés, as alterações de picnose e carioréxis indicam morte celular lenta. O processo de

picnose leva a que o núcleo diminua consideravelmente de tamanho tornando-se numa massa uniforme escura. Quando o núcleo picnótico atinge um ponto em que se desintegra, denomina-se de cariorréxis (Harvey & Rebar, 2008; Teske, 2008; MacNeill, 2011). Na Figura 9 observa-se a citologia de um processo inflamatório do tipo neutrofílico onde se identificam vários neutrófilos juntamente com células epiteliais.

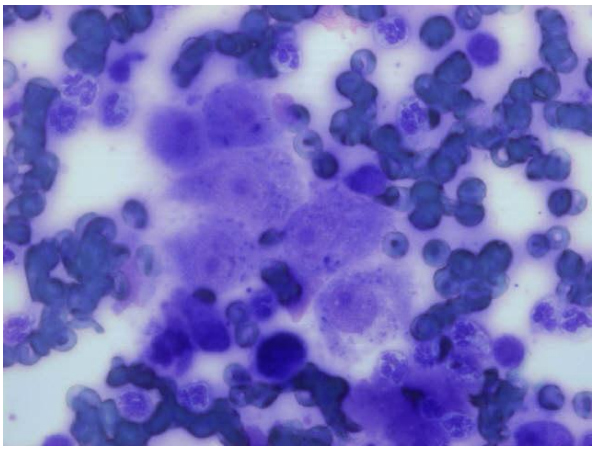


Figura 9: Citologia de inflamação do tipo neutrofílico. Observam-se também algumas células epiteliais (coloração Giemsa, ampliação x400).

Na inflamação neutrofílica macrofágica observam-se menos células polimorfonucleares que na inflamação purulenta e é definida pela presença de neutrófilos e macrófagos que compõem 15% ou mais da amostra, assim como células epitelioides. Nesta situação, os macrófagos também demonstram menos sinais de fagocitose. Clinicamente, está associada a infeções fúngicas, reação de corpo estranho, actinomicose/nocardiose, paniculite e reação local a injeções (Teske, 2008; Alleman, 2011). Os macrófagos derivam dos monócitos sanguíneos. A sua morfologia a nível citológico é muito variável mas são caracterizados pela sua grande dimensão e numerosos vacúolos em que se pode observar material fagocitado. Em processos inflamatórios crónicos, os macrófagos podem apresentar-se binucleados ou multinucleados e passam a ser denominados de células gigantes inflamatórias. Uma vez que a sua aparência é tão inconstante, deve-se ter muito cuidado em avaliações de malignidade uma vez que se podem confundir com uma célula atípica (Meinkoth *et al.*, 2008b; Noli, 2011) Na Figura 10 observa-se a citologia de uma inflamação do tipo neutrofílica macrofágica com evidentes neutrófilos e macrófagos.

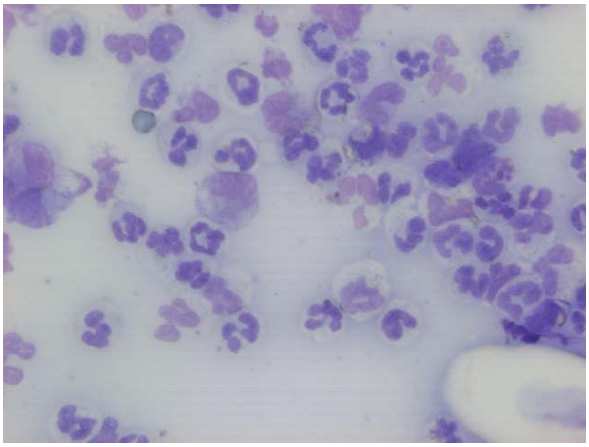


Figura 10: Citologia de um processo inflamatório do tipo piogranulomatoso. Observam-se vários neutrófilos e macrófagos (coloração Giemsa, ampliação x400).

Por fim, assume-se inflamação eosinofílica quando mais de 10% das células inflamatórias presentes são eosinófilos e os processos clínicos a ter em consideração neste caso são reações à presença de parasitas, complexos de granuloma eosinofílico, reações de hipersensibilidade tipo I, infeções fúngicas, reação a corpo estranho, lesões imunomediadas, condições paraneoplásicas e muito raramente, neoplasia linfoide (Alleman, 2011; MacNeill, 2011). Deve-se ter em atenção que infiltrados de eosinófilos também são achados comuns em mastocitomas (Teske, 2008). Os eosinófilos são células ligeiramente maiores que os neutrófilos. O seu núcleo é bilobado e o citoplasma contém grânulos bem distintos, rosa alaranjados, que são menos óbvios à observação microscópica na espécie felina que na espécie canina. Em situações em que durante a colheita da amostra se tenha induzido uma grande lise celular, podem ser observados grânulos espalhados pelo esfregaço (Meinkoth *et al*., 2008b). Estas células são raramente visualizadas em amostras da espécie canina e mais frequentes em lesões da espécie felina pelo que só se tornam relevantes se presentes em grande quantidade (Noli, 2011).

Podem ainda ocorrer situações de respostas inflamatórias mistas em que 50 a 70% das células inflamatórias são neutrófilos e as restantes são monócitos ou macrófagos, sendo raro observar neutrófilos degenerados. Este tipo de reação está associado a irritações menos severas que nas reações purulentas neutrofílicas. Podem representar também a fase final de resolução de uma reação purulenta ou uma resposta inflamatória a um agente pouco agressivo como, por exemplo, *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatiditis* (Harvey & Rebar, 2008).

### 1.2.2.2. CARACTERÍSTICAS NEOPLÁSICAS

O estudo citológico de massas neoplásicas é mais complexo que o de massas inflamatórias. As decisões clínicas efetuadas consoante o resultado citológico obtido podem ser definitivas pelo que é muito importante ter noção da fiabilidade deste. As duas principais questões a ter em conta é se o esfregaço é representativo da lesão e se esta é composta por uma proliferação não inflamatória de células do mesmo tipo, uniformemente, ou não. Quando a amostra contém também muitas células inflamatórias, a certeza de que se trata de facto de uma massa neoplásica é menor. O diagnóstico citológico implica, assim, a identificação do tipo celular de origem e pesquisa de alterações neoplásicas celulares (Fry, 2009; Tvedten, 2012).

O tipo celular de origem é determinado consoante a forma das células, associação com outras células e características do citoplasma. Com a experiência, o patologista torna-se capaz de identificar facilmente as células em estudo. Consoante as suas características, estas podem ser classificadas citologicamente em três categorias: epiteliais, mesenquimatosas ou redondas (Meinkoth *et al.*, 2008b). A informação recolhida da história da lesão e características macroscópicas da massa associadas à morfologia celular pode ser o suficiente para que se consiga especificar o tecido de origem (Tvedten, 2012).

O diagnóstico citológico de uma massa cutânea neoplásica inclui a estimativa da sua malignidade. Os sistemas de estadiamento de malignidade têm como objetivo converter observações subjetivas em medidas quantitativas (Tvedten, 2012). Caso se observem características malignas em número e definição suficientes, pode-se assumir um diagnóstico de neoplasia maligna. Deve-se ter sempre ciente que a presença de um único critério de malignidade não indica malignidade da lesão e singularmente pode estar associado a fenómenos inatos. Considera-se que quando estão presentes três ou mais critérios de malignidade simultaneamente num esfregaço, essa amostra pertence a uma lesão maligna uma vez que um simples processo de hiperplasia não reúne tantas alterações (Meinkoth *et al.*, 2008b; Teske, 2008).

Diferentes tipos de neoplasias vão ter diferentes critérios, tanto para se atingir o diagnóstico como para determinar o seu nível de malignidade. Os critérios citológicos de malignidade tendem a indicar o nível de malignidade geral do tumor. Estão descritas algumas exceções como, por exemplo, em tumores mamários caninos em que a tendência do tumor metastizar ou não é feita por avaliação histológica (Tvedten, 2012). Os fatores citológicos de malignidade podem ser distinguidos entre critérios gerais, critérios nucleares e critérios citoplasmáticos de malignidade (Meinkoth *et al.*, 2008b). As alterações morfológicas observadas em células de cariz maligno, em comparação com a normalidade, estão sumarizadas no Quadro 4.

| Alterações Citomofológicas | Critérios | Neoplasia Benigna | Neoplasia Maligna |
|---|---|---|---|
| **Gerais** | Celularidade | Baixa a moderada | Alta |
| | Pleomorfismo | Ausente ou mínimo | Moderado a alto (anisocitose) |
| **Nucleares** | Tamanho | Uniforme | Variável (anisocitose) |
| | Forma | Uniforme e redondo a oval | Irregular, aspeto denticulado |
| | Número | Geralmente um ou em número par | Múltiplos núcleos em número ímpar ou par |
| | Rátio núcleo: citoplasma | Uniforme | Variável; geralmente aumentado |
| | Nucléolos | Poucos, geralmente redondos e pequenos | Múltiplos, grandes e proeminentes e de forma irregular |
| | Cromatina nuclear | Uniforme | Aglutinada |
| | Figuras mitóticas | Raras e típicas | Muito frequentes e atípicas |
| **Citoplasmáticas** | Basofilia | Mínima | Muito marcada |
| | Vacuolização | Normal em células fagocíticas, secretoras ou em degeneração | Grandes vacúolos muito frequentes |
| | Canibalismo | Ausente | Potencialmente presente |

Quadro 4: Alterações citomorfológicas de malignidade. Fonte: adaptado de DeNicola (2007), Fry (2009) e Rakich & Latimer (2011).

Certos casos clínicos apresentam, na mesma amostra, células do tipo inflamatório e não-inflamatório. Este fenómeno é relativamente comum em lesões cutâneas que se apresentam ulceradas. Observam-se frequentemente características de malignidade em células que estão rodeadas por células inflamatórias pelo que se torna difícil de determinar se as alterações morfológicas observadas nas células não inflamatórias são devido a displasia (secundária à inflamação) ou a anaplasia (secundária a transformações neoplásticas). Nestes casos, as características de malignidade nucleares são mais fidedignas que as citoplasmáticas (MacNeill, 2011).

O melhor indicador de malignidade é a variabilidade nuclear uma vez que o núcleo é menos sujeito a sofrer alterações em processos não neoplásicos (DeNicola, 2007; Meinkoth *et al.*, 2008; Tvedten, 2012). Por isso, os critérios avaliados a nível do núcleo têm maior relevância (Teske, 2008). As células malignas têm geralmente variações nucleares exuberantes, tais como: alta variação do número de núcleos, núcleos muito grandes e variações do tamanho do núcleo. Esta variabilidade a nível nuclear é muito sugestiva malignidade e de fácil reconhecimento a nível citológico (Tvedten, 2012).

As variações do tamanho do núcleo (i.e. anisocariose) e um núcleo de tamanho muito grande (i.e. macrocariólise ou cariomegália) são características de observação óbvia mesmo em esfregaços de fraca qualidade. Quanto mais exacerbadas estiverem estas alterações, maior é o risco de malignidade. A anisocariose é um achado normal em populações de células escamosas que à medida que vão maturando, o seu núcleo vai-se tornando mais pequeno, picnótico, até que acaba por desaparecer (Meinkoth *et al.*, 2008b; Tvedten, 2012).

Em células malignas reativas pode-se observar multinucleação que é uma alteração a ter especial atenção quando se observa concomitantemente anisocariose. A multinucleação ocorre quando se dá multiplicação e divisão nuclear sem divisão celular. Assim, quando se encontra um número ímpar de núcleos dentro de uma célula é um indicador de divisão nuclear atípica e um achado de malignidade bastante importante (Meinkoth *et al.*, 2008b).

O termo anaplasia indica células indiferenciadas e imaturas. Estas tendem a ter um núcleo muito aumentado e pouca quantidade de citoplasma levando a um alto rácio núcleo:citoplasma. Esta observação em células mesenquimatosas e epiteliais é sugestiva de malignidade (Meinkoth *et al.*, 2008b; Tvedten, 2012). A diferenciação celular pode ser avaliada consoante a observação do citoplasma pela maturidade dos grânulos, cílios e forma celular em si. No entanto, as alterações citoplasmáticas são fracos indicadores de malignidade. Um citoplasma basofílico indica síntese proteica ativa e RNA abundante (hipercromasia). Estes fenómenos são comuns em células malignas mas não são exclusivos (Tvedten, 2012).

Alterações bizarras da forma do núcleo são também uma forte evidência de malignidade como, por exemplo, formação de pseudópodes. Os padrões de malignidade da cromatina são caracterizados pela sua variabilidade em tamanho, forma e distribuição dos grânulos de cromatina. Os núcleos ativos têm uma cromatina mais delgada enquanto que um núcleo inativo se apresenta de cor muito escura, tem a sua cromatina condensada e é mais pequeno. Assim, a distribuição, tamanho e forma da cromatina são fortes evidências de malignidade (DeNicola, 2007; Tvedten, 2012).

Os nucléolos são áreas nos núcleos correspondentes à síntese de RNA, de dimensões muito pequenas e raramente visíveis. Quando aumentam de tamanho (macronucleólise) são sugestivos também de malignidade (Meinkoth *et al.*, 2008b).

Processos de mitose são também muito mais frequentemente observados em massas neoplásicas e a observação de figuras mitóticas atípicas é igualmente um indicador de malignidade (Tvedten, 2012). Em populações celulares de tecidos normais é raro observarem-se células em mitose (exceto em tecido linfoide e ósseo, e macrófagos presentes em processos inflamatórios) (Meinkoth *et al.*, 2008b).

Os critérios gerais de malignidade incluem os fenómenos de anisocitose que corresponde à variação do tamanho celular. Já o termo macrocitose refere-se a células de tamanho muito aumentado. As células macrocíticas são mais comummente observadas em tumores epiteliais e estas alterações de dimensão são sempre consideradas atípicas exceto em tecido linfoide normal ou reativo e em células escamosas da pele que podem também apresentar algum grau de anisocitose consoante a sua maturidade e queratinização. Também os macrófagos envolvidos em processos inflamatórios podem exibir diferentes dimensões entre si (Meinkoth *et al.*, 2008b).

Os tumores malignos tendem a ser muito esfoliativos pelo que se considera a hipercelularidade também como um critério de potencial malignidade. Estas células são muitas vezes anaplásticas e indiferenciadas e assim, perdem capacidades de coesão tornando-se livres e fáceis de recolher. Esta característica da lesão deve ser sempre ponderada consoante a aparência da zona de recolha, não se tornando válida, por exemplo, para situações de processos inflamatórios ativos (DeNicola, 2007; Meinkoth *et al.*, 2008b). Uma relação entre células anormal (como fomação de *clusters*) ocorre também em situações de malignidade (Teske, 2008).

O pleomorfismo é o termo que se refere à variabilidade morfológica das células. Este fenómeno é considerado normal quando se tem mais de um tipo celular diferente na mesma amostra. Só deve ser considerado anormal quando se tem uma população uniforme, do mesmo tipo celular. Ainda assim, em amostras que contenham células escamosas este é um fenómeno natural expectável (Meinkoth *et al.*, 2008b). Deve-se ter em atenção que as alterações degenerativas fisiológicas celulares mimetizam certas alterações malignas. O melhor indicador de morte celular é a observação de cromatina com perda da sua aparência granular e pontilhada que se torna pouco definida ou em lista (Tvedten, 2012).

A nível citoplasmático, para além do aumento da basofilia por aumento da atividade celular e consequente de síntese de RNA citoplasmático, podem-se observar situações de vacuolização citoplasmática associadas a processos de degenerescência hidrópica e situações de fagocitose entre células do mesmo tipo (em macrófagos e neutrófilos), mais frequentemente em neoplasias epiteliais (DeNicola, 2007).

A pesquisa destas características em amostras citológicas de nódulos cutâneos requer bastante experiência por parte do patologista que deve ter o cuidado de confirmar a certeza do seu diagnóstico uma vez que influencia por completo a decisão do clínico. Caso não se tenha a certeza da presença ou não de características de malignidade, deve sempre enviar-se uma amostra de tecido obtido por biópsia para histopatologia para confirmação. Deve-se, ainda, ter em consideração que nem todos os tumores exibem sinais de atipia e variabilidade celular. Determinadas neoplasias podem ser constituídas por populações celulares normais mas ter um comportamento biológico agressivo (DeNicola, 2007; Meinkoth *et al.*, 2008b).

Após avaliação dos critérios de malignidade gerais, nucleares e citoplasmáticos para estabelecer o grau de malignidade da lesão, avalia-se as suas características estruturais para tentar classificar o tumor, de uma forma generalista, como carcinoma (neoplasia das células epiteliais), sarcoma (neoplasia das células mesenquimatosas) ou neoplasia das células redondas (Rebar & Harvey, 2008)

## 1.3. NÓDULOS CUTÂNEOS

Os nódulos cutâneos e subcutâneos em cães e gatos podem originar-se essencialmente a partir de três tipos ceulares diferentes: mesenquimatoso, epitelial e de células redondas (Warland & Dobson, 2011).

### 1.3.1. NEOPLASIAS DE ORIGEM MESENQUIMATOSA

As células mesenquimatosas são células de forma alongada formando extensões cónicas ou caudadas em que o citoplasma se estende em uma ou duas direções. Os seus núcleos são mais ovais que as células epiteliais e os bordos celulares são menos demarcados. As estruturas no citoplasma definem a célula. Os melanócitos da pele contêm pigmentos de cor dourada a castanha e os grânulos de melanina podem ter a forma de haste ou serem mais largos e arredondados nos melanófagos (Meinkoth *et al.*, 2008b; Tvedten, 2012). Estas células estão presentes no tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e linfáticos e não esfoliam facilmente quando recolhidas por punção por agulha fina (Meinkoth *et al.*, 2008b; Hauch, 2012). As células mais representativas deste grupo são os fibroblastos e fibrócitos. Em zonas de reação inflamatória ou cicatrização é comum observarem-se fibroblastos reativos e deve-se ter em atenção à sua morfologia citológica que se torna muito

semelhante à de malignidade (Meinkoth *et al.*, 2008b). Na Figura 11 observam-se vários fibroblastos reativos com aparência maligna pertencentes a citologia de uma lesão inflamatória. Frequentemente, este tipo de situações são interpretadas como fibroma ou fibrossarcoma devido aos processos de anisocitose e anisocariose associados. A anamnese e história clínica da lesão são fundamentais para se prever o tipo de processo envolvido. (MacNeill, 2011).

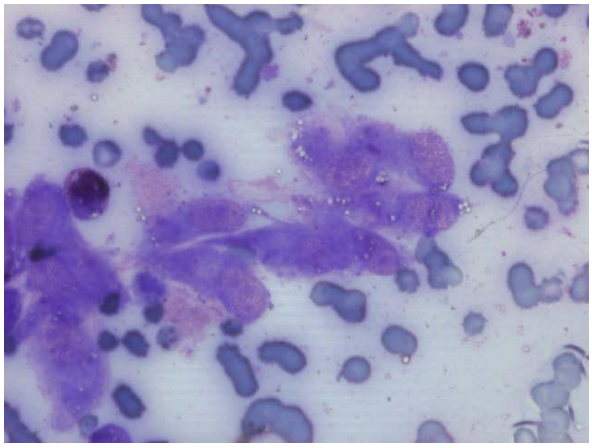


Figura 11: Citologia de nódulo cutâneo inflamatório. Observam-se fibroblastos reativos com sinais semelhantes a características de malignidade (coloração Giemsa, ampliação x400).

Suspeita-se de um processo neoplásico mesenquimatoso quando se obtêm esfregaços com alta celularidade que contêm predominantemente uma população homogénea de apenas células mesenquimatosas. Regra geral, quanto maior o nível de malignidade mais frequentemente se observa a perda da forma celular fusiforme típica, fenómenos de anisocitose, anisocariose e anisonucleólise e visualização mais evidentes dos nucléolos. Os tumores malignos inseridos nesta categoria são denominados de sarcomas ainda que existam outros cuja denominação não segue as mesmas regras de nomenclatura, como é o caso do histiocitoma fibroso maligno e do hemangiopericitoma (Meinkoth *et al.*, 2008b). Segundo MacNeill (2011), em amostras citológicas cujas células mesenquimatosas apresentem no mínimo cinco características de malignidade, são representativas de sarcomas. Estes tumores raramente metastizam mas a sua invasão local pode levar a destruição massiva dos tecidos.

A classificação de algumas neoplasias mesenquimatosas pode ser controversa. Existe uma subclassificação para um grupo de tumores específicos que se denomina de “sarcomas de tecido moles” e inclui o fibrossarcoma, tumores perivasculares, mixossarcoma, rabdomiossarcoma, lipossarcoma, histiocitoma maligno fibroso, sarcoma indiferenciado e Schwannoma, por terem uma apresentação clínica e comportamento

biológico muito semelhantes. A sua distinção a nível histopatológico é muito subtil e muitas vezes impossível apenas por citologia (Scott *et al.*, 2001b; Latimer, 2011). Tal como referido, as células mesenquimatosas, devido ao tipo de adesão que têm entre si, são pouco esfoliativas quando se trata de tumores benignos e é difícil de obter diagnóstico por citologia. No entanto, em lesões malignas obtêm-se geralmente amostras muito celulares (Tyler *et al.*, 2008). Em lesões mesenquimatosas benignas as amostras são, assim, geralmente muito pouco celulares, podendo mesmo existir apenas uma ou duas células representativas em toda a lâmina (Chun, 2011).

No Quadro 5 estão apresentados os tumores de origem mesenquimatosa mais comuns na prática clínica em cães e gatos.

| Origem | Formas Benignas | Formas Malignas |
|---|---|---|
| Fibroblastos | Hamartoma colagenoso; Acrocórdon (pólipo fibroepitelial); Fibroma; Mixoma | Mixossarcoma; Fibrossarcoma |
| Adipócitos | Lipoma | Lipossarcoma |
| Endotélio dos vasos sanguíneos | Hemangioma | Hemangiossarcoma |
| Parede dos vasos sanguíneos | Leiomioma; Tumores Perivasculares; Angioleiomioma; Angiofibroma | Leiomiossarcoma; Angioleiomiossarcoma |
| Nervos periféricos | Tumor da bainha dos nervos periféricos (PNST); Schwannoma | PNST maligno |
| Melanócitos | Melanoma | Melanoma maligno |
| Origem desconhecida | Sarcoma anaplásico de células gigantes (por exemplo: histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes de tecidos moles) | |

Quadro 5: Neoplasias cutâneas mais comuns de origem mesenquimatosa em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011).

### 1.3.2. NEOPLASIAS DE ORIGEM EPITELIAL

Os tumores derivados de tecido epitelial compreendem a maior categoria de neoplasias uma vez que inclui todas as superfícies epiteliais, tais como respiratória, cutânea, gastrointestinal, genitourinária e glandular (Hauch, 2012). No entanto, a sua maioria é de origem benigna (MacNeill, 2011).

É muito frequente observar células epiteliais normais em preparações citológicas de lesões cutâneas, especialmente se recolhidas através de técnicas esfoliativas (Meinkoth *et*

*al.*, 2008b). As células epiteliais formam superfícies através de junções do tipo *tight* intercelular que podem ser observadas a nível do esfregaço podendo formar *clusters* através da membrana basal. As células epiteliais bem diferenciadas podem ter a forma colunar, cuboide, poliédrica ou escamosa e serem ciliadas e são geralmente de grandes dimensões e com uma grande quantidade de citoplasma. Se pertencentes a epitélio glandular, pode ainda observar-se material de secreção como muco, grânulos ou vacúolos. Ainda que a arquitetura tecidual seja frequentemente perdida no processo de recolha para análise citológica, quando se trata de tecido glandular podem ser observadas ainda organizações tubulares ou acinares (Meinkoth *et al.*, 2008b; MacNeill, 2011). Uma vez que estão apenas conectadas entre si e não têm qualquer ligação com matrizes extracelulares, são muito esfoliativas obtendo-se amostras altamente celulares (Hauch, 2012). A nível citológico, estas células podem ser mimetizadas por macrófagos epitelioides e melanócitos pelo que, em caso de dúvida, se deve fazer análise histopatológica da lesão (Tvedten, 2012; Meinkoth *et al.*, 2008b).

As células epiteliais podem ser de grandes dimensões e contêm uma grande quantidade de citoplasma. A sua membrana celular é geralmente bem visível mas pode sofrer alterações consoante o tumor (Hauch, 2012). Podem ser originárias de um neoplasma ou proliferação hiperplásica pelo que, apenas por citologia, se torne complicado distinguir tumores benignos epiteliais de tecido normal ou hiperplásico. Quando se observam estas células com suficientes indicadores de malignidade presentes, o diagnóstico mais presuntivo é carcinoma ou adenocarcinoma. Para detalhes mais específicos, é necessário que se realize um estudo histopatológico. No entanto, o seguimento clínico de um animal pode ser determinado pelo facto de se observarem características citológicas malignas num tumor epitelial (Meinkoth *et al.*, 2008b). As células epiteliais mal diferenciadas têm muito poucas ou nenhumas estruturas identificáveis, adotam uma forma mais arredonda com rácio núcleo:citoplasma aumentado. Em determinadas situações, as células podem perder as junções intercelulares e assemelharem-se a células redondas. Assim, a sua identificação torna-se muito difícil e, mais uma vez, é necessária examinação histopatológica para determinar o tipo de tumor específico (Hauch, 2012).

As neoplasias de origem epitelial mais comuns em cães e gatos estão demonstradas no Quadro 6.

| Origem | Formas Benignas | Formas Malignas |
|---|---|---|
| Epiderme | Papiloma; Tricoblastoma; Acantoma queratinizante infundibular | Carcinoma das células escamosas; Carcinoma das células basais |
| Glândula Sebácea | Adenoma das glândulas sebáceas; Epitelioma sebáceo | Adenocarcinoma das glândulas sebáceas |
| Glândulas Perineais | Adenoma perineal/da glândula hepatóide | Carcinoma perianal/da glândula hepatóide |
| Glândulas Apócrinas | Adenoma/cistoadenoma | Adenocarcinoma |
| Foliculos Pilosos | Tricoepitelioma; Pilomatricoma | |

Quadro 6: Neoplasias cutâneas de origem epitelial mais comuns em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011).

### 1.3.3. NEOPLASIAS DE ORIGEM EM CÉLULAS REDONDAS

As células redondas são um grupo de células que partilham determinadas características tendo em conta que estas se encontram individualmente nos tecidos sem estarem aderidas a outras células ou matriz. A maioria destas células é de origem hematogénea. A capacidade de identificar este tipo de células é muito importante uma vez que são as predominantes nas neoplasias mais comuns em animais de companhia. Ainda, por terem características citológicas muito próprias, pode-se obter o diagnóstico definitivo caso se consiga o seu reconhecimento citológico. Uma vez que as células redondas não estão aderidas a outras estruturas, são geralmente muito esfoliativas e por isso de fácil recolha em amostras obtidas por punção por agulha fina. Os esfregaços são assim de alta celularidade e as células encontram-se bem dispersas (Meinkoth *et al.*, 2008b). Nestas situações, a citologia assume-se como um meio de diagnóstico de elevado valor (MacNeill, 2011). Dado que a interpretação se baseia essencialmente na morfologia celular e que a organização nos tecidos não tem relevância porque estas células não têm qualquer conexão entre si, o diagnóstico torna-se mais evidente por citologia do que por histopatologia (DeNicola, 2007; Rakich & Latimer, 2011). Estas células tendem a ser de tamanho pequeno a médio e de forma redonda. Caso não tenha ocorrido trauma celular aquando todo o processo de recolha, a membrana celular é bem evidente (Meinkoth *et al.*, 2008b). Contudo, consoante o tipo de tumor, o núcleo pode sofrer diferentes alterações pleomórficas (Hauch, 2012). Quando não se consegue diferenciar o tipo de tumor de células redondas apenas por

citologia, podem-se utilizar colorações do tipo imunocitoquímicas para atingir um diagnóstico definitivo (MacNeill, 2011).

Os tumores das células redondas são divididos essencialmente em quatro grupos: linfoma (linfossarcoma) e outras neoplasias das células da linha hematopoiética, mastocitomas, tumor venéreo transmissível e histiocitoma canino e histiocitose maligna. Outros tumores, menos bem definidos, podem também conter células redondas como, por exemplo, melanoma anaplástico, plasmocitoma e carcinoma anaplástico (Meinkoth *et al.*, 2008b; Tvedten, 2012). Os tumores das células redondas mais comuns estão enumerados no Quadro 7.

<table>
<tr><th>Origem</th><th>Formas Benignas</th><th>Formas Malignas</th></tr>
<tr><td>Mastócitos</td><td colspan="2">Mastocitoma</td></tr>
<tr><td>Linfócitos</td><td colspan="2">Linfoma cutâneo; Linfoma epiteliotrópico</td></tr>
<tr><td>Plasmócitos</td><td>Plasmocitoma</td><td rowspan="3"></td></tr>
<tr><td>Células dendríticas</td><td rowspan="2">Histiocitoma cutâneo canino;</td></tr>
<tr><td>Células de Langerhan epidérmicas</td></tr>
<tr><td>Células dendríticas intersticiais e interdigitais</td><td>Histiocitose cutânea</td><td>Sarcoma histiocítico localizado e disseminado</td></tr>
</table>

Quadro 7: Neoplasias cutâneas mais comuns de origem em células redondas em cães e gatos. Fonte: adaptado de Warland e Dobson (2011).

### 1.3.4. LESÕES NÃO INFLAMATÓRIAS NÃO NEOPLÁSICAS MAIS COMUNS

A distinção entre lesões neoplásicas, inflamatórias e processos hiperplásticos por vezes carece de critérios bem definidos e torna-se muito difícil (Scott *et al.,* 2001b). No entanto, de maneira consensual entre a maioria dos autores, o Quadro 8 representa lesões do tipo não inflamatórias e não neoplásicas em cães e gatos.

| Origem | Lesão |
|---|---|
| Epiderme | Quisto dermóide<br>Quisto epidérmico<br>Corno cutâneo<br>Queratose actínica<br>Queratose liquenóide<br>Nevo epidermal |
| Derme | Calcinose cutis<br>Calcinose circunscrita<br>Queratose liquenóide<br>Mucinose cutânea<br>Nevo colagenoso |
| Folicular | Quisto folicular<br>Nevo folicular |
| Glândulas Sebáceas | Quisto sebáceo<br>Nevo sebáceo |
| Glândulas Apócrina | Quisto apócrino<br>Nevo apócrino |

Quadro 8: Lesões não inflamatórias não neoplásicas em cães e gatos. Fonte: adaptado de Scott *et al.* (2001b), Gross, (2005) e Paterson (2008).

#### 1.3.4.1. QUISTOS EPIDÉRMICOS E FOLICULARES

Os quistos epidérmicos são tumefações com revestimento epitelial que podem resultar de implantação traumática de material queratinoso de origem epidérmica para dentro da derme. Os quistos foliculares podem resultar de oclusões traumáticas do canal folicular resultando na acumulação de material pilosebáceo. Ambos são clinicamente indistinguíveis entre si e de outros tumores benignos foliculares ou epidérmicos (Nuttal *et al.*, 2009). As lesões quísticas são consideradas das mais comuns dentro do tipo não inflamatório não neoplásico, em cães e gatos (Scott *et al.,* 2001b). Na Figura 12 observa-se um nódulo cutâneo com aparência quística.



Figura 12: Nódulo cutâneo do tipo quístico na extremidade distal do membro anterior de um cão.

Estas lesões são comuns em cães e raras em gatos, sem predisposição de idade ou sexo sendo, no entanto, mais observado na raça Boxer, Shih Tzu, Schnauzer e Basset Hound (Medleau & Hnilica, 2003; Blackwood, 2011). Os quistos epidérmicos têm margens bem definidas, são indolores e de tamanho até 5 cm de diâmetro. Podem surgir em qualquer parte do corpo apesar de serem mais comuns na zona do tronco lateral e dorsalmente. Ocasionalmente, pode haver um poro patente a fazer conexão com a superfície. O conteúdo pode rupturar à superfície e ser moderadamente granular ou pastoso e de cor amarela-cinza.

Os quistos foliculares geralmente são detetados nos membros e cabeça, são mais pequenos e de maior consistência que os epidérmicos com apenas 2 a 5 cm de diâmetro, em média (Medleau & Hnilica, 2003; Nuttal *et al.*, 2009). Surgem também em pontos de pressão e locais com cicatriz devido ao encarceramento folicular (Blackwood, 2011). As raças Boxer, Shih Tzus, Dobermmans e Schnauzer Miniatura são predispostos a múltiplos quistos. Múltiplos quistos, pequenos e esbranquiçados podem também ser uma alteração pós-inflamatória, especialmente em pontos de pressão, ou podem advir de uma terapia prolongada por glucocorticóides. Os quistos rupturados libertam material queratinoso para a derme, onde atua como corpo estranho causando uma reação inflamatória e desconforto ao animal. Quistos infetados demonstram, obviamente, inflamação com aumento da temperatura local, inchaço, dor e ocasionalmente descargas purulentas (Medleau & Hnilica, 2003; Nuttal *et al.*, 2009).

A citologia por punção por agulha fina pode não ser diagnóstica e geralmente revela uma grande quantidade de queratina, como se observa na Figura 13. Podem também ser

observados queratinócitos agrupados e comprimidos, completamente diferenciados, detrito amorfo e fragmentos de folículos pilosos (LeBlanc, 2011).

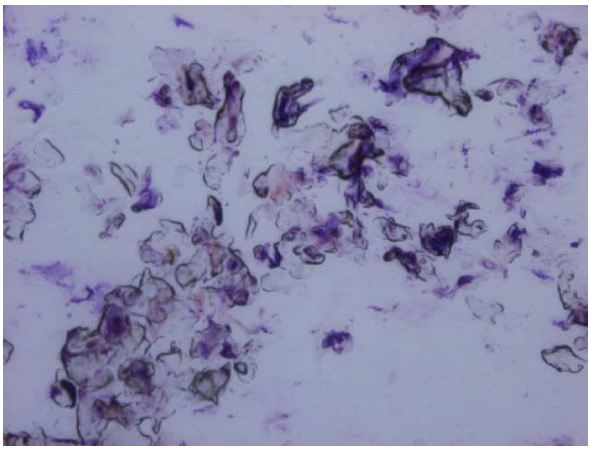


Figura 13: Citologia de um nódulo cutâneo quístico: observação de um fundo proteináceo abundante (coloração Giemsa, ampliação x100).

Estes quistos também contêm frequentemente cristais de colesterol que se formam pela rutura das membranas celulares (MacNeill, 2011). Quando se observam células epiteliais imaturas nucleadas deve-se fazer uma pesquisa mais exaustiva por critérios de malignidade. Por vezes, nas preparações, pode ser notável um fundo rosa proteináceo onde se identificam esporádicas células epiteliais e/ou mesenquimatosas com algumas células sanguíneas, tal como está demonstrado na Figura 14. Estes achados indicam que a punção foi feita ou num tecido edemaciado, num tumor muito pouco esfoliativo ou num quisto seroso tipo seroma ou higroma (Teske, 2009).

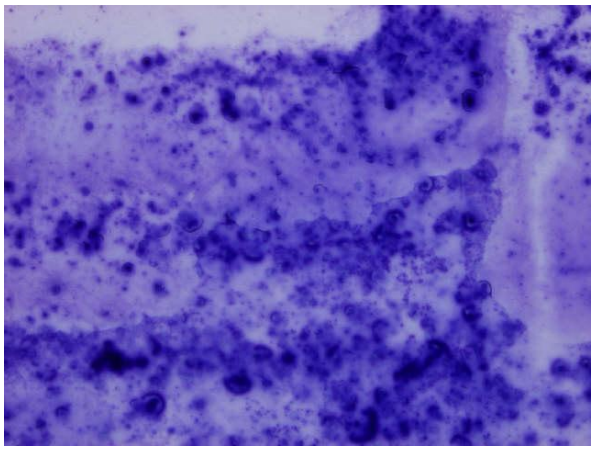


Figura 14: Citologia de um nódulo cutâneo quístico onde se observa grande quantidade queratina sem presença de células (coloração Giemsa, ampliação X100).

Neutrófilos e bactérias podem também estar presentes em lesão inflamadas e infetadas. O exame histopatológico de amostras excisadas confirma o diagnóstico clínico e exclui a hipótese de neoplasia epidermal ou folicular observando-se uma estrutura quística

preenchida com lâminas de queratina recobertas por um epitélio escamoso estratificado queratinizado típico (Medleau & Hnilica, 2003; Nuttal *et al.*, 2009; LeBlanc, 2011).

## 1.4 OBJETIVOS

Tendo em conta a revisão bibliográfica realizada e na tentativa de colmatar a falha de informação específica sobre a fiabilidade comparativa das duas técnicas de recolha, PAAF e PNAAF, o presente estudo foi desenvolvido de maneira a serem apurados os seguintes objetivos:

Objetivo Geral:

Determinar se existem diferenças significativas na obtenção de diagnóstico citológico recorrendo às técnicas de recolha por PAAF e PNAAF em nódulos cutâneos e subcutâneos.

Objetivos Específicos:

Avaliar a prevalência de nódulos cutâneos consoante espécie, raça, idade, género e estado fértil do animal;

Avaliar a prevalência de nódulos cutâneos consoante a zona do corpo;

Associar a dimensão do nódulo, diferentes consistências, mobilidade, processos de ulceração e alteração de cor da pele à capacidade de obtenção de diagnóstico citológico;

Determinar se alguma das técnicas fornece algum tipo de vantagem comparativa em termos de:

- capacidade de obtenção de amostra representativa,
- grau de densidade celular,
- capacidade de identificação celular para classificação das lesões como inflamatórias ou neoplásicas e seus subtipos,
- capacidade ou não de fornecer um possível diagnóstico definitivo,
- menor grau de contaminação por células sanguíneas,
- facilidade na execução para o operador.

# 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. POPULAÇÃO DE ANIMAIS

O presente estudo foi realizado durante o estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e teve como objectivo o estudo de nódulos cutâneos e subcutâneos em pacientes apresentados à consulta médico-veterinária no Hospital de Referência Veterinária Montenegro e Clínica Veterinária Montenegro, no Porto. As amostras foram recolhidas durante o período de 3 de Setembro de 2012 a 28 de Fevereiro de 2013, de 18 animais.

O único critério de inclusão considerado foi a presença de nódulo cutâneo ou subcutâneo passível de ser puncionado pelas duas técnicas em estudo – PNAAF e PAAF.

Não foi feita qualquer seleção de animais consoante espécie, raça, idade, sexo ou estado fértil.

## 2.2. PROTOCOLO DE COLHEITA DAS AMOSTRAS

Ao longo do estudo, os dados foram apontados numa ficha clínica de registo elaborada para este estudo (Apêndice A).

Para cada animal acometido, foram registados os seguintes dados:

- Nome
- Nome do proprietário
- Espécie
- Raça
- Idade (em anos)
- Género
- Estado Fértil

Para cada nódulo, em termos macroscópicos, foram registados os seguintes parâmetros:

- Localização anatómica
- Dimensão (em cms)
- Consistência

- Ausência/presença de sinais sugestivos de prurido
- Mobilidade
- Ulceração
- Alteração da cor da pele

Considerou-se um nódulo como prurítico sempre que se observaram sinais típicos ou que estes tenham sido relatados pelo proprietário, tais como: tendência do animal para se coçar, lamber ou esfregar a zona acometida e lesões compatíveis com auto-traumatismo.

Foi registado estar associada alteração da cor da pele sempre que o nódulo se exibisse com hiperpigmentação, despigmentação ou eritema cutâneo.

Colheita das Amostras

Para colheita das amostras, recorreu-se ao uso de agulhas hipodérmicas de 23 gauge x 1´´ estéreis, seringas de 10 ml e lâminas de vidro para microscopia.

Técnica de PAAF

Para execução da técnica, o nódulo foi isolado e imobilizado manualmente. Para obtenção de amostra pela técnica de PAAF, a agulha era previamente acoplada à seringa, inserida no tumor, direcionada ao centro da lesão e executados alguns movimentos de "vai-vém" em diferentes ângulos exercendo sempre pressão negativa para promover a aspiração de material. Depois de aliviar a pressão, retirava-se a agulha, desacoplavam-se as duas partes para encher a seringa de ar, voltava-se a acoplar a seringa e a agulha e exercia-se pressão positiva de maneira a que o material recolhido fosse expelido para uma lâmina de vidro.

Técnica de PNAAF

Para realização da PNAAF, a técnica de execução era semelhante à anterior com exceção de que se introduzia apenas a agulha no tumor, sem esta estar acoplada à seringa, para permitir a obtenção de amostra apenas por capilaridade. Apenas depois de retirar a agulha do nódulo se acoplava uma seringa previamente cheia de ar para expelir o material para uma lâmina de vidro.

Por fim, em ambas as técnicas, procedeu-se ao esfregaço através da técnica de esmagamento com auxílio de outra lâmina de vidro limpa. Todas as lâminas eram identificadas com o número correspondente do nódulo e técnica de recolha utilizada.

Estas técnicas encontram-se descritas com maior detalhe na revisão bibliográfica desta dissertação.

## 2.3. PROTOCOLO LABORATORIAL ADOTADO

1. As amostras foram deixadas a secar ao ar e fixadas por metanol, mergulhando as lâminas em solução de metanol durante 5 minutos.
2. A coloração das amostras foi feita por impregnação pelo corante de Giemsa numa diluição de 1/10 com água destilada, durante 5 minutos.
3. Por fim, as lâminas foram passadas por água fria corrente e limpas com papel de filtro para remover o excesso de corante.

Avaliação Microscópica

A observação ao microscópio foi iniciada na ampliação mais baixa, X100, para avaliar presença ou ausência de amostra na lâmina assim como a sua distribuição geral. Na ampliação seguinte, X400, avaliou-se a presença ou ausência de células representativas da lesão. Em caso de presença, avaliaram-se as amostras em questões de celularidade e densidade representativa.

Em maior ampliação, X600, procedeu-se à identificação das células presentes em maioria para classificar a massa como sendo de natureza inflamatória ou tumoral.

Sempre que possível, fez-se identificação mais pormenorizada das células e quando necessário, usou-se a maior ampliação, X1000, com óleo de imersão, e classificaram-se as lesões inflamatórias como sendo do tipo neutrofílica, piogranulomatosa ou eosinofílica. No caso de lesão tumoral, avaliou-se como sendo de origem epitelial, mesenquimatosa ou de células redondas.

As amostras foram consideradas não representativas quando, apenas por citologia, não permitiram diferenciar o tipo de nódulo em estudo e incluiu todas aquelas em que se observou apenas células sanguíneas, substância amorfa e/ou queratina e células não identificáveis em agregados muito densos. Assim, para o presente estudo, foram apenas apreciadas amostras com conteúdo celular identificável.

Cada nódulo foi avaliado independentemente e categorizado como classificável ou não classificável. O termo “não-classificável” foi empregue a nódulos em que se obtiveram citologias com alta contaminação sanguínea e/ou que, independentemente da técnica, não foi permitida a identificação clara de células potencialmente representativas, tanto em quantidade como em qualidade, para determinar o tipo de massa. Quando classificável,

consoante o tipo celular predominante, os nódulos foram definidos como sendo do tipo inflamatório ou tumoral.

Foi feita avaliação da densidade celular em cada citologia com amostra representativa. Foram avaliadas como “amostras de baixa celularidade” quando o campo microscópico mais representativo da lesão era preenchido até um máximo de 25% por células representativas; “amostras de celularidade moderada” em citologias com campos com 25% a 50% de células representativas; e “amostras de alta celularidade” se se observaram campos com mais de 50% de células representativas, na ampliação de X400.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Secretariado Geral da Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

## 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para efeitos de análise estatística, foi utilizado o software SPSS Statistics, em que se assumiu um nível de significância de 95% ($\alpha$=0,05). Os dados foram comparados entre si utilizando testes do tipo não-paramétricos: teste de Fisher, teste de Mann-Whitney e teste de Qui-quadrado ($x^2$).

# 3. RESULTADOS

## 3.1. ANÁLISE DA POPULAÇÃO

### 3.1.1. ESPÉCIE E IDADE

A população em estudo consistiu num total de 18 animais, em que 6% (1/18) foram da espécie felina e 94% (17/18) da espécie canina. A idade dos animais variou entre 1 ano e 16 anos, sendo a média de 10,2 anos.

### 3.1.2. GÉNERO E ESTADO FÉRTIL

Na população, 50% (9/18) dos animais eram machos, dos quais 22% (2/9) eram esterilizados e 78% (7/9) inteiros. As fêmeas constituiram 50% (9/18) da amostra, das quais 22% (2/9) eram esterilizadas e 78% (7/9) inteiras.

### 3.1.3. RAÇA

Dos animais testados, a maioria era de raça pura, perfazendo 67% (12/18) da população. Os restantes eram de raça indefinida representando 33% (6/18). Dos animais de raça pura, 33% (4/12) eram da raça Labrador Retriever, 17% (2/12) Dobberman, 8% (1/12) Schnauzer Gigante, 8% (1/12) Caniche, 8% (1/12) Shar Pei, 8% (1/12) Bull Terrier 8% (1/12) Basset Hound e 8% (1/12) Boxer.

## 3.2. ANÁLISE DERMATOLÓGICA – NÓDULOS CUTÂNEOS

Para realização do estudo, foram recolhidas amostras de um total de 30 nódulos cutâneos. Da população estudada, em 50% (9/18) dos animais foram recolhidas amostras de apenas um nódulo, em 33% (6/18) foram recolhidas amostras de dois nódulos pertencentes ao mesmo animal, e em 17% (3/18) foram recolhidas amostras de três nódulos. Em média, foram submetidos para estudo 1,7 nódulos por paciente.

### 3.2.1. LOCALIZAÇÃO ANATÓMICA

Em termos de localização anatómica (Gráfico 1), 27% (8/30) dos nódulos localizavam-se ao nível do dorso, 13% (4/30) no membro anterior proximal, 13% (4/30) na zona perianal, 10% (3/30) no pescoço, 10% (3/30) no tórax, 10% (3/30) no abdómen, 7% (2/30) na zona da cabeça, 7% (2/30) no membro anterior distal, e 3% (1/30) no membro posterior proximal.

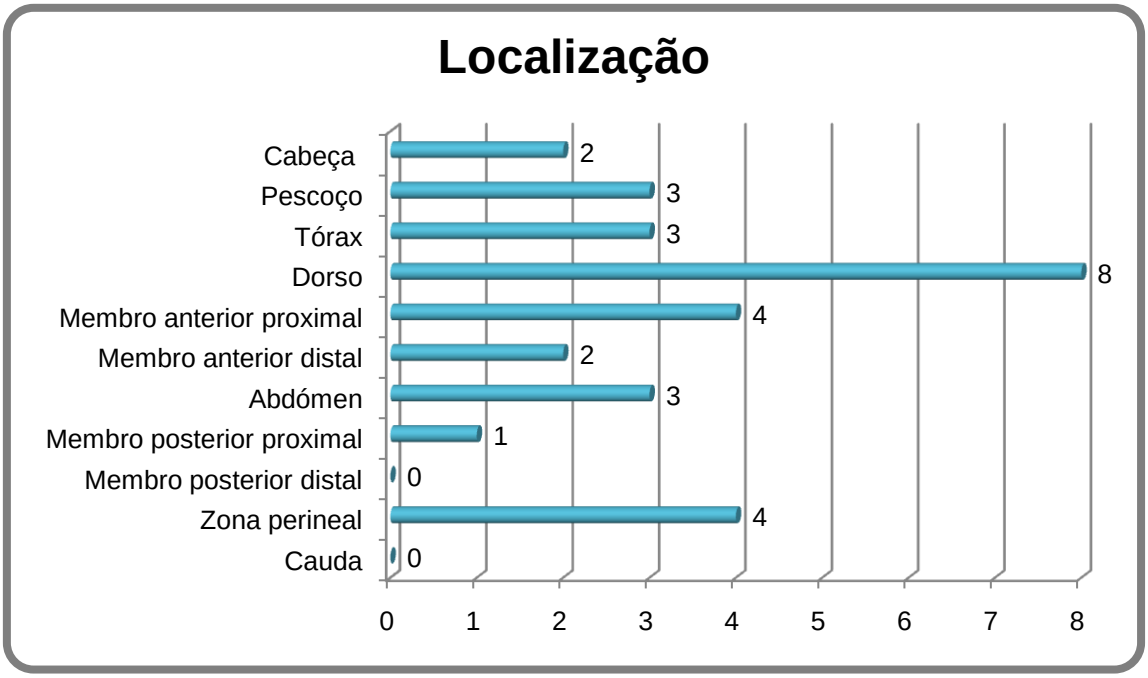



Gráfico 1: Distribuição dos nódulos por localização anatómica.

### 3.2.2. DIMENSÃO

O tamanho dos nódulos cutâneos variou entre 1 cm e 10 cm de diâmetro, com uma média de 3,18 cm e um desvio padrão de 2,1.

### 3.2.3. CONSISTÊNCIA

Em termos de consistência, os nódulos foram classificados como firmes em 50% (15/30) dos casos e como moles em 50% (15/30) dos casos.

### 3.2.4. PRURIDO

Quanto à exibição de sinais de prurido local, não foram registados animais com prurido, pelo que 100% dos nódulos foram classificados como não pruríticos.

### 3.2.5. MOBILIDADE

Em termos de mobilidade (Gráfico 2), 73% (22/30) dos nódulos eram móveis e 27% (8/30) eram não-móveis.

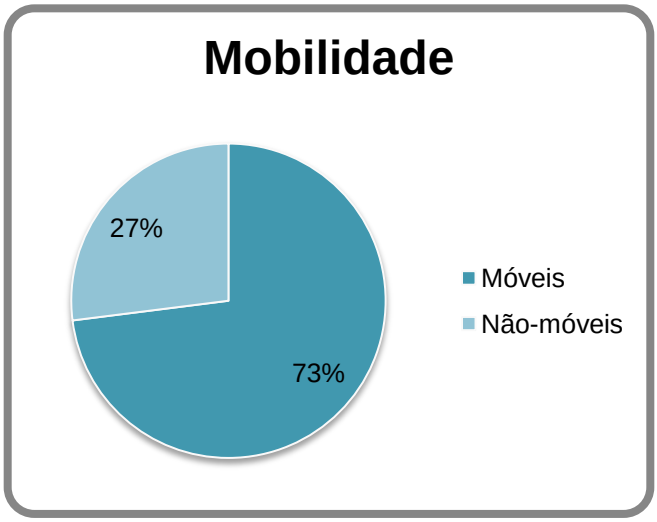



Gráfico 2: Avaliação dos nódulos quanto à sua mobilidade.

### 3.2.6. ULCERAÇÃO

Quanto à presença de ulceração (Gráfico 3), 27% (8/30) dos nódulos apresentavam-se ulcerados e 73% (22/30) dos nódulos não tinham quaisquer sinais de ulceração.

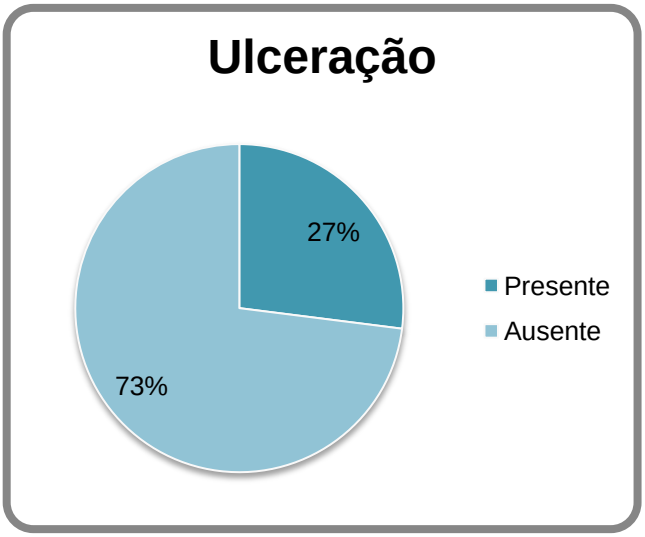



Gráfico 3: Avaliação dos nódulos quanto à presença de sinais de ulceração.

### 3.2.7 ALTERAÇÃO DE COR

Em termos de cor (Gráfico 4), 70% (21/30) dos nódulos apresentava alterações e 30% (9/30) dos nódulos não tinham qualquer alteração.

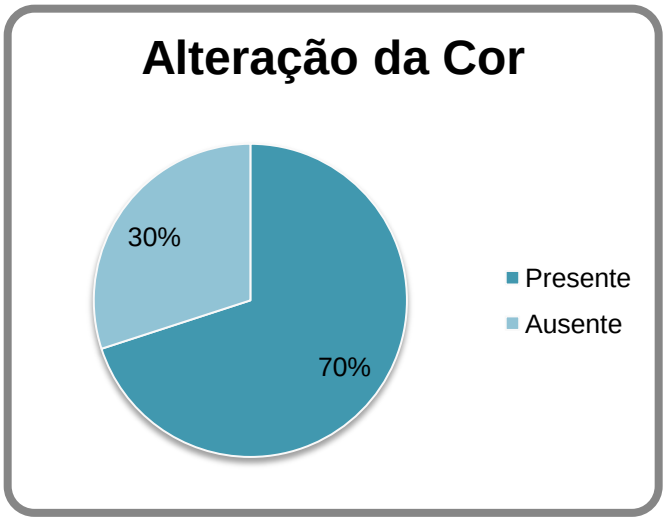



Gráfico 4: Avaliação dos nódulos quanto à alteração da cor cutânea.

## 3.3 ANÁLISE CITOLÓGICA

**Capacidade de Classificação do Nódulo – por identificação conjunta das citologias par a par**

No presente estudo, dos 30 nódulos analisados, 33% (10/30) foram considerados como não classificáveis e 67% (20/30) como classificáveis. Destes últimos, 10% (2/20) eram do tipo inflamatório e 90% (18/20) do tipo tumoral (Gráfico 5).

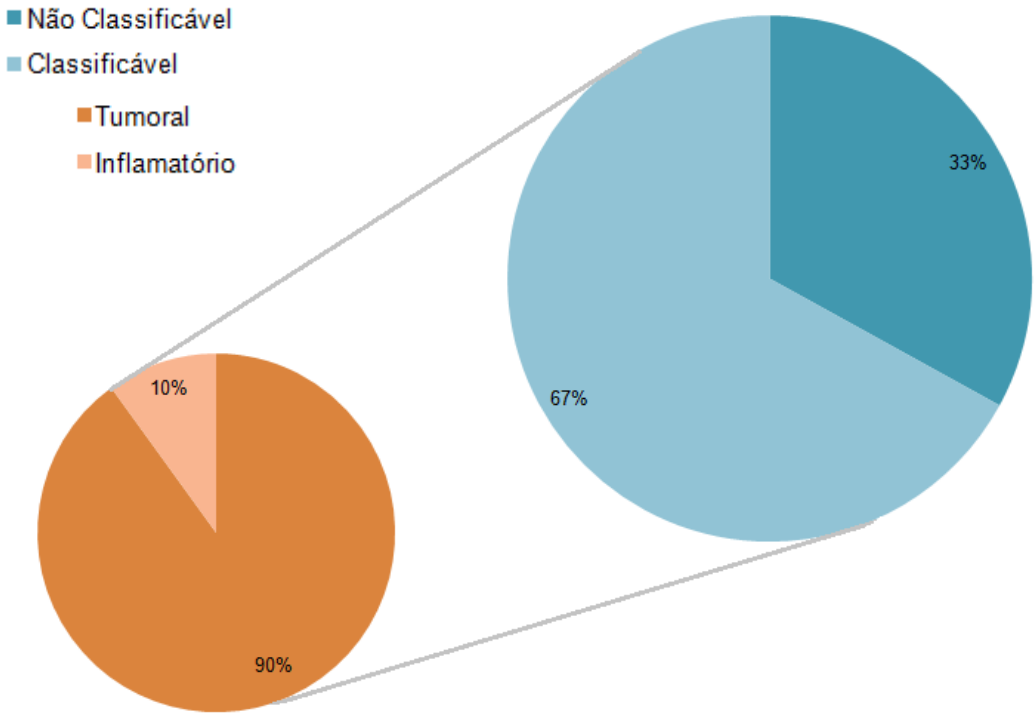



Gráfico 5: Capacidade de classificação dos nódulos cutâneos citologicamente.

As massas tumorais (n=18) foram subdivididas como sendo de origem em células epiteliais em 39% (7/18), em células mesenquimatosas em 39% (7/18) e em células redondas em 22% (4/18) (Gráfico 6). De todas as massas identificadas como inflamatórias (n=2), 50% (1/2) eram do tipo neutrofílico e 50% (1/2) do tipo piogranulomatoso (Gráfico 7).

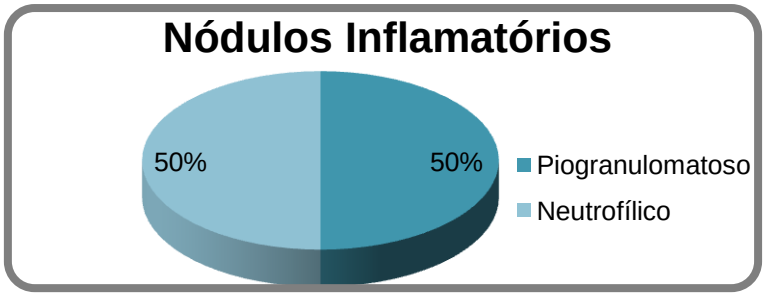



Gráfico 6: Distribuição dos nódulos tumorais consoante células de origem.

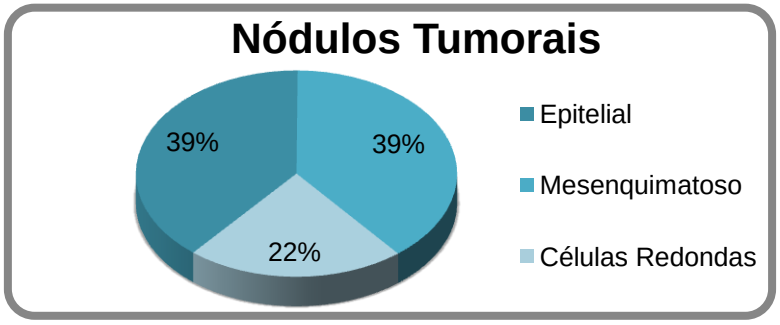



Gráfico 7: Distribuição dos nódulos inflamatórios consoante células predominantes.

A Figura 15 representa uma citologia obtida do caso clínico número 26 compatível com lipoma, um tumor de origem mesenquimatosa.

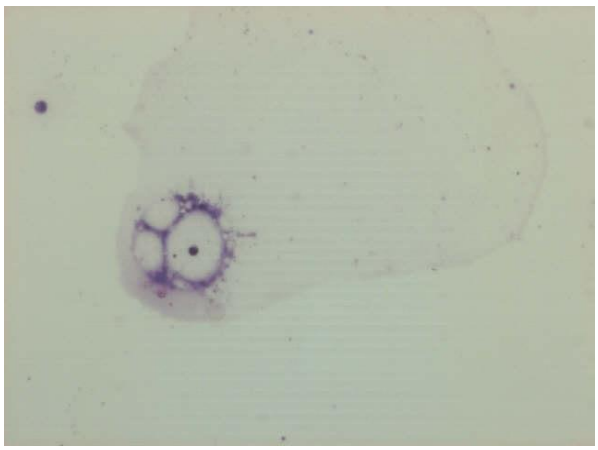


Figura 15: Citologia compatível com lipoma. Observação de gotícula de gordura e adipócito, no centro do campo microscópico (coloração Giemsa, ampliação X100).

A Figura 16 representa uma citologia obtida do caso clínico número 17 compatível com mastocitoma, um tumor de origem nas células redondas

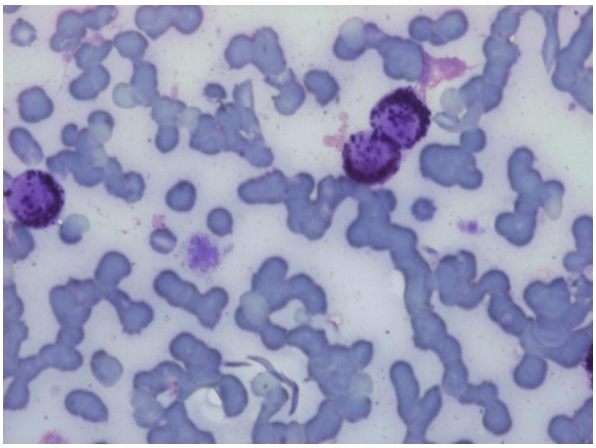


Figura 16: Citologia compatível com mastocitoma. Observam-se mastócitos com os seus grânulos citoplasmáticos basofílicos bem evidentes. (coloração Giemsa, ampliação X400).

**Comparação entre a capacidade de identificar o tipo de massa citologicamente consoante as características físicas macroscópicas do nódulo cutâneo (Tabela 1)**

| | | Possível | Impossível | *p*-value |
|---|---|---|---|---|
| **Consistência Física** | Mole | 67% | 33% | 1,000 |
| | Firme | 67% | 33% | |
| **Mobilidade** | Móvel | 64% | 36% | 0,682 |
| | Não-móvel | 75% | 25% | |
| **Ulceração** | Presente | 63% | 37% | 1,000 |
| | Ausente | 68% | 32% | |
| **Alteração de Cor** | Presente | 62% | 36% | 0,675 |
| | Ausente | 78% | 22% | |

Tabela 1: Resultados comparativos entre a possibilidade de identificação do tipo de massa e variáveis físicas dos nódulos.

Consistência Física

A capacidade de identificar o tipo de massa foi igual, independentemente da consistência à palpação do nódulo. Tanto nos de consistência mole (n=15) como nos de consistência firme (n=15) foi possível identificar o tipo de massa em 67% (10/15) dos nódulos. O teste de Fisher revelou não haver diferenças significativas na obtenção do tipo de massa consoante a consistência do nódulo (*p*=1,000).

Mobilidade

Quanto à mobilidade, em 64% (14/22) dos nódulos considerados como móveis (n=22) foi possível identificar o tipo de massa. Em nódulos considerados como não-móveis (n=8), obteve-se o tipo de massa em 75% (6/8). Através do teste de Fisher, as diferenças não são consideradas estatisticamente significativas (*p*=0,682).

Presença de Ulceração

Foi possível identificar o tipo de massa a nível citológico em 63% (5/8) dos nódulos ulcerados (n=8). Em nódulos sem quaisquer sinais de ulceração (n=22), foi identificado o tipo de massa em 68% (15/22) dos casos. Pelo teste de Fisher, conclui-se que não existem diferenças tendo em conta a presença ou ausência de sinais de ulceração (*p*=1,000).

Alterações da Cor

Em nódulos em que se registaram alterações da cor (n=21), obteve-se o tipo de massa por citologia em 62% (13/21). Quando não se observaram alterações na cor (n=9),

obteve-se o tipo de massa em 78% (7/9). Através do teste de Fisher, não se considera haver diferenças estatisticamente relevantes (*p*=0,675).

Dimensão

Segundo o teste de Mann-Whitney, em nódulos admitidos como classificáveis (n=20), a média da dimensão foi de 3,43 com um desvio padrão de 2,3 e valor mínimo de 1 e valor máximo de 10. Em nódulos cujo tipo de massa foi não classificável (n=10), a média de dimensão foi de 2,7 com um desvio padrão de 1,64 e valor mínimo de 1 e valor máximo de 6. A variação dos valores não tem significado estatístico que demonstre que a dimensão é um parâmetro influente (*p*=0,448).

**Presença de Células Representativas**

De todas as amostras recolhidas, foram obtidas citologias com celularidade potencialmente representativa da lesão em 60% (36/60) dos casos. As restantes 40% (24/60) não permitiram ser avaliadas em quaisquer outros parâmetros pelo que foram considerados como não aplicáveis. Contribuem, no estudo, para o grupo de amostras que não permitiram obter diagnóstico citológico.

Presença de células representativas – Comparação entre PNAAF e PAAF

Em comparação, ambas as técnicas obtiveram número igual de citologias com células representativas presentes na amostra. Ou seja, em cada técnica, 60% (18/30) das amostras foram consideradas representativas. O teste de Fisher indica não haver qualquer diferença entre as duas técnicas para este parâmetro (*p*=1,000).

**Densidade Celular**

Em termos de densidade celular geral, as amostras citológicas, independentemente da técnica utilizada, foram consideradas como sendo de baixa densidade em 28% (17/60) dos casos, de densidade moderada em 15% (9/60) e de alta densidade em 17% (10/60). Os restantes 40% (24/60) correspondem às amostras em que a presença de células representativas foi nula.

Densidade celular – Comparação entre PNAAF E PAAF

Fazendo um estudo comparativo entre as duas técnicas, pela técnica de PNAAF obtiveram-se 26% (8/30) amostras de baixa densidade, 17% (5/30) de densidade moderada e 17% (5/30) de alta densidade. Os restantes 40% (12/30) correspondem a amostras sem células representativas. Pela técnica de PAAF obtiveram-se 30% (9/30) amostras de baixa densidade, 13% (4/30) de densidade moderada e 17% (5/30) de alta densidade. Os restantes 40% (12/30) correspondem a amostras sem células representativas (Gráfico 8). Pelo teste de $x^2$, não existem diferenças estatisticamente significativas ($p$=0,982).

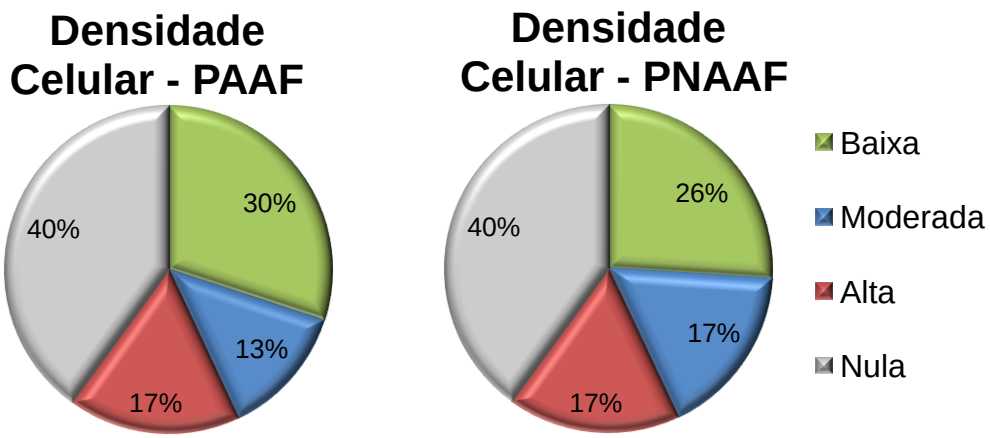



Gráfico 8: Proporção dos níveis de densidade celular obtidos pelas técnicas de PNAAF e PAFF.

**Capacidade de Classificação do Nódulo – por identificação independente em cada citologia**

De todas as amostras citológicas recolhidas, foi possível determinar o tipo de massa como inflamatória ou tumoral em 60% (36/60).

Capacidade de Classificação do Tipo de Massa - Comparação entre PNAAF E PAAF

Em termos comparativos, as massas foram consideradas como classificáveis em 60% (18/30) das amostras recolhidas pela técnica de PNAAF e em 60% (18/30) das recolhidas por PAAF. Pelo teste de Fisher, conclui-se que não existem diferenças entre as duas técnicas ($p$=1,000).

**Obtenção de Diagnóstico**

A obtenção de um diagnóstico definitivo foi possível em 35% (21/60) das amostras recolhidas e considerado inconclusivo em 65% (39/60). Estas amostras permitiram, assim, o diagnóstico definitivo em 40% (12/30) dos tumores cutâneos analisados. Os diagnósticos

definitivos obtidos por citologia, neste estudo, foram: lipoma (6/12), mastocitoma (4/12), neoplasia epitelial sebácea maligna (1/12) e neoplasia epitelial maligna (1/12).

Obtenção de diagnóstico – Comparação entre PNAAF E PAAF

Das amostras em que foi possível determinar o diagnóstico, 52% (11/21) foram obtidas pela técnica de PNAAF e 48% (10/21) foram obtidas pela técnica de PAAF. Pelo teste de Fisher, conclui-se que não existem diferenças na obtenção de diagnóstico, independentemente da técnica de recolha utilizada ($p$=1,000).

# 4. DISCUSSÃO

As amostras recolhidas foram na sua maioria em animais da espécie canina, sendo que foi estudado apenas um nódulo pertencente a um gato. Esta observação deveu-se ao facto de os gatos serem animais de manipulação e contenção mais difícil para o operador o que levou frequentemente à impossibilidade da realização das técnicas. Também, tal como suporta o estudo de Dorn *et al.,* 1968, um dos maiores estudos epidemiológicos de tumores cutâneos em cães e gatos, a espécie felina é menos propensa a desenvolver nódulos cutâneos que a canina.

De todas as amostras recolhidas, as zonas do dorso e braço foram as que registaram maior número de nódulos cutâneos. Esta observação pode dever-se ao facto de se tratarem de áreas do corpo de maior visibilidade para o proprietário. Também, segundo Blackwood (2011) e na literatura geral, estas são das áreas mais frequentemente acometidas por nódulos cutâneos, independentemente da etiologia.

Em termos físicos macroscópicos dos nódulos cutâneos, observou-se que a consistência, mobilidade, dimensão, presença de ulceração e alteração da cor não interferem na capacidade de obtenção de um diagnóstico citológico. Poderia ser sensato assumir que em nódulos mais difíceis de manipular, como sejam os de menor dimensão ou de consistência muito branda ou muito firme, ter-se-ia maior dificuldade na execução da técnica de recolha para obtenção de amostra de qualidade. No entanto, segundo os resultados deste estudo, tal não se verifica. A amostra em estudo foi demasiado pequena para se poder associar a frequência de cada alteração física aos tipos de massa identificada.

Neste estudo, obteve-se igual número de amostras consideradas próprias para análise, ou seja, com presença de células potencialmente representativas, por ambas as técnicas. Em termos de densidade celular, que está diretamente relacionada com a facilidade e precisão em estabelecer um diagnóstico citológico, as amostras citológicas obtidas variaram sem diferenças significativas entre si, como sendo de baixa, moderada ou alta celularidade. Entre cada técnica não foram registadas, também, quaisquer vantagens quantitativas quanto à sua celularidade. Dada a pequena dimensão da amostra, não foi possível realizar um estudo estatístico que relacionasse o tipo de tumor com a celularidade que este fornece nem foi confrontada a capacidade na obtenção de diagnóstico tendo em conta o nível de celularidade de cada amostra. Na área da Medicina Humana, Ramachandra *et al.* (2011) atribuiu melhores resultados tanto em termos de celularidade como de

qualidade das amostras obtidas por PNAAF. No estudo veterinário de LeBlanc *et al.* (2009), as amostras citológicas obtidas por PNAAF foram também notavelmente de maior celularidade. No entanto, este estudo, que é o único existente na área da Medicina Veterinária que compara as duas técnicas, foi aplicado em amostras de baço e os autores não consideraram a presença de sangue nas amostras como sendo contaminante. Ainda assim, a presença de células nucleadas relativamente à quantidade de sangue foi maior em amostras recolhidas por PNAAF. No presente estudo, na maioria dos casos, foi possível obter citologias com celularidade potencialmente representativa da lesão sem que houvesse qualquer distinção entre as duas técnicas.

Em termos gerais, a observação citológica das amostras permitiu a distinção do tipo de massa – inflamatória ou tumoral, em apenas dois terços dos nódulos analisados, sem diferenças significativas quando confrontados os resultados das duas técnicas. Estes valores são suportados pelos estudos de Cohen *et al.* (2003) e devem-se às limitações principais da avaliação citológica: incapacidade de avaliar a arquitetura dos tecidos e dificuldade em obtenção de amostras a partir de lesões pouco esfoliativas. Nesse estudo, menos de metade dos resultados de lesões cutâneas foram concordantes entre si quando se confrontou o diagnóstico obtido por citologia e por histopatologia.

Através da análise citológica, apenas uma minoria dos nódulos foi identificada como sendo do tipo inflamatório. No entanto, deve-se ter uma perspetiva crítica quanto a estes resultados. Quando se observa uma amostra composta por células inflamatórias, apenas por citologia, não se pode assumir que se trate definitivamente de uma situação exclusivamente inflamatória. O mesmo se aplica quando se observam células atípicas com aparência tumoral. A reação inflamatória pode traduzir-se em atipia celular que se assemelha muito às alterações tumorais malignas. Tal como quando se observam células tumorais, não se pode afirmar inequivocamente que não exista também concomitantemente um processo secundário inflamatório. Quando se obtém uma população mista na amostra recolhida, a análise histopatológica é o melhor método para avaliar outros critérios que caracterizam malignidade de uma lesão como, por exemplo, invasão dos tecidos adjacentes. No estudo de Simeonov (2010), que tentou determinar a precisão diagnóstica por citologia de nódulos cutâneos em cães, quase metade das lesões classificadas como inflamatórias aquando avaliação citológica, tratavam-se na realidade de processos neoplásicos histologicamente. Frequentemente, estes falsos negativos podem ser derivados também de outros fatores, tais como: falta de experiência por parte do patologista, negligência médica ou uso de corantes de fraca qualidade.

O diagnóstico definitivo – tipo de inflamação ou tipo de tumor, neste estudo, foi alcançado em menos de metade de todos os nódulos analisados. Em comparação, não se registaram diferenças significativas quantitativas na obtenção de diagnóstico quando se compararam os resultados da técnica de PNAAF e da de PAAF. No entanto, segundo o estudo de Medicina Humana de Tauro *et al.* (2012) a técnica de PNAAF foi superior em termos diagnósticos. Já quando se tratavam de amostras pouco celulares, a técnica de PAAF demonstrou ter maior capacidade diagnóstica. Esta conclusão foi reportada também por outros autores, no entanto a maioria não registou qualquer diferença entre as duas técnicas. Os resultados de um estudo citado por LeBlanc *et al.* (2009) que comparou as duas técnicas paralelamente em 100 lesões cutâneas superficiais, revelaram que a técnica aspirativa foi diagnóstica na maioria dos casos. No entanto, em termos de qualidade, quando diagnosticáveis, as amostras obtidas pela técnica não aspirativa eram frequentemente superiores.

O critério de "contaminação por sangue" foi sempre tido em conta na avaliação de cada amostra e feita uma comparação par a par entre cada técnica para tentar determinar em qual se conseguia evitar mais a sua ocorrência. No entanto, por se tratar de uma apreciação subjetiva, não foi possível tratar estes dados estatisticamente. Ainda assim, de uma maneira geral e aparente, a maioria das amostras apresentou contaminação por células sanguíneas. Fazendo uma avaliação subjetiva entre cada técnica, considerou-se que a técnica de PAAF forneceu amostras com maior grau de contaminação que as recolhidas por PNAAF. Esta opinião vai de encontro à maioria dos estudos incluindo a análise comparativa contemplada por Tauro *et al.* (2012) que assume, consensualmente, que este fenómeno não pode ser totalmente evitado mas é minimizado utilizando o princípio de capilaridade da técnica de PNAAF. Os autores associam a maior contaminação da técnica de PAAF à força de sucção que se aplica nos tecidos no processo de recolha que promove lesão tecidual. Também LeBlanc *et al.* (2009), concluiu obter citologias com menor quantidade relativa de células sanguíneas pela técnica de PNAAF. Deve-se ter em atenção que quando se obtém uma amostra contaminada por sangue ou que é mesmo constituída na sua totalidade por células sanguíneas, podemos estar a lidar com um tumor de origem hematogénea. O diagnóstico definitivo, nestas situações, passa pelo estudo histológico do tumor.

Ainda em termos não quantificáveis, a técnica de PNAAF foi considerada, ao longo deste estudo, como sendo de mais fácil execução. O facto de o operador segurar diretamente na agulha permitiu uma maior sensibilidade táctil e exatidão ao longo de todo o processo de recolha. Também Pothier & Narula (2006) e Al-Khattab & Hussein (2004)

consideraram esta técnica como preferida em termos de execução pelas mesmas razões. Braun *et al.* (1997) acrescenta ainda que há um maior controlo de movimento.

A seringa é utilizada em ambas as técnicas com diferentes funções: no método aspirativo é para que se consiga fazer sucção na recolha do material, no método não-aspirativo é apenas para promover a sua expulsão. Ramachandra *et al.* (2011) admite, assim, a técnica de PNAAF como economicamente mais rentável por não considerar necessário o uso de seringas esterilizadas para a sua execução.

# CONCLUSÃO

Através dos resultados do presente estudo, não se pôde associar a prevalência de nódulos cutâneos em animais consoante espécie, idade, género, estado fértil ou raça por se tratar de uma amostra de população pequena. Quanto à distribuição dos nódulos, verificou-se que a área mais frequentemente afetada é o dorso.

Em termos de parâmetros físicos dos nódulos – dimensão, consistência, sinais de prurido, mobilidade, ulceração e alteração da cor à superfície, estes foram muito variáveis sem que houvesse maior prevalência significativa de nenhuma das formas. Através de tratamento estatístico, concluiu-se também que os critérios considerados não têm qualquer tipo de influência na capacidade de recolher amostra de qualidade que dificulte a obtenção de diagnóstico citológico.

Em termos de análise citológica, as técnicas utilizadas foram capazes, em conjunto, de classificar a maioria das lesões como sendo de origem inflamatória ou tumoral. Já o diagnóstico definitivo, por este meio, foi obtido em menos de metade dos nódulos.

Numa perspetiva de comparação entre as duas técnicas estudadas, na presente dissertação, não se pôde considerar que uma técnica ofereça vantagens sobre a outra em termos quantitativos na obtenção de amostra e consequente capacidade de aferir diagnóstico citológico. Ambas as técnicas ofereceram, em semelhante proporção, amostras passíveis de serem analisadas por conterem populações celulares potencialmente representativas da lesão. Quanto à densidade celular, também nenhuma das técnicas mostrou níveis superiores em relação à outra.

Dada a pequena dimensão da amostra, a incidência de contaminação por células sanguíneas nas amostras recolhidas foram avaliadas apenas de uma maneira crítica e subjetiva. Ainda assim, pode-se concluir que a técnica de PNAAF providenciou, muito provavelmente, um maior número de amostras livres de contaminação ou com um nível de contaminação inferior, aquando análise par a par das citologias, em comparação com a técnica PAAF.

Ainda como avaliação subjetiva, ao proceder-se à recolha de amostras ao longo deste estudo, a PNAAF foi considerada ser, na prática, a técnica de mais fácil execução para o operador tornando-se mais confortável e com maior nível de precisão sensitiva do ato, o que conferia também maior rapidez ao processo tornando-o, assim, menos incomodativo para o animal.

Como objetivo final deste estudo, concluiu-se, assim, que ambas as técnicas obtêm amostras citológicas que permitem, com igual capacidade, fornecer tanto diagnóstico orientativo preliminar como definitivo. No entanto, deve-se considerar que a amostra em estudo é relativamente pequena. Para que se auferem resultados de maior representatividade, devem ser feitos estudos com uma amostragem maior, mais abrangente, e que permita que estatisticamente sejam analisados mais parâmetros, especialmente qualitativos, que neste estudo foram considerados subjetivo e pouco representativos. Outra limitação deste estudo foi que, devido à amostra da população ser muito pequena e a espécie felina ser muito pouco representativa, as conclusões obtidas podem não ser aplicadas de igual forma para ambas as espécies, felina e canina.

Ainda que não se tenham registado diferenças significativas entre as duas técnicas, é também de opinião consensual entre outros autores que se realizadas em simultâneo na mesma lesão oferecem resultados que, somados entre si, facilitam a obtenção de um diagnóstico mais fidedigno.

# BIBLIOGRAFIA


Al-Khattab, Y. E. & Hussein A. G (2004). *Fine-needle capillary technique: is aspiration suction necessary? A study of 30 cases at various pathological lesions*. Iraqi J Med Sci, 2004, Vol.3 (2): 128-131

Alleman, R. (2011). *Summer Convention Procceedings - Sample Collection, Slide Preparation and Systematic Interpretation of Cytology Specimens from Tissue Masses*. Nebraska Veterinary Medical Association. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.nvma.org/Dina/newsite/upload/file/SA%20Proceedings%200611%20part1(1).pdf.

Blackwood, L (2011). Tumors of skin and subcutaneous tissues. In: J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles, *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3ªed., pp. 130-158) BSAVA

Braun, H., Walch, C., Beham, A. & Moinfar, F. (1997). Fine needle capillary cytology versus fine needle aspiration cytology--a comparison of quality between puncture techniques in the ENT area. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 76 (6):358-363

Chun, R. (2011). Cytology for the Clinician. Procceedings of the 36th World Small Animal Congress WSAVA. Oct. 14-17, 2011. Jeju, Korea. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/184.pdf.

Cohen, M., Bohling, M. W., Wright, J. C., Welles, E. A. & Spano, J. S. (2003). Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases (1999-2000). *JAVMA*, Vol. 222, No. 7: 964-967

Couto, C. G. (2009). Oncology. In C. G. Couto & R. W Nelson, *Small Animal Internal Medicine* (4ª ed., pp. 1143-1208). Mosby Elsevier

DeNicola, D. B. (2007). *Introduction to cytologic interpretation*. Procceedings of the North American Veterinary Conference NAVC. Jan. 13-27, 2007. Orlando, Florida. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/084.asp?LA=1

Dobson, J. M. & Scase, T. J. (2011). How to make a diagnosis. In J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles, *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3ªed., pp. 6-19) BSAVA

Dorn, C. R., Taylor, D.O., Schneider R., Hibbard, H. H. & Klauber, M.R. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County, *J Natl Cancer* Inst 40:307-318

Carlotti, D. N. (2005). Cutaneous and subcutaneous lumps, bumps, and masses. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textboof of Veterinary Internal Medicine – volume 1* (6ªed., pp. 43-46). Elsevier Saunders

Friedrichs, K. R & Young, K. M. (2012). Diagnostic Cytopathology in Clinical Oncology. In S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and Macewen's Small Animal Oncology*. (5ªed., pp.111-130) Saunders Elsevier

Fry, M. (2009). *Cytology basics and common skin/subcutaneous lesions*. Procceedings of the Latin American Veterinary Conference LAVC. Oct.16-19. Lima, Peru. Acedido em 1 de abril de 2013, em http:// www.ivis.org/proceedings/lavc/2009/Fry3.pdf.

Graça, R. F. (2007). Citologia para clínicos: como utilizar esta ferramenta diagnóstica. *Ata Scientiae Veterinariae.* 35 (Supl 2): s267-s269

Harvey, J. W. & Rebar, A. H. (2008). *Cytology of Inflammation*. Procceedings of the North American Veterinary Conference NAVC. Jan.19-23, 2008. Orlando, Florida. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/docarchive/proceedings/navc/2008/sae/098.pdf

Hauch, M. L. (2012). Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In *Withrow and Macewen's Small Animal Oncology*. (5ªed., pp.305-319) Saunders Elsevier

Joyce, J. (2010). Investigation and diagnosis. In *Notes on Small Animal Dermatology* (1ªed., pp. 20-45). Wiley-Blackwell

Khalbuss, W. E., Teot L. A. & Monaco, S. E. (2009). Diagnostic accuracy and limitations of fine-needle aspiration cytology of bone and soft tissue lesions – a review of 1114 cases with cytological-histological correlation. *Cancer Cytopathology* - 2009: 118 (1): 24-32

Kobayashi, T. (2011). Basic *Tissue Sampling Techniques for Cancer Patients*. Procceedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA. Oct.14-17, 2011. Jeju, Korea. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/185.pdf

LeBlanc, C. J., Head, L. L. & Fry, M. M. (2009). Comparison of aspiration and nonaspiration techniques for obtainig cytologic samples from the canine and feline spleen. *Veterinary Clinical Pathology* 38/2 (2009), 242-246

LeBlanc, A. (2011). Neoplastic and Nonneoplastic Tumor. In: K. A. Hnilica Small *Animal Dermatology – A Color Atlas and Therapeutic Guide* (3ªed., pp. 437-489). Elsevier Saunders

Lewis, D.T. (2003). Dermatologic disorders. In: M. Schaer, *Clinical Medicine of the Dog and the Cat* (2ªed., pp. 9-43). Manson Publishing

MacNeill, A. L. (2011). Cytology of canine and feline cutaneous and subcutaneous lesions and lymph nodes. *Topics in Companion Animal Medicine* (May 2011), 26 (2): 62-67

Medleau, L. & Hnilica, K. (2003). Neoplasias Malignas e Benignas. In: *Dermatologia de Pequenos Animais – Atlas Colorido e Guia Terapêutico* (1ªed., pp. 283-323). Saunders Company

Meinkoth, J. H, Cowell, R. L., Tyler, R. D. & Morton, R. J. (2008a). Sample Collection and Preparation. In R. L. Cowell, R. D. Tyler, J. H. Meinkoth, & D. B. DeNicola, *Diagnostic Citology and Hematology oh the Dog and Cat* (3ªed., pp.1-19) Mosby Elsevier

Meinkoth, J. H, Cowell, R. L. & Tyler, R. D (2008b). Cell Types and Criteria of Malignacy. In R. L Cowell, R. D.Tyler, J. H. Meinkoth, & D. B DeNicola, *Diagnostic Citology and Hematology oh the Dog and Cat* (3ªed., pp.20-46) Mosby Elsevier

Meyer, D. J., Harvey, J. W. & Taibo, R. A. (1999). El Laboratorio en Medicina Veterinaria: interpretación y diagnóstico (2ª ed., pp.287-305) Inter-Médica

Morris, J. & Dobson, J. (2001). Diagnosis and staging. In *Small Animal Oncology* (1ªed., pp.15-30). Blackwell Science

Noli, C. (2011) *Cytology in Dermatology: How to perform and interpret it correctly*. Proccedings of the 36th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA. Oct. 14-17, 2001. Jeju-Korea. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2011/75.pdf

North, S., & Banks, T. (2010). Principles of citology and pathology. In *Introduction to Small Animal Oncology* (1ªed., pp. 11-27) Saunders Elsevier

Patel, A., Forsythe, P. & Smith, S. (2010). Pruebas de laboratório. In *Dermatologia de Pequenos Animales* (1ªed., pp. 6-21). Saunders Elsevier

Peleteiro, M.C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H & Carvalho, T. (2011). *Atlas de Citologia Veterinária.* Lisboa, Lidel

Pothier, D. D. & Narula A. A. (2006). Should we aplly suction during fine needle citology of thyroid lesions? A systematic review and meta-analysis. Royal College of Surgeons of England – *Surgical Oncology* 2006; 88: 643-645

Raghuveer, C. V., Leekah, I., Pai, M. R. & Adhikari, P. (2002) Fine needle cytology versus fine needle sampling without aspiration. A prospective study of 200 cases. Indian Journal of Medical Sciences, Vol. 56; 9:431-439

Rakich, P. M. & Latimer, K. S. (2011). Citology. In: *K. S. Latimer*, *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. (5ªed., pp.331-363) Wiley-Blackwell

Ramachandra, L., Kudva, R. & Rao B. H. A. (2011). A comparative study of fine needle aspiration cytology (FNAC) and fine needle non-aspiration cytology (FNNAC) Technique in Lesions of Thyroid Gland. *Indian Journal of Surgery* (July – August 2011), 73 (4): 287-290

Raskin, R. E. & DeNicola D. (2006) *Introduction to citology interpretation*. Procceedings of the North American Veterinary Conference NAVC Volume 20. Jan. 7-11, 2006. Orlando Florida. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://www.ivis.org/proceedings/NAVC/2006/SAE/104.asp?LA=1

Rebar, A. H. & Harvey, J. W. (2008) *Cytology of neoplasia*. Procceedings of the North American Veterinary Conference NAVC. Jan.19-23,2008. Orlando, Florida. Acedido em 1 de abril de 2013, em http://ivis.org/docarchive/proceedings/navc/2008/sae/103.pdf

Scott, D. W., Miller, G. H. & Griffin C. E. (2001a). Diagnostic Methods. In *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (6ªed., pp. 71-206). Saunders Elsevier

Scott, D. W., Miller, G. H. & Griffin C. E. (2001b). Neoplastic and Non-neoplastic Tumors. In *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (6ªed., pp. 1236-1414). Saunders Elsevier

Simeonov, R. S. (2010). The accuracy of fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of canine skin and subcutaneous masses. *Comparative Clinical Pathology*, Vol.12, Issue 2: 143-147

Skeldon, N. & Dewhurst, E. (2009). The perceived and atual diagnostic utility of veterinary cytological samples. *Journal of Small Animal Practice* (2009) 50, 180-185

Tauro, L. F., Lobo, G. J., Fernandes, H., George, C., Aithala, P. S., Shenoy, D. *et al.* (2012). A comparative study of fine needle aspiration cytology versus fine needle capillary cytology in thyroid nodules. *Oman Medical Journal* (2012) – Vol.27, No.2: 151-156

Teske, E. (2008). Clinical Citology of Companion Animals: Part I. *EJCAP* – Vol.18 (2) – October 2008

Teske, E. (2009). Clinical Citology of Companion Animals: Part II. *EJCAP* – Vol.19 (1) - April 2009

Tvedten H. (2012). Citology of Inflammatory or Neoplastic Masses. In M. D. Willard & H. Tvedten, *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5ªed., pp. 337-363) Saunders Elsevier

Tyler, R. D., Cowell, R. L. & Meinkoth, J. H. (2008). Cutaneous and Subcutaneous Lesions., In R. L Cowell, R. D.Tyler, J. H. Meinkoth, & D. B DeNicola, *Diagnostic Citology and Hematology oh the Dog and Cat* (3ªed., pp.78-111) Mosby Elsevier

Viadel, L. D. & Morales M. J. (2005). *Atlas clínico de citologia de los tumores del perro e gato*. Barcelona: Esmonpharma

Warland, J. & Dobson, J. (2011) Tumores cutâneos en el perro y el gato. *Veterinary Focus*, vol. 21, no.3, 34-41

# APÊNDICES

## APÊNDICE A: FICHA CLÍNICA DE RECOLHA DE AMOSTRAS

### DADOS DO PACIENTE

**Nome do Proprietário (apelido):** _____

**Nome do Animal:** _____

**Espécie**: (1) Canídeo ◯ (2) Felino ◯

**Raça:** _____

**Idade (anos):** ___

**Género**: (1) Masculino ◯ (2) Feminino ◯

**Estado Fértil**: (0) Esterilizado ◯ (1) Inteiro ◯

### DADOS DO NÓDULO

**Zona do Corpo:**

(0) Cabeça ◯ (6) Adbómen ◯

(1) Pescoço ◯ (7) Coxa ◯

(2) Tórax ◯ (8) Perna ◯

(3) Dorso ◯ (9) Zona Perineal ◯

(4) Braço ◯ (10) Cauda ◯

(5) Antebraço ◯

**Dimensão (cms):** _____

**Consistência**: (0) Mole ◯ (1) Firme ◯

**Prurido**: (0) Ausente ◯ (1) Presente ◯

**Mobilidade**: (0) Não-móvel ◯ (1) Móvel ◯

**Ulceração**: (0) Ausente ◯ (1) Presente ◯

**Cor**: (0) Sem Alteração ◯ (1) Com alteração ◯