

Relatório de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

PATOLOGIA CLÍNICA: DO DIAGNÓSTICO À INVESTIGAÇÃO

Filipe Dias Ferreira Sampaio

Orientadora:

Professora Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Coorientadores:

Professor Doutor Mario Caniatti

Mestre Paula Brilhante Simões

Porto 2017

Relatório de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

PATOLOGIA CLÍNICA: DO DIAGNÓSTICO À INVESTIGAÇÃO

Filipe Dias Ferreira Sampaio

Orientadora:

Professora Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Coorientadores:

Professor Doutor Mario Caniatti

Mestre Paula Brilhante Simões

Porto 2017

Ao meu avô Zé,
o meu melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste relatório, expressando a minha gratidão de forma particular:

À Professora Doutora Marta Santos, a minha Orientadora, por ter aceitado o desafio de me orientar, pelo apoio incansável em todos os momentos, por todos os seus conselhos e ensinamentos e pelo acompanhamento ao longo de todo o meu período de estágio.

Ao Professor Doutor Mario Caniatti, o meu Coorientador, por me ter recebido na Facoltà di Medicina Veterinaria em Milão, por me ter proporcionado uma inigualável experiência de aprendizagem, não só de citologia veterinária como de valores humanos.

À Mestre Paula Brilhante Simões, a minha Coorientadora, por me ter acolhido no Laboratório INNO e por me ter dado o privilégio de aprender com os seus valiosos conhecimentos e sábios conselhos.

Ao Doutor Gabriele Ghisleni, pelos seus ensinamentos e pelo privilégio da sua amizade.

Aos Professores Doutores Ricardo Marcos, Valeria Grieco e Paola Roccabianca por todos os seus ensinamentos ao longo deste estágio.

A todos os Técnicos com quem contactei durante o estágio, e de modo particular à Fernanda Malhão, à Célia Lopes, à Isabel Baldaia, à Diana Freitas e ao Marco Brevi.

Ao Federico, Estéfano, Jasmine e Veronica pela amizade, pelos momentos de companheirismo e de boa disposição e por me terem feito sentir em casa.

Aos meus companheiros de apartamento de Milão, Luka Akimov e Liang Tao, por me terem tão bem-recebido, pelas nossas “tertúlias do chá” e pela demonstração de que a amizade atravessa qualquer posto fronteiriço.

Ao Dr. Augusto, ao Dr. Ricardo, à Dra. Leonor e à Dra. Daniela pela paciência, disponibilidade e esclarecimentos que me proporcionaram durante todo o estágio no Laboratório INNO.

Aos amigos de longa data e aos amigos que fiz durante o curso, por toda a força, energia e boa disposição que me transmitiram ao longo desta etapa da minha vida.

À minha família, em particular à minha tia Xana que me apoiou e incentivou em todos os momentos durante e especialmente no final do curso.

À minha avó Laurentina, pelo amor e pela sua habilidade de colocar um sorriso em mim.

À Catarina, por todo o carinho e amor, por me ter dado a mão e por me ter abraçado quando a ansiedade e a desmotivação tomaram conta de mim.

Aos meus pais, pois embora as palavras sejam pobres para expressar todo o meu agradecimento, nunca deixaram de me apoiar em todos os momentos da minha vida e sem eles nada disto teria sido possível.

Aos meus avós que infelizmente não estão presentes, mas que certamente estarão orgulhosos.

RESUMO

Nesta dissertação é feita uma descrição das áreas da Patologia Clínica Veterinária (do diagnóstico na primeira parte à investigação na segunda parte do relatório) em que versou o estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. O exame citológico é uma excelente ferramenta ao dispor dos clínicos veterinários, associada a várias vantagens, como sejam a rapidez de execução e a boa correlação com o diagnóstico histopatológico. A casuística da primeira parte do estágio incluiu 374 casos citológicos, com destaque, em termos de frequência, para as inflamações piogranulomatosas e para os linfomas dentro dos tumores de células redondas. Na segunda parte do estágio foi acompanhada a rotina de um laboratório de patologia clínica, com especial enfoque na área da hematologia. Os exames hematológicos, como o hemograma e o estudo do esfregaço sanguíneo são também ferramentas essenciais para a prática clínica veterinária, pelo que são aqui sumariamente descritos, recorrendo-se também à apresentação de gráficos e imagens de casos que demonstram a importância desta área. De modo sumário, são abordadas algumas técnicas usadas nas áreas de parasitologia e imunologia e, é feita uma descrição dos passos incluídos numa urianálise. Na segunda parte do relatório, é apresentado um estudo preliminar de investigação em citologia diagnóstica. Foram aplicadas colorações especiais (PAS e GMS) a preparações previamente coradas de dez casos citológicos com diagnóstico de infeção micótica. As colorações PAS e GMS permitiram de modo significativo identificar mais estruturas fúngicas e com maior detalhe morfológico. Deste modo, a aplicação destas colorações a preparações citológicas está recomendada quando se pretenda confirmar ou excluir a presença de estruturas fúngicas, antecipando-se que possa ser de auxílio na determinação da espécie de fungo.

Palavras-chave: citologia; colorações; fungos; hematologia; patologia.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- % - percentagem
- μm - Micrómetros
- AHIM – Anemia hemolítica imuno-mediada
- CBEM - Citologia baseada na evidência médica
- dL - Decilitros
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – Ensaio enzimático de imunoabsorção
- FS – Filipe Sampaio
- FSC – Luz dispersa frontal (do inglês *forward scattered light*)
- g – Gramas
- GMS - Metenamina de Prata de Gomori-Grocott
- ICBAS-UP – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- IR - Intervalos de referência
- LLC – Leucemia linfocítica crónica
- mL – Mililitros
- MS – Marta Santos
- °C – Graus centígrados
- PAAF – Punção aspirativa com agulha fina
- PAS - Ácido Periódico-Schiff
- PMN - Polimorfonucleares
- RNA - Ácido ribonucleico
- r-PLT - Plaquetas reticuladas caninas
- rpm – Rotações por minuto
- SFL – Luz fluorescente lateral (do inglês *side fluorescence light*)
- SSC – Luz dispersa Lateral (do inglês *side scattered light*)

Índice

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	iv
DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
I) PATOLOGIA CLÍNICA - DIAGNÓSTICO.....	2
I.1) CITOLOGIA.....	2
I.1.1) Contexto Histórico.....	2
I.1.2) Diagnóstico	2
I.1.3) Citologia Baseada na Evidência Médica	3
I.1.4) Citologia e a sua relação com a Histopatologia.....	4
I.1.5) Categorias Gerais da Interpretação Citológica.....	6
I.1.6) Casuística Citológica	7
I.2) MEDICINA LABORATORIAL	8
I.3) HEMATOLOGIA.....	9
I.3.1) Equipamentos de Hemograma.....	11
I.4) PARASITOLOGIA	14
I.4.1) Técnica de Flutuação.....	14
I.4.2) Técnica de Baermann.....	15
I.5) IMUNOLOGIA	15
I.5.1) Ensaios Imunoenzimáticos	15
I.5.2) Diagnóstico sorológico de Leishmaniose Canina	16
I.6) URINÁLISE.....	16
II) PATOLOGIA CLÍNICA - INVESTIGAÇÃO.....	18
II.1) INTRODUÇÃO	18
II.2) MATERIAL E MÉTODOS.....	19
II.3) RESULTADOS.....	21
II.4) DISCUSSÃO.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	28
ANEXOS.....	a

Anexos I: Tabelas..... b
Anexos II: Gráficos f

DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

A presente dissertação compila os diversos assuntos abordados durante o estágio curricular e é elaborada com vista à obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, pelo Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP). Durante dezasseis semanas, foram desenvolvidas diferentes atividades no âmbito da Patologia Clínica, com o objetivo de adquirir competências teóricas e práticas, especialmente nas áreas da Citologia e da Hematologia.

Nas primeiras nove semanas, sob a orientação do Prof. Doutor Mario Caniatti, o autor esteve inserido no Laboratório DIVETLAB, na parte do serviço de Citologia do Departamento de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Milano. Neste período, o autor aprendeu os procedimentos básicos inerentes a um serviço de diagnóstico citológico, como sejam a receção, o processamento, incluindo a coloração e a interpretação de amostras citológicas. Todos os casos citológicos foram registados com o respetivo diagnóstico e comentário final. Durante este período, e sempre que possível, foram acompanhadas atividades como o diagnóstico histopatológico, a realização de necrópsias e aulas de patologia/anatomia patológica do currículo académico do curso de Medicina Veterinária dessa faculdade. Adicionalmente, foram selecionados, retrospectivamente dos arquivos de citologia casos de inflamações fúngicas – os quais foram incluídos num trabalho de investigação desenvolvido nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS e cujo objetivo era o de comparar colorações para diagnóstico de agentes etiológicos fúngicos.

Nas restantes sete semanas de estágio curricular, o autor esteve inserido na rotina laboratorial no Laboratório INNO, sediado em Braga, sob orientação da Mestre Paula Brilhante Simões, acompanhando e realizando os diferentes exames complementares laboratoriais. O autor teve oportunidade de participar na receção, registo, preparação, processamento e interpretação de amostras de Hematologia, Citologia, Urianálise, Parasitologia, Imunologia e em menor parte de Bioquímica e Histopatologia.

Embora a aprendizagem seja um processo contínuo de construção e que nunca está acabado, o autor considera que foram alcançados todos os objetivos, inicialmente propostos no decorrer deste estágio curricular.

I) PATOLOGIA CLÍNICA - DIAGNÓSTICO

I.1) CITOLOGIA

I.1.1) Contexto Histórico

A citologia foi implementada e reconhecida nos princípios dos séculos XVIII e XIX. No entanto, o progresso e padronização deste ramo da patologia só foi completamente estabelecida nos últimos anos do século XX ^[21]. George Papanicolaou, que deu origem ao famoso “exame de Papanicolaou” (expressão vulgarmente usada para designar a citologia cervicovaginal) e à coloração de Papanicolaou, foi um dos pioneiros na capacidade de emitir um diagnóstico através da observação de esfregaços de uma amostra celular, entre os períodos de 1917 a 1928 ^[1].

A citologia, no contexto da Medicina Veterinária, tornou-se uma entidade diagnóstica reconhecida em 1970, através de Victor Perman, que Raskin (2013) descreve como o “Avô da Citologia Veterinária” ^[51]. Em 1974, Perman escreveu, juntamente com Riis e Alsacker, o livro de citologia veterinária intitulado “Cytology of the Dog and Cat”.

I.1.2) Diagnóstico

Em Medicina Veterinária, o objetivo do exame citológico é a identificação de processos patológicos, fazendo a diferenciação entre aqueles de origem inflamatória e os de características neoplásicas (e nestes distinguir, sempre que possível, os de caráter benigno dos malignos) ^[40].

Apesar do exame histopatológico ser considerado o exame “*gold standard*”, a citologia possui diversas vantagens, como sejam o baixo grau de invasividade, a possibilidade de evitar anestesia em pacientes instáveis, a baixa taxa de complicações secundárias, fornecendo resultados rápidos e a baixo custo ^[50; 57]. No entanto, o citologista deve sempre salvaguardar as desvantagens da citologia, nomeadamente a possibilidade de resultados inconclusivos, atribuíveis à escassa celularidade ou à presença de artefactos das amostras, ou até mesmo a dificuldade de interpretação dada a ausência de uma arquitetura tecidual ^[57].

O exame citológico é geralmente empregue no diagnóstico pré-operatório, no estadiamento de neoplasias malignas ou no seguimento de animais com patologias conhecidas com o intuito, por exemplo, de avaliar a eficácia dos planos terapêuticos adotados. A possibilidade de efetuar colheitas citológicas ecoguiadas ou guiadas por tomografia computadorizada contribuiu para uma maior utilização da citologia como método diagnóstico. Além disso, tornou possível que praticamente qualquer lesão ou massa (palpável ou visualizável por métodos imagiológicos) possa ser alvo de colheita de uma amostra citológica ^[22].

A informação obtida pela citologia é amplamente reforçada pela boa compreensão das vantagens e desvantagens já descritas, para além de uma boa comunicação estabelecida entre clínicos e patologistas ^[15]. A seleção das lesões que serão alvo da colheita de amostras citológicas, a escolha criteriosa da melhor técnica de colheita para cada lesão, assim como a boa preservação

da amostra, o fornecimento de uma história clínica e uma completa descrição das características da lesão aumentam a utilidade da informação retribuída ao clínico pelo patologista ^[15; 57].

I.1.3) Citologia Baseada na Evidência Médica

A citologia baseada na evidência médica (CBEM), é o conceito que traduz a ideia de que a citologia é efetuada no sentido de produzir resultados clinicamente relevantes, reprodutíveis e de elevada qualidade ^[51]. A CBEM depende claramente da obtenção de uma amostra de alta qualidade com boa celularidade ^[45]. As diretrizes para a CBEM incluem a necessidade de informação apropriada e pertinente relativa à colheita de amostras, pois estes podem ter um impacto significativo na interpretação de resultados ^[17]. A título de exemplos, em Medicina Humana: 1) a sensibilidade da citologia da expetoração aumenta quando as amostras são obtidas em vários dias consecutivos; 2) a incorreta colheita e manutenção das amostras são as maiores causas de resultados falsos-negativos na avaliação citológica do cérvix ^[56]. Transpondo este conceito para a Medicina Veterinária, será assim necessário que o clínico veterinário possua um domínio das técnicas de recolha de material, execução correta de esfregaços e, em alguns casos, da coloração das amostras ^[35].

Skeldon e Dewhurst (2009) num estudo desenvolvido no Reino Unido, demonstraram que a citologia é subvalorizada e utilizada num contexto inapropriado por parte dos clínicos veterinários. Este resultado é parcialmente explicado pelas expectativas pouco reais de que a análise citológica permite sempre a obtenção de um diagnóstico definitivo ^[59]. Idealmente, os clínicos deverão adequar a escolha entre biópsia histopatológica e citologia nas diferentes lesões, pesando as respetivas vantagens e desvantagens de cada técnica, maximizando desta forma a hipótese de obtenção de um diagnóstico conclusivo ^[57]. Nesse mesmo estudo foi também demonstrado que o fato das amostras de lesões de maior complexidade citológica serem analisadas por patologistas em laboratório de referência e em instituições académicas contribui para o aumento da confiança do clínico no diagnóstico ^[56].

I.1.4) Citologia e a sua relação com a Histopatologia

As amostras citológicas fornecem informações diferentes das amostras histopatológicas. Uma premissa essencial da citologia é que as interpretações diagnósticas são geralmente baseadas em populações inteiras de células, e não num baixo número de células individuais ^[41]. Nas preparações citológicas, as células estão, habitualmente distribuídas aleatoriamente, sem evidência da relação que mantinham *in vivo*. Na histopatologia, o objeto de estudo é a relação das células entre si e com os tecidos circundantes ^[58].

Apesar disso, a citologia e a histopatologia são procedimentos diagnósticos complementares que refletem uma troca de vantagens. Um estudo sobre a arquitetura citológica estabeleceu uma relação útil com a estrutura histológica dos tecidos normais ou patológicos. A análise dos arranjos arquitetônicos celulares das amostras citológicas pode fornecer informação essencial para obter um diagnóstico definitivo, nomeadamente em lesões neoplásicas ^[40; 42]. Um exemplo mais concreto é a presença característica de agregados celulares organizados em torno de estruturas capilares nos tumores das bainhas perivasculares (como seja, o hemangiopericitoma) (Figura 1). A presença de células gigantes multinucleadas neoplásicas com núcleos periféricos (células em coroa) é igualmente característica destes tumores ^[5; 12]. Outro exemplo é o caso da hiperplasia prostática benigna, em que os arranjos epiteliais observados nas preparações citológicas desenham formas de favo de colmeia ^[40; 52] (Figura 2).

Em 2006, Ghisleni e colaboradores correlacionaram o diagnóstico em preparações citológicas obtidas por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) e com o diagnóstico histopatológico na avaliação de massas cutâneas e subcutâneas em cães e gatos. O diagnóstico citológico foi concordante com o diagnóstico histopatológico em 90,9 % dos casos (221 de 243 casos). No caso de neoplasias, a citologia apresentava 89,3% de sensibilidade e 97,9 % de especificidade. Os autores concluem que a análise citológica é altamente eficaz na deteção de processos neoplásicos com sinais de malignidade, embora alguns processos inflamatórios tenham mascarado processos neoplásicos ^[23]. Um outro estudo revelou que os diagnósticos citológicos foram concordantes em 19 de 31 casos (61,3%) com os resultados histológicos em amostras esplênicas colhidas ecograficamente. No entanto, se houver um erro de colheita (falha de recolha da amostra da lesão) ou se for necessária arquitetura tecidular para distinguir processos reativos de processos neoplásicos, o diagnóstico citológico poderá não ser possível ^[6; 23].

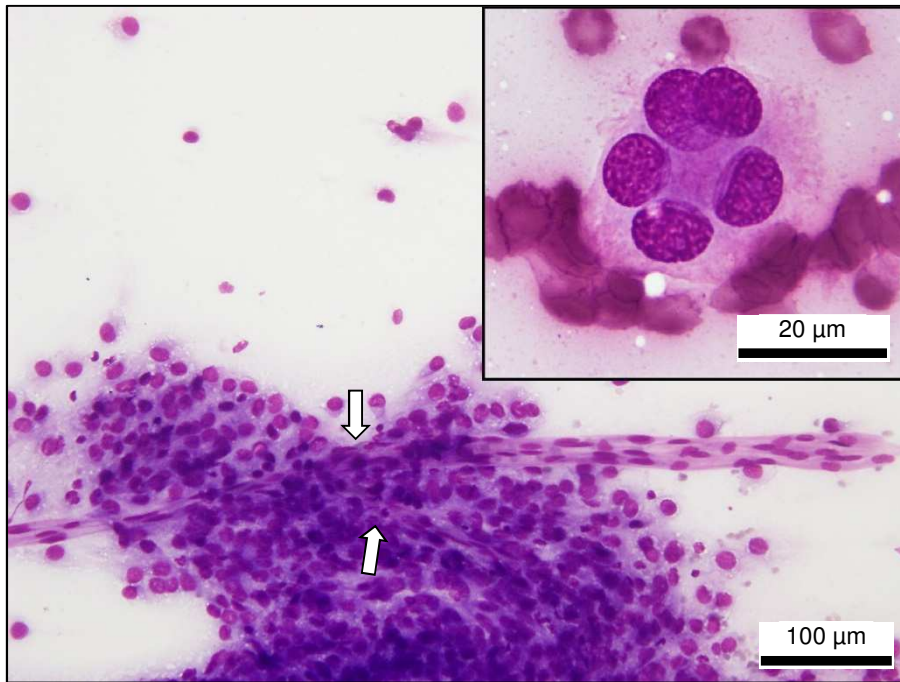


Figura 1 – Punção aspirativa por agulha fina de um tumor da parede perivascular de um cão. Estrutura capilar fina e ramificada (setas) num grupo altamente celular. Os núcleos dos capilares são alongados e hiper Cromáticos. *Inset*: cinco núcleos dispostos em coroa dentro da membrana citoplasmática (células em coroa). Diff-Quik.

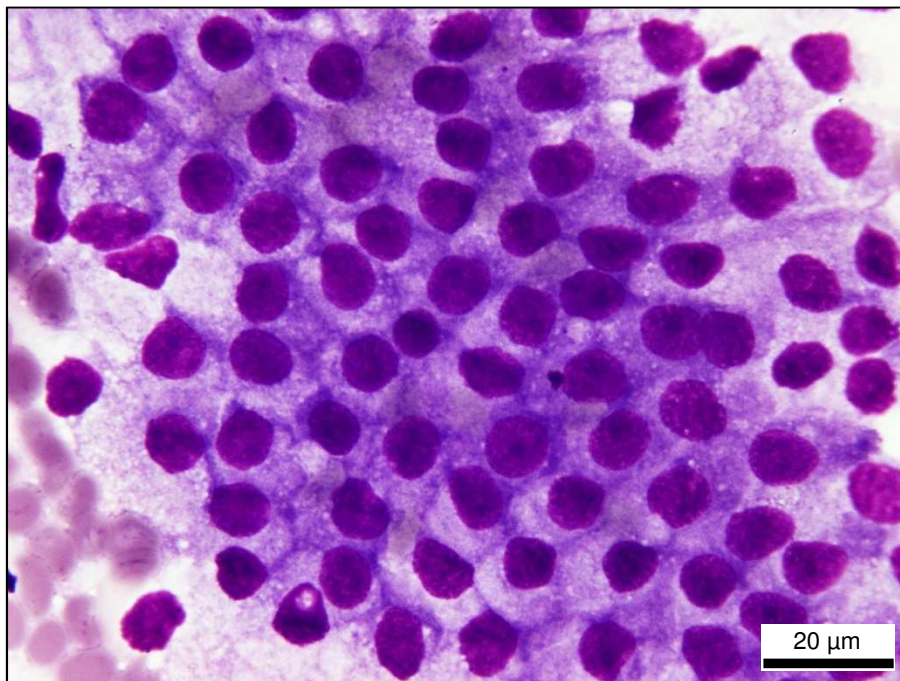


Figura 2 - Punção aspirativa por agulha fina ecoguiada de próstata aumentada de volume de cão. Células epiteliais prostáticas normais. As células são uniformes em tamanho e forma e estão dispostas em grupo que desenhavam um arranjo em favo de colmeia. Diff-Quik.

I.1.5) Categorias Gerais da Interpretação Citológica

As interpretações citológicas podem ser incluídas em um dos cinco grupos diagnósticos: tecido normal ou hiperplásico; lesão quística; inflamação; resposta tecidual a uma lesão (hiperplasia e metaplasia) e neoplasia. As amostras inconclusivas resultam normalmente de insuficiente material celular ou excessiva contaminação hemática [52].

As inflamações podem ser classificadas em: purulentas ou supurativas (quando as lesões contêm acima de 85% de neutrófilos, que são classificados quanto à presença ou ausência de degeneração nuclear); macrofágica ou granulomatosa (predominância de macrófagos os quais podem inclusivamente assemelhar-se a células epiteliais – células epitelióides - e células gigantes multinucleadas; surgem por exemplo em resposta a corpos estranhos ou a agentes infecciosos intracelulares como sejam as *Mycobacterium spp.*); piogranulomatosa (mistura de neutrófilos e macrófagos com ou sem a presença de células gigantes multinucleadas); eosinofílica (mais de 10% de eosinófilos em conjunto com outras células inflamatórias); e linfocíticas ou plasmocitárias (consistem em populações linfocitárias normalmente heterogêneas, com linfócitos de pequenas/médias dimensões e plasmócitos, em conjunto habitualmente com outras células inflamatórias) [52].

No caso das neoplasias, estas podem ser classificadas nas seguintes categorias: neoplasia de células redondas, epiteliais, mesenquimatosas e núcleos “nús”. A categorização nestes grupos auxilia o citopatologista a identificar o tipo celular presente e pode fornecer informações diagnósticas importantes, como por exemplo, a identificação de células de epiteliais numa amostra de linfonodo num situação de metástase ganglionar de carcinoma [41]. A Tabela 3 dos Anexos I resume as principais características citológicas das diferentes categorias de células neoplásicas.

Conforme referido anteriormente, as amostras citológicas carecem habitualmente da arquitetura celular, a qual poderá fornecer informação essencial para a determinação histológica do comportamento biológico das neoplasias. Em citologia a avaliação do potencial maligno envolve parâmetros relacionados com a diferenciação e a atipia celular das populações celulares [41]. As células benignas apresentam uniformidade a nível do tamanho celular, de forma e tamanhos nucleares e na relação núcleo:citoplasma. As células malignas normalmente apresentam três ou mais critérios de imaturidade celular ou atipia, como por exemplo múltiplos núcleos, figuras de mitose atípicas, macronúcleolos e anisocitose [36; 52].

I.1.6) Casuística Citológica

No decorrer das primeiras nove semanas foram recolhidos os diagnósticos e comentários finais dos exames citológicos efetuados na Università degli Studi di Milano. Neste período foram analisados 374 casos citológicos, divididos por 8 categorias, como representam as Tabelas 1 e 2 e o Gráfico 1 dos Anexos I e II, respetivamente. Do total de casos observados, 26,5% corresponderam a processos inflamatórios e 49,9% a processos neoplásicos. Foi feita uma subclassificação dentro das categorias de inflamações (Gráfico 2) e de neoplasias epiteliais (Gráfico 3), mesenquimatosas (Gráfico 4) e de células redondas (Gráfico 5).

Foi objetivo para efeitos deste relatório, comparar os resultados desta casuística com outros já publicados. Um estudo sobre a utilização de citologia veterinária no Reino Unido demonstra que a citologia é utilizada com expectativas pouco reais, uma vez que a maioria dos clínicos acredita que é possível obter um diagnóstico definitivo em todos os casos. Nesse estudo, os casos categorizados como “inconclusivos” devido a escassa celularidade obtiveram uma percentagem global de 19,2% de um total de 1206 amostras submetidas [59]. Na presente casuística, a percentagem de resultados inconclusivos (grupo definido como “impossibilidade de fornecer qualquer informação útil devido à não-representatividade da amostra”), foi de 9,9% (37 em 374 casos citológicos). No estudo referido, a maior percentagem de exames inconclusivos poderá estar relacionada com diferentes causas, nomeadamente a seleção da técnica de colheita mediante o tipo de lesão, as características intrínsecas da lesão, a técnica utilizada para a realização dos esfregaços, e a preservação da amostra até à coloração. No caso da PAAF, um estudo britânico conclui que a utilização de uma seringa de 2 ou 5 ml em combinação com uma agulha de 21 ou 23 G é a preferida pelos clínicos no Reino Unido. No entanto, e apesar de 41,2% dos inquiridos sugerir a PAAF para todas as massas cutâneas, não houve correlação entre a combinação agulha/seringa e a obtenção de amostras representativas das lesões [9]. A escassa celularidade é uma razão mais comum para a não-representatividade das amostras do que a degeneração celular ou hemodiluição [59]. Estes resultados contrastam com um estudo norte-americano no qual 49,9% dos inquiridos indicaram a “fraca qualidade de amostra” (células destruídas, esfregaços espessos, contaminação por detritos ou fraca coloração) como a razão principal para o diagnóstico inconclusivo. O erro na colheita (amostra do órgão errado ou falha de recolha da amostra da lesão) é outro dos motivos que pode levar à inconclusividade do exame citológico [15]. Uma forma de evitar estes resultados é proceder a uma avaliação da qualidade e integridade celular logo após a colheita e no contexto da clínica veterinária das amostras obtidas antes do envio para os centros de diagnóstico. Por fim, o acondicionamento da amostra junto de peças histológicas faz com que haja penetração dos vapores de formalina, afeta de modo irreversível a qualidade das colorações do tipo Romanowsky [35].

O mesmo estudo realizado no Reino Unido, é concluído que os três diagnósticos citológico mais frequentes foram, em ordem decrescente: lipoma (48%), mastocitoma (22%) e lesões quísticas epidérmicas (7,8%) [59]. Por outro lado, os casos mais frequentes obtidos na presente casuística

foram: lesão inflamatória piogranulomatosa (12,8%), linfoma (10,4%) e lesão inflamatória neutrofílica (7,0%). Deste modo, é evidente uma diferença nos diagnósticos mais frequentemente obtidos na presente casuística. Possivelmente, a explicação reside, em parte, no facto de haver uma maior disponibilidade dos clínicos em avaliar certas amostras citológicas (e.g. lipomas) na própria clínica. A isto acresce o diferente currículo académico italiano em que há maior investimento na citologia diagnóstica. Além disso, as amostras com suspeita de malignidade são enviadas mais frequentemente para centros de referência, como sejam os laboratórios das instituições universitárias ^[15]. Estes achados são semelhantes aos resultados apresentados no estudo de Bowlt e colaboradores (2014), onde apenas 5,2% dos inquiridos responderam que enviavam diretamente as amostras citológicas para os laboratórios externos sem observação prévia ^[9]. A elevada percentagem de inflamações piogranulomatosas na presente casuística poderá ser explicada pela necessidade de uma procura mais exaustiva de uma causa ou agentes etiológicos. A segunda posição dos linfomas na nossa casuística é explicada, provavelmente pela necessidade de maior confiança e certeza no diagnóstico por parte dos clínicos. O facto de o laboratório proceder à imunofenotipagem dos linfomas em lâminas citológicas, pode também justificar a entrada de um maior número de amostras de animais com suspeita clínica de linfoma. É consensual que a imunofenotipagem é um procedimento importante para auxiliar na determinação do prognóstico dos linfomas caninos ^[54].

Uma limitação do estudo de Skeldon e Dewhurst (2009) é a ausência de confirmação dos diagnósticos por histopatologia, algo que acontece também com os resultados obtidos pelo autor durante o estágio curricular.

I.2) MEDICINA LABORATORIAL

A medicina veterinária laboratorial é uma disciplina que faz a ponte entre as ciências básicas e a prática clínica. Nas últimas décadas, a medicina laboratorial aplicada aos animais de companhia atravessou um período de crescimento e avanço tecnológico. As diferenças na morfologia e nos intervalos de referência entre as espécies, assim como a variabilidade nas manifestações clínicas levaram a alguns obstáculos na validação de alguns testes laboratoriais. O controlo de qualidade e a capacidade de criar e manter padrões laboratoriais espécie-específicos são dificuldades acrescidas para os laboratórios veterinários ^[14].

Os patologistas clínicos veterinários necessitam de um conhecimento das várias disciplinas para integrar toda a informação obtida e, desse modo produzirem um diagnóstico. O patologista clínico é, por isso, uma peça essencial da equipa de diagnóstico na saúde animal ^[3].

Durante o estágio no laboratório INNO o autor teve contacto e adquiriu treino prático em diversas áreas da medicina veterinária laboratorial. Nos parágrafos seguintes serão apresentadas algumas dessas áreas, pretendendo-se deste modo fazer também um breve resumo das atividades desenvolvidas.

I.3) HEMATOLOGIA

A decisão de solicitar testes hematológicos em animais é largamente baseada na relação do custo *versus* o potencial de benefício dos resultados para o animal. Os hemogramas podem ser efetuados por diferentes motivos, entre os quais: 1) para efeitos de rastreio em animais clinicamente saudáveis; 2) para diagnóstico de patologias subclínicas em animais geriátricos; 3) para identificação de condições patológicas que coloquem em risco o animal durante procedimentos anestésicos e/ou cirúrgicos ou; 4) como parte integrante da investigação diagnóstica em animais sintomáticos [29].

O sangue é composto de diferentes elementos celulares: eritrócitos, leucócitos e plaquetas, os quais circulam num fluido denominado plasma [29].

Os eritrócitos são os elementos mais numerosos da corrente sanguínea, com vários milhões de unidades por microlitro de sangue nos mamíferos [29]. A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigénio aos diferentes tecidos. A energia disponível nos eritrócitos é utilizada para manter a forma celular, estrutura membranar, funções enzimáticas, redução do ferro da hemoglobina, entre outras, de modo a otimizar as suas funções [44]. A vida útil dos eritrócitos está dependente da espécie, sendo de 100-115 dias em cães e 73 dias em gatos [44; 62]. O tempo de vida útil está relacionado com o peso corporal e, conseqüentemente, com a taxa metabólica. Os animais de menores dimensões possuem maior taxa metabólica e, por isso um menor tempo de vida dos eritrócitos [20; 29]. Os leucócitos dos mamíferos são classificados como granulócitos ou polimorfonucleares (PMN) e agranulócitos. Os PMN possuem núcleos condensados e segmentados. Podem ser encontrados três tipos diferentes de granulócitos pelas características de coloração dos seus grânulos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) [28]. Por outro lado, dentro da categoria dos leucócitos agranulócitos ou mononucleares incluem-se os linfócitos e os monócitos [28]. As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados com origem nos megacariócitos da medula óssea [27]. A vida útil das plaquetas pode variar entre 4 a 6 dias nas espécies de animais domésticos. Um estudo revelou que em cães esplenectomizados esta média poderá aumentar até 8 dias. Este dado sugere que o baço é responsável pelo reconhecimento e remoção de plaquetas envelhecidas em circulação nos cães [27].

Os exames hematológicos incluem dois componentes: um exame quantitativo – o hemograma e um exame qualitativo que corresponde à observação do esfregaço sanguíneo [63]. O hemograma inclui parâmetros e índices eritrocitários, o leucograma (contagens totais e diferenciais de leucócitos) e as contagens de plaquetas [63].

A avaliação dos eritrócitos pode ser feita, para além da morfologia, através dos parâmetros e índices eritrocitários. Os parâmetros eritrocitários fornecem informação relativa à massa de glóbulos vermelhos [63]. Os eritrócitos do sangue são quantificados pela sua contagem celular, pelo conteúdo em hemoglobina sanguínea (medida em g/dL) e pela determinação do hematócrito (percentagem do volume sanguíneo que corresponde a eritrócitos) [29]. Os índices eritrocitários

caracterizam o tamanho e o grau de hemoglobinação da população eritrocitária. Estes correspondem ao volume corpuscular médio (indica o tamanho médio dos eritrócitos; medida em fentolitros), amplitude de distribuição dos eritrócitos (indica o grau de variabilidade do tamanho dos eritrócitos; medida em percentagem), hemoglobina corpuscular média (quantidade média de hemoglobina por eritrócitos; medida em picogramas) e concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração média de hemoglobina num dado volume de eritrócitos; medida em g/dL e é obtida dividindo o valor de hemoglobina pelo valor do hematócrito) ^[63].

As contagens diferenciais e totais leucocitárias, que compreendem o leucograma, e a morfologia leucocitária são parâmetros que auxiliam na avaliação das respostas inflamatórias e outros processos patológicos, como as leucemias ^[31]. Para tal, há que atender a alguns princípios: 1) qual tipo de leucócitos envolvido; 2) qual a severidade de um possível desvio à esquerda (isto é, a presença de células precursoras em circulação, como sejam os neutrófilos banda); 3) considerar que algumas alterações leucocitárias podem ser devidas ao stress; 4) ter em consideração que a linfocitose poderá sugerir estimulação imunitária crónica; 5) procurar alterações tóxicas nos neutrófilos que indicam, por exemplo, resposta a agentes infecciosos, como sejam as bactérias ^[61].

A avaliação plaquetária pode ser efetuada através do plaquetograma. Este consiste na contagem total de plaquetas, plaquetócrito (percentagem do volume de plaquetas sobre o volume total de sangue) e volume plaquetário médio. Todos os equipamentos podem fazer uma estimativa da contagem plaquetária. No entanto poderão existir alguns erros associados à sua medição, devido à falsa contagem de grandes plaquetas como pequenos eritrócitos, algo que é mais marcado em gatos ^[63].

A morfologia dos eritrócitos, dos leucócitos e plaquetas é avaliada através do esfregaço sanguíneo ^[63]. O exame do esfregaço sanguíneo é essencial, independentemente do equipamento de hemograma utilizado ^[26]. A análise da esfregaço deverá ser efetuada para, por exemplo: 1) verificação da contagem diferencial leucocitária; 2) avaliação da morfologia eritrocitária (*e.g.* policromasia, anisocitose, esferócitos); 3) deteção de hemoparasitas (Figura 3); 4) verificação de anormalidades nos leucócitos (*e.g.* presença de células blásticas ou neutrófilos tóxicos); 5) verificação de anormalidades plaquetárias (*e.g.* macroplaquetas ou agregados plaquetários) ^[63]. Um dos casos mais comuns que requer a visualização do esfregaço sanguíneo é a validação de trombocitopenias. No caso dos felídeos, as plaquetas são facilmente ativadas durante a colheita sanguínea, resultando em agregados plaquetários que resultam em falsas contagens automáticas ^[27; 63].

De modo exemplificativo, são apresentados na Figura 4 alguns gráficos de hemogramas de diferentes amostras sanguíneas para as quais foi essencial a execução e avaliação dos esfregaços sanguíneos.

1.3.1) Equipamentos de Hemograma

Em Medicina Humana, os hemogramas automáticos começaram a ser efetuados na década de 1930 a partir de um método fotoelétrico com recurso a óticas de campo escuro [44; 48]. O número de máquinas de hemograma disponíveis para uso veterinário aumentou nos últimos anos. Para além dos equipamentos maiores usados na rotina laboratorial, foram desenvolvidos vários instrumentos mais pequenos e económicos para utilização nas clínicas e hospitais [44].

Durante o estágio no laboratório INNO, o autor teve contacto com o equipamento Sysmex XT-2000iV (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Este instrumento possui as opções de impedância e de citometria de fluxo. A utilização de uma coloração com polimetina permite tornar os ácidos nucleicos celulares fluorescentes, sendo depois processados por citometria de fluxo [7; 8; 33; 34]. As diferentes células serão separadas e categorizadas de acordo com a complexidade da sua estrutura interna (SSC), com o tamanho celular (FSC) e com o conteúdo em ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), assinalada nos gráficos da Figura 4 como “SFL” [7; 8; 33; 34].

Os intervalos de referência (IR) são essenciais para a interpretação dos dados laboratoriais e são definidos a partir de animais saudáveis. Estes valores devem ser especificados consoante a espécie animal a ser testada, assim como para cada equipamento e teste efetuado [29]. Em 2012, Serra e colaboradores determinaram os IR hematológicos para a Sysmex XT-2000iV usando uma larga população canina de dadores [55]. Previamente, outro estudo tinha já validado este equipamento quanto à contagem de eritrócitos, reticulócitos, plaquetas e leucócitos totais no sangue de animais doentes [33]. A segunda parte desse mesmo estudo validou as contagens leucocitárias diferenciais no sangue de cães, gatos e cavalos doentes [34]. Mais recentemente, foram otimizados os IR previamente publicados de plaquetas reticuladas caninas (r-PLT). Estes visam minimizar a interferência entre medições de pequenos eritrócitos e r-PLT feitas pela citometria de fluxo [46].

A Sysmex XT-2000iV apresenta várias vantagens na sua utilização aplicada à Medicina Veterinária. Bauer e colaboradores (2011) apresentaram algumas das vantagens relativamente a outros equipamentos rotineiramente utilizados nos laboratórios veterinários. Uma característica especial deste equipamento é a medição por fluorescência ótica das plaquetas no canal de reticulócitos. Esta particularidade permite contornar a interferência dos agregados plaquetários na contagem plaquetária pelo método de impedância, em gatos e cavalos, sendo inclusivamente possível detetar plaquetas imaturas [7]. Para além disso, o reduzido volume de amostra necessária para processamento de um hemograma (85 µL) é outro atributo do equipamento [7]. Nesse mesmo estudo, é atribuído destaque à melhor deteção de eosinófilos felinos por parte da Sysmex XT-2000iV. A explicação mais provável para tal é que este equipamento distinguia os eosinófilos da restante população celular devido à sua estrutura interna e ao seu conteúdo em RNA, o que não acontece em outros equipamentos [8].

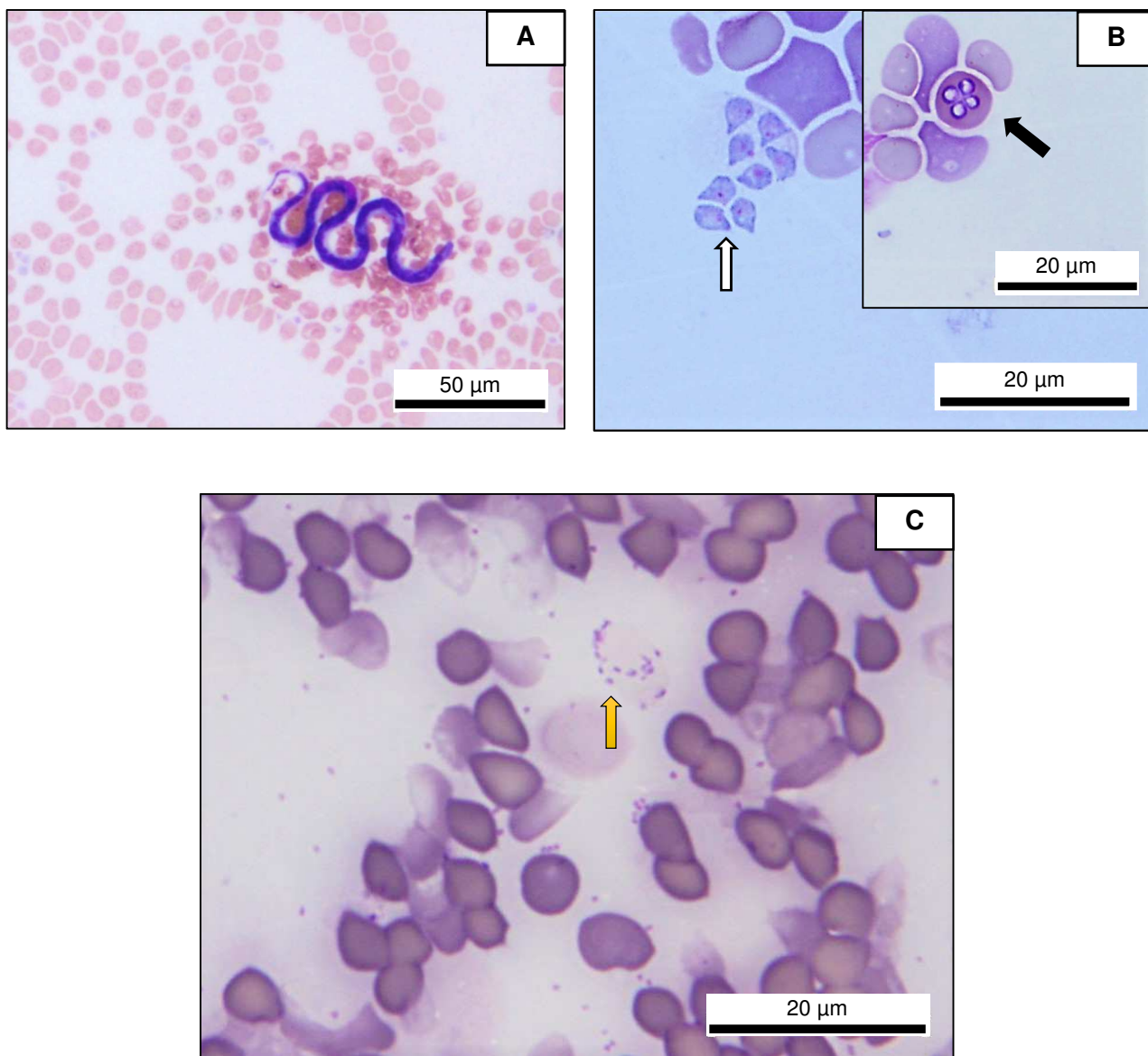


Figura 3 – Exemplos de esfregaços sanguíneos contendo hemoparasitas. **(A)** Presença de microfilária em esfregaço sanguíneo de cão **(B)** Oito organismos livres (seta branca) de morfologia compatível com *Babesia canis* após lise eritrocitária, em sangue de cão. *Inset*: visualização de quatro organismos (seta preta) dentro de um eritrócito. **(C)** Organismos de morfologia compatível com *Mycoplasma haemofelis* em amostra de sangue de gato. Aglomerado de organismos na superfície de um eritrócito lisado (“ghost cell”) (seta amarela). Diff-Quik. **(Casos de Hematologia do Laboratório INNO).**

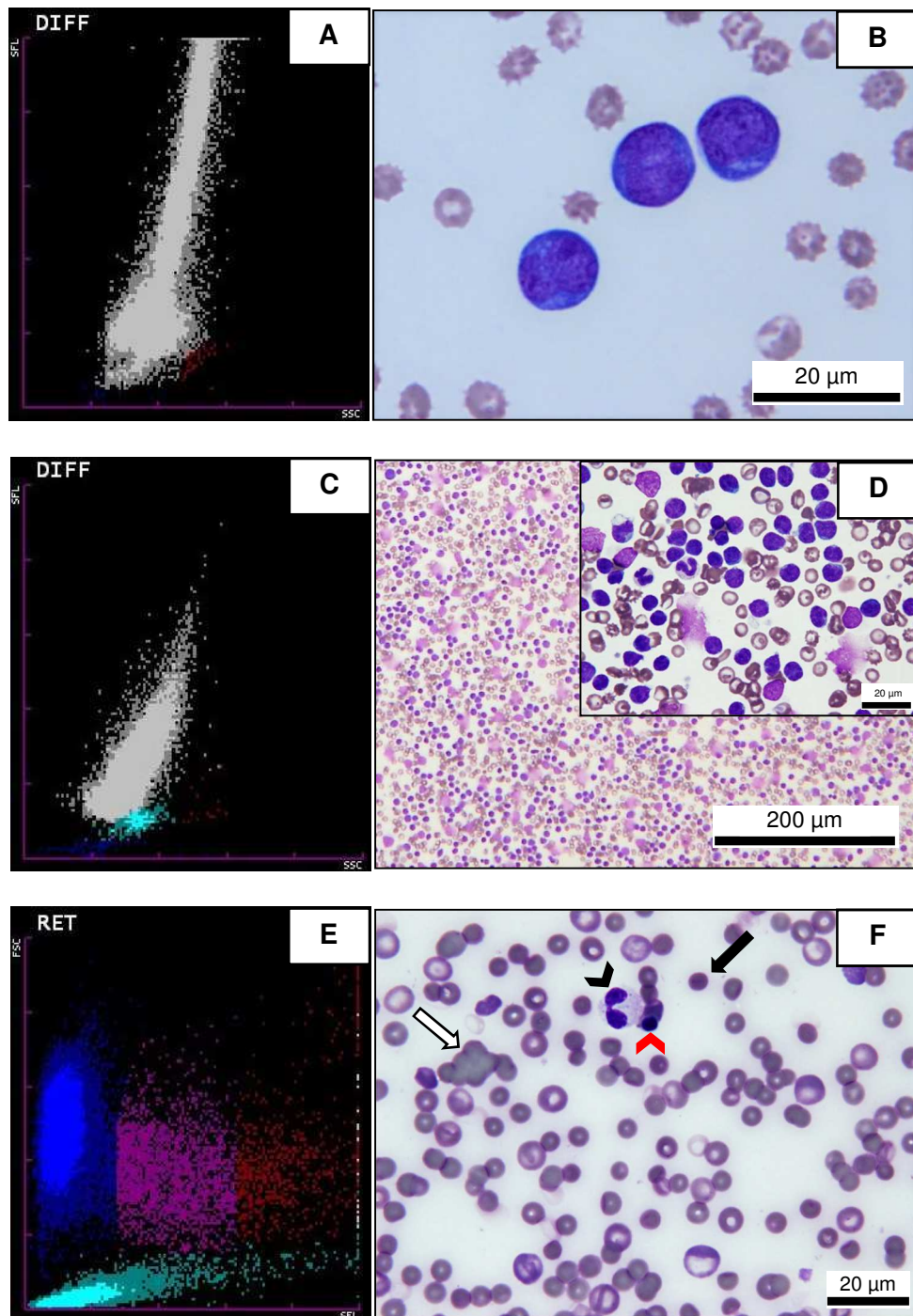


Figura 4 – Exemplos de gráficos de dispersão e respectivos esfregaços sanguíneos de três cães. **(A) Leucemia aguda/linfoma estadio V.** O gráfico DIFF revela uma população homogênea que se estende para a região de elevada fluorescência. Eixo dos xx= SSC; Eixo dos yy= SFL. **(B)** Presença de células blásticas. Diff-Quik **(C) Leucemia linfocítica crônica (LLC).** O gráfico DIFF revela aumento da população linfóide madura com menores eventos na região de elevada fluorescência, comparativamente a (A). Eixo dos xx= SSC; Eixo dos yy= SFL. **(D)** Confirmação de LLC com envolvimento de linfócitos de pequenas dimensões com escasso citoplasma. *Inset:* predomínio de células linfóides de pequena dimensão. Diff-Quik. **(E) Anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM).** O gráfico RET dos reticulócitos indica uma anemia marcadamente regenerativa. Observa-se uma população de eritrócitos (nuvem azul) e uma evidente população de reticulócitos que se estende para a região de média fluorescência, assinalada pela nuvem vermelha. Eixo dos xx= SFL; Eixo dos yy= FSC. **(F)** O esfregaço sanguíneo é compatível com AHIM. É possível identificar alguns parâmetros característicos como: autoaglutinação (seta branca), esferócitos (seta preta), anisocitose, policromasia, eritrócitos nucleados (cabeça de seta vermelha) e neutrófilos com sinais de toxicidade (cabeça de seta preta). Os eritrócitos permaneceram agrupados microscopicamente quando o sangue foi sujeito a uma diluição de 1:1 com soro fisiológico. Diff-Quik. **(Casos de Hematologia do Laboratório INNO, tendo as imagens A, C e E sido gentilmente cedidas pelo Laboratório INNO).**

I.4) PARASITOLOGIA

Os parasitas podem estar localizados ao longo do tubo digestivo, órgãos internos e na pele dos animais. Algumas fases de vida de diferentes parasitas podem ser encontrados em amostras de expectoração, fezes, sangue, urina, secreções de órgãos genitais e na pele ^[58]. Uma das atividades desenvolvidas durante o estágio curricular foi a preparação, visualização e interpretação de amostras coprológicas por dois métodos diferentes: técnica de flutuação e técnica de Baermann.

As amostras fecais devem ser frescas e preferivelmente colhidas durante o ato de defecação ou diretamente do reto durante o exame físico. As amostras devem ser enviadas para os laboratórios em contentores selados, limpos e devidamente identificados ^[30]. O exame parasitológico das fezes inicia-se pela análise macroscópica da amostra, que inclui os seguintes parâmetros: consistência, cor, presença de sangue, muco, parasitas adultos e corpos estranhos ^[58].

I.4.1) Técnica de Flutuação

Todas as técnicas de flutuação baseiam-se na vantagem da diferença de flutuabilidade dos parasitas relativamente aos resíduos orgânicos ^[58]. As soluções normalmente utilizadas são de: sacarose, cloreto de sódio, nitrato de sódio, sulfato de magnésio ou sulfato de zinco ^[58]. Durante o estágio curricular, a solução utilizada foi o sulfato de zinco. Esta solução possui uma gravidade específica de 1,18 e é melhor comparativamente à sacarose de igual densidade. A razão reside no facto de o sulfato de zinco provocar menor encolhimento e distorção dos cistos protozoários e larvas de nemátodes ^[10]. No entanto, é importante ter em conta que alguns tremátodes e ovos de céstodes da ordem *Pseudophyllidea* poderão não flutuar ^[58]. A técnica de flutuação poderá ser utilizada em conjunto com testes de ELISA para deteção de antigénios fecais. Recentemente, Alves e Santos (2016) determinaram a prevalência de *Giardia spp.* em cães jovens usando uma combinação das duas técnicas anteriores ^[2]. Anteriormente, um estudo descreveu a sensibilidade combinada (97,8%) destas duas técnicas de diagnóstico ^[18]. A figura 5 demonstra a técnica executada no laboratório INNO pelo autor durante o seu estágio curricular.

I.4.2) Técnica de Baermann

A técnica de Baermann é usada para recuperar larvas de nemátodes a partir de fezes, culturas fecais, solo, entre outros [58]. Este teste é utilizado para diagnosticar infecção por larvas do primeiro estágio (L1) em amostras fecais [65]. A água aquecida a 37 °C usada no procedimento estimula a migração das larvas para fora da amostra fecal. As larvas afundam-se, podendo ser colhidas praticamente livres de detritos orgânicos [58]. Esta técnica tira proveito do facto de a maioria das larvas de nemátodes serem incapazes de nadar contra a gravidade [10; 58]. O procedimento descrito é normalmente utilizado para pesquisa de larvas de nemátodes pulmonares (*e.g. Aelurostrongylus*) [10].

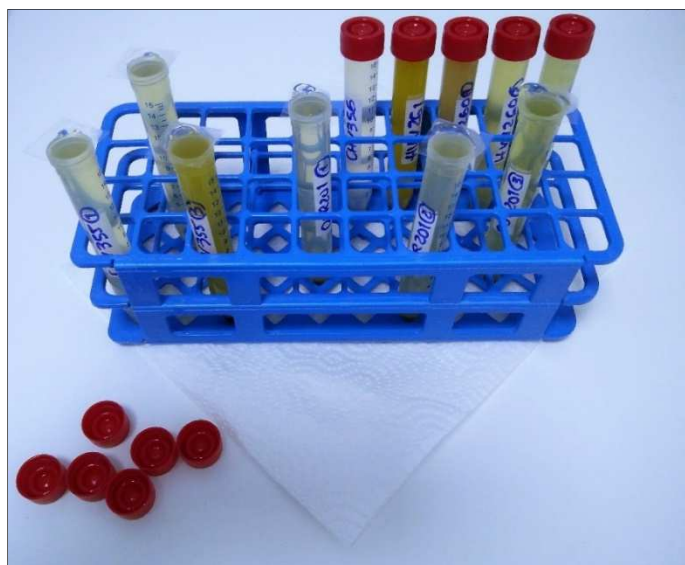


Figura 5- Demonstração da técnica de flutuação. Na figura observam-se os tubos cónicos com aplicação da lamela no topo após centrifugação da amostra fecal com sulfato de zinco (**Imagem captada durante o período de estágio no Laboratório INNO**).

I.5) IMUNOLOGIA

Atualmente existe uma diversidade de testes serológicos que são utilizados com fins diagnósticos em Medicina Veterinária. Estes testes possuem diferentes complexidades, e associam-se a diferentes sensibilidades e especificidades de diagnóstico [16].

As respostas imunes a determinado agente infeccioso podem ser avaliadas de dois modos: 1) pela deteção de antígenos específicos dos agentes infecciosos; 2) pela deteção de anticorpos específicos que indicam que o animal foi previamente exposto a um determinado agente infeccioso [60].

I.5.1) Ensaio Imunoenzimáticos

Um dos testes mais utilizados o estágio curricular foi o ensaio enzimático de imunoabsorção (ELISA) para identificação de anticorpos ou antígenos [60]. No diagnóstico veterinário, os testes de ELISA são geralmente utilizados para deteção e quantificação de anticorpos no soro [64]. As placas com

micropoços de poliestireno utilizadas são revestidas com uma solução de antigénio. Após incubação com soro da amostra a testar e lavagem, é adicionado uma solução contendo antiglobulina quimicamente ligada a uma enzima. A antiglobulina liga-se ao anticorpo e é posteriormente detetada e quantificada através de adição de uma solução de substrato de enzima que desenvolve uma reação colorida. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de antiglobulina conjugada com a enzima e é finalmente analisada visualmente ou por espectrofotometria ^[60].

1.5.2) Diagnóstico sorológico de Leishmaniose Canina

A leishmaniose canina é uma doença transmitida por vetores (mosquitos do género *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) e causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Esta doença é endémica em várias regiões do sul da Europa. O diagnóstico é rotineiramente confirmado por sorologia com a deteção de anticorpos específicos ^[37]. Durante o estágio curricular, uma das técnicas utilizadas para a sua deteção foi a utilização do teste LEISCAN® *Leishmania* ELISA (Laboratório Dr. Esteve S.A., Barcelona, Espanha). Este ensaio é usado para deteção e medição semi-quantitativa de anticorpos anti-leishmaniana no soro de cão ^[53]. Um estudo confirmou que de entre os vários testes disponíveis, o LEISCAN® apresenta maior sensibilidade (98%), especificidade (100%) e eficácia (98%). O mesmo estudo refere que este é o teste mais adequado para exclusão da doença e para a monitorização de resposta à terapia ^[53].

1.6) URIANÁLISE

A urianálise é um exame essencial na clínica de pequenos animais. Mesmo na ausência de sinais clínicos e sintomas, a urianálise está indicada para excluir envolvimento renal em patologias como a diabetes mellitus, ou as infeções por *Leishmania spp.*. O exame dos vários componentes químicos da urina é normalmente efetuado com tiras urinárias que estão impregnadas com reagentes ^[58]. Os parâmetros avaliados na tira urinária são os seguintes: cor, turbidez, densidade, glucose, bilirrubina, proteínas, sangue/hemoglobina, urobilinogénio, leucócitos, bilirrubina, pH, cetonas e nitritos. A tira urinária deve ser mergulhada na amostra de modo a ficar totalmente imersa, devendo ser posteriormente removida e inclinada para remoção do excesso de urina. Alternativamente, a urina poderá ser adicionada a cada quadrado com auxílio de uma pipeta de Pasteur ^[58]. A tira deverá ser lida manualmente com a escala disponível no rótulo da embalagem ou através de equipamentos eletrónicos próprios para o efeito. Durante o estágio curricular, o autor teve contacto com o equipamento CLINITEK Status Analyzer (Siemens Medical Solutions Diagnostics), sendo deste modo possível processar as tiras urinárias pelos dois métodos diferentes (Figura 6).

O exame do sedimento urinário é efetuado após centrifugação a 1000-2000 rpm durante 3 a 5 minutos de uma amostra de 5 a 10 mL de urina, num tubo graduado cónico. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado até perfazer um total de 0,5 mL ^[58]. O remanescente é ressuspendido e o operador deverá colocar uma gota numa lâmina e cobrir com lamela, observando de seguida a preparação a baixa ampliação^[58]. A observação microscópica contempla

essencialmente os seguintes parâmetros: leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais e bactérias, bem como outros achados.

Os achados do sedimento urinário devem ser interpretados tendo em conta o modo de colheita, os resultados da tira urinária (Figura 6) e a densidade urinária (medida com refractómetro) [4]. De igual modo, a condição clínica do animal e os resultados hematológicos e bioquímicos devem ser tidos em conta [4].

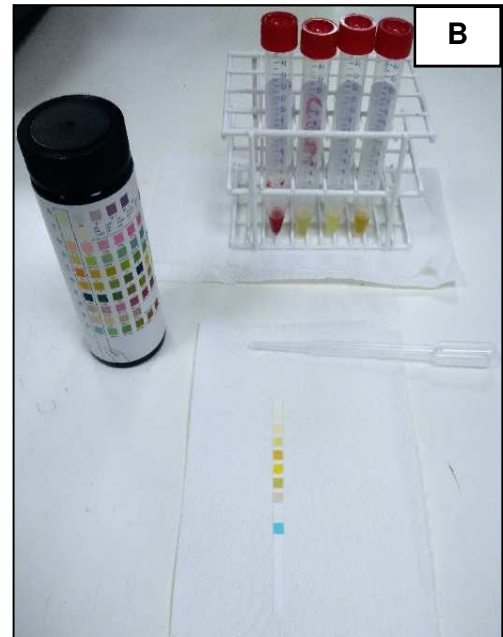


Figura 6 – Demonstração do material utilizado na análise da tira urinária: **(A)** Método de leitura automática através do equipamento CLINITEK Status Analyzer; **(B)** Método de leitura manual na escala disponível no rótulo da embalagem. (Imagem A gentilmente cedida pela Mestre Paula Brilhante Simões; Imagem B captada durante o período de estágio no Laboratório INNO).

II) PATOLOGIA CLÍNICA - INVESTIGAÇÃO

II.1) INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, o número de doenças fúngicas tem vindo a aumentar em plantas e animais, tanto em sistemas controlados como em sistemas naturais, presumivelmente como consequência das alterações ambientais ^[19]. As patologias fúngicas têm importância veterinária devido ao seu potencial zoonótico, às perdas que provocam em animais de produção, à ameaça inerente às espécies protegidas e aos processos patológicos em animais de companhia ^[13]. Estas micoses podem ser divididas em: 1) superficiais (e.g. infeções por *Malassezia spp.*); 2) cutâneas (e.g. dermatofitoses); 3) subcutâneas (e.g. histoplasmose, esporotricose); e 4) profundas (e.g. aspergilose, blastomicose, candidíase, criptococose) ^[11].

A utilidade da citologia no diagnóstico de doenças infecciosas tem sido demonstrada ao longo dos últimos 50 anos ^[49]. A morfologia é um dos pilares principais para a identificação do tipo de fungo presente na amostra citológica. O tipo de estrutura fúngica (hifas, pseudohifas, leveduras), tamanho, tipo de gemulação e ramificação podem auxiliar o patologista a elaborar um diagnóstico diferencial ^[49]. Importa recordar que a identificação citológica de fungos não substitui as técnicas microbiológicas ^[49]. No entanto, nos casos em que a confirmação diagnóstica por meio de cultura não é possível, poderá ser necessário recorrer a uma coloração mais específica para apoiar a identificação ^[32]. As colorações de metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS) e de ácido periódico-Schiff (PAS) coram os polissacarídeos e glicoproteínas presentes na parede celular fúngica. Estas colorações produzem uma oxidação dos carboidratos pela formação de grupos aldeídos, os quais se combinam com os reagentes específicos evidenciando a cor específica de cada coloração. Outras colorações como o mucicarmim ou o Azul de Alcian demonstram as glicoproteínas ácidas existentes na cápsula de certos fungos (e.g. *Cryptococcus spp.*) ^[32; 38]. A utilidade do uso sequenciado de colorações especiais foi já previamente demonstrada para avaliação e identificação de criptococose em líquido cefalo-raquidiano ^[38]. Além disso, as colorações especiais podem ser aplicadas com sucesso em esfregaços citológicos previamente corados com colorações do tipo Romanowsky ^[39].

O objetivo deste estudo é avaliar a utilidade das colorações especiais PAS e GMS para confirmação da presença de organismos fúngicos em amostras citológicas previamente coradas com colorações de rotina (do tipo Romanowsky). A hipótese em estudo é que a aplicação sequencial de PAS e GMS aumente o número de estruturas fúngicas detetáveis no exame microscópico ^[38].

II.2) MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados, retrospectivamente dez casos (5 cães e 5 gatos) cujo diagnóstico citológico era compatível com infecção fúngica (presença de estruturas do tipo levedura e/ou esporos e/ou hifas) (Tabela 4 – Anexos I). Quatro casos foram provenientes do arquivo do serviço de Citologia do Departamento de Medicina Veterinária da Università degli Studi di Milano e seis casos do arquivo do serviço de Citologia do ICBAS-UP. Todas lâminas estavam previamente coradas com coloração do tipo Romanowsky e montadas com meio de montagem comercial. Foi feita uma reavaliação das preparações citológicas, por dois observadores (FS e MS), para confirmação da sua preservação e representatividade. Todas as lâminas coradas com Romanowsky foram digitalizadas no sistema Olympus VS110 (Olympus Corporation, Japan) e pelo programa VS-ASW (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH). Foram marcados cinco campos distribuídos pelo esfregaço e contendo pelo menos uma estrutura compatível com fungo (Figura 7).

As preparações foram posteriormente colocadas em xilol até completa remoção da lamela e do meio de montagem. Após esta etapa, os esfregaços foram reidratados numa série decrescente de etanol (5 minutos em cada uma das seguintes soluções, pela seguinte ordem: etanol a 100%; etanol a 95%; etanol a 70% e água destilada) e lavados em água corrente.

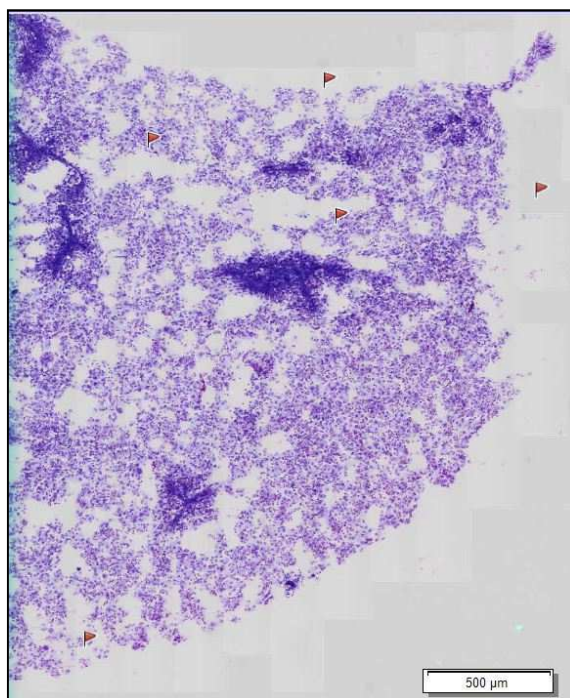


Figura 7 – Exemplo da marcação de 5 campos (marcador corresponde a uma bandeira) na preparação com coloração de Romanowsky digitalizada no sistema Olympus VS110.

Seguidamente foi aplicada a coloração de PAS a todas as lâminas, usando um protocolo de rotina. De modo resumido, o protocolo incluiu: colocação de solução de ácido periódico a 0,5% durante quinze minutos, seguida de lavagens e aplicação da solução do reagente de Schiff durante 15 minutos. Após lavagem foi feito contraste com hematoxilina, secagem e montagem. Procedeu-se a nova digitalização da preparação e à marcação dos mesmos 5 campos previamente assinalados na coloração do tipo Romanowsky (Figura 8A). Para a aplicação do GMS, repetiu-se o procedimento de remoção de lamela. O protocolo para a coloração de GMS incluiu oxidação com ácido crómico a 4% durante uma hora, seguida de lavagem e neutralização em bissulfito de sódio a 1% durante um minuto. Após novas lavagens foi colocada uma solução de metenamina de prata em estufa a 58 °C durante uma hora. Após este passo, foi verificado por observação microscópica o grau de impregnação da prata (as estruturas fúngicas devem estar impregnadas de castanho escuro). Como etapa final as preparações eram lavadas, colocadas em cloreto de ouro a 0,2% durante 5 minutos, novamente lavadas e, por fim eram colocadas em solução de tiosulfato de sódio a 2,5% durante 5 minutos. O verde-luz foi usado como coloração de fundo. Após desidratação e montagem, as preparações foram novamente digitalizadas e procedeu-se à marcação dos mesmos campos registados nas colorações anteriores (Figura 8B).

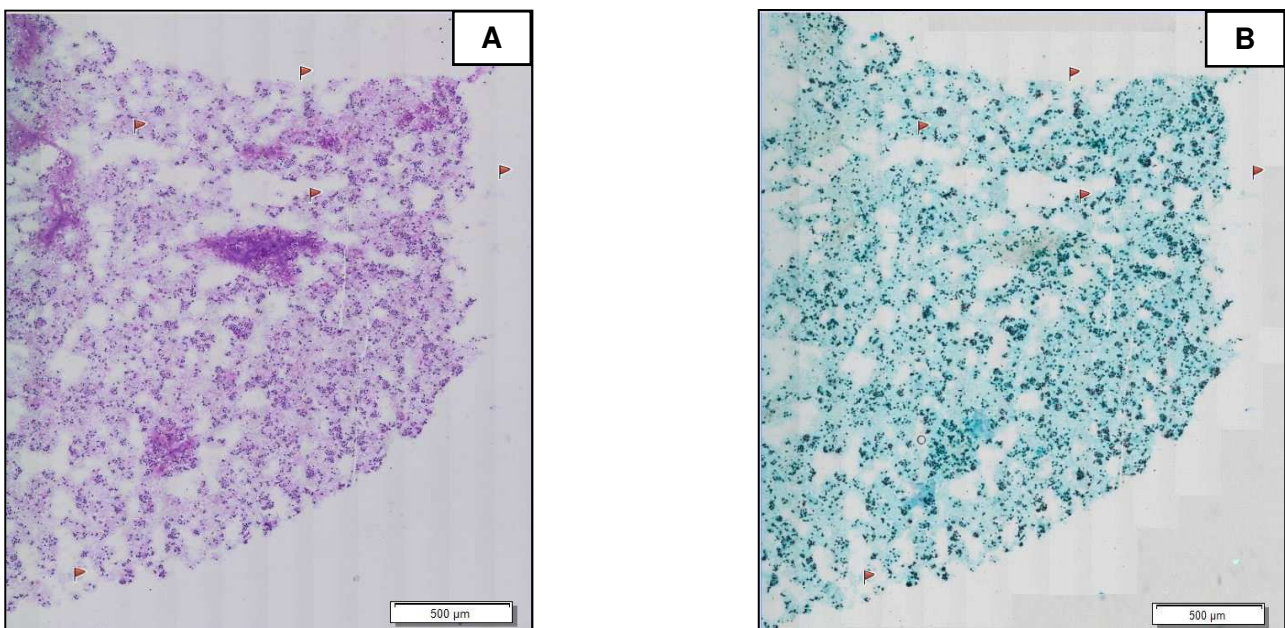


Figura 8 – Representação da digitalização e das marcações dos 5 campos (bandeiras vermelhas) na mesma preparação da Figura 7, com as duas colorações especiais: **(A)** PAS; **(B)** GMS.

Para as colorações PAS e GMS, foram usados controlos positivos histológicos com infeção fúngica comprovada.

As estruturas fúngicas foram contadas e discriminadas em leveduras e/ou esporos e estruturas filamentosas (alongadas e com diâmetro superior a 1 μm) por um observador (FS). Os critérios de contagem foram os seguintes: 1) na coloração do tipo Romanowsky foram contados como leveduras e/ou esporos as estruturas bem preservadas e com citoplasma total ou parcialmente corado de azul; 2) todas as estruturas fúngicas alongadas foram incluídas na categoria de “estruturas filamentosas”, não tendo sido feita a distinção entre verdadeiras hifas e pseudohifas; 3) na coloração de rotina, as estruturas filamentosas foram contabilizadas como estruturas positivas quando o seu citoplasma era pelo menos parcialmente corado de azul; as estruturas do tipo hifas cujo interior surgia óticamente vazio contra um fundo mais corado foram identificadas como “estruturas filamentosas negativas”; 5) nas colorações especiais, as estruturas fúngicas de todos os tipos foram contadas apenas quando apresentavam pelo menos coloração parcial a nível da parede celular na tonalidade esperada (*i.e.* cor rosa em PAS e cor cinzenta a preta em GMS); 6) as leveduras com gémula foram contabilizadas como uma estrutura nas 3 colorações; 7) dado que nem sempre era possível perceber os pontos de ramificação de cada estrutura filamentar, optou-se por contar todas as extremidades livres dessas estruturas nas 3 colorações; 8) os artefactos visíveis nas preparações coradas com Romanowsky (*e.g.* pó de talco, escamas) foram excluídos das contagens, independentemente de ser ou não PAS e/ou GMS positivos.

A análise estatística dos resultados das contagens foi feita no programa R, versão 2.12.1, R Foundation for Statistical Computing (<http://www.r-project.org>). As diferenças nos valores das contagens nas três colorações foram analisadas através do teste Wilcoxon Signed Rank para amostras emparelhadas. O nível de significância para os testes estatísticos foi estabelecido em $p < 0,001$ (este valor de p foi escolhido considerando o baixo número de casos do estudo)

II.3) RESULTADOS

As colorações de PAS e GMS foram aplicadas com sucesso em todos os casos, ainda que num caso, cujo o esfregaço era mais espesso tenha havido necessidade de repetição, devido à marcação muito ténue observada.

A marcação dos campos em PAS foi rápida, dado que os citoplasmas e os núcleos das células presentes em cada campo apresentaram-se ligeiramente corados de rosa o que facilitava a identificação dos campos pretendidos. Já no GMS, o contraste de verde-luz não permitiu destacar os núcleos, sendo inclusivamente difícil diferencia-los de eritrócitos, tornando a tarefa de localização de campos mais demorada.

Relativamente à identificação de estruturas fúngicas, as leveduras e/ou esporos visíveis na coloração de rotina apresentaram um centro corado de azul-escuro e habitualmente rodeados de

um halo claro. Em oito casos foram observadas apenas estruturas do tipo levedura e/ou esporos, sendo que em seis destes casos a morfologia das leveduras (tamanho, cápsula, gemulação de base estreita) era compatível com *Cryptococcus spp.*. Os organismos apresentavam halos claros correspondentes a cápsulas não coradas, cuja espessura era variável entre os casos. Nos restantes dois casos foram observadas hifas e estruturas redondas compatíveis com esporos (um dos casos era morfológicamente compatível com *Aspergillus spp.*) (Figura 9 A, B e C).

Nos casos de criptococose, a marcação PAS foi mais acentuada na parede celular, mantendo-se o halo (correspondente à cápsula do organismo) não corado, permitindo também uma melhor observação da gemulação de base estreita. Nos outros dois casos em que se observaram apenas leveduras/esporos, o PAS corou uniformemente o interior do fungo incluindo o halo que surgia negativo na coloração de Romanowsky (Figura 9 D, E e F). A afinidade da coloração PAS para as hifas foi mais variável. Foram observáveis desde hifas completamente coradas e com a septação evidente até hifas não detetáveis (as quais apareciam coradas em Romanowsky ou depois em GMS), passando por hifas com marcação interna focal, não homogénea (Figura 9B).

Na coloração de GMS, verificou-se presença variável de pequenos precipitados pretos em plano de fundo que, contudo, não inviabilizaram a observação das estruturas fúngicas em nenhum dos casos. Na preparação citológica de *Aspergillus spp.*, a coloração apresentou marcação preta completa e homogénea ao longo das hifas (Figura 9C). No outro caso onde estavam presentes hifas, a marcação variava de tonalidade (preto a cinzento) e apresentava-se menos homogénea ao longo da estrutura (em algumas hifas visíveis em Romanowsky ou PAS havia apenas coloração esverdeada correspondente à coloração com o verde-luz, pelo que não foram contabilizadas) (Figura 10C). Considerando todos os casos de criptococose, só num dos campos é que não houve marcação para GMS. Nos restantes campos de todos os casos, a marcação das leveduras era intensa, preta e homogénea; em alguns casos marcou parcialmente a cápsula, pelo que as leveduras apresentaram, aparentemente maior diâmetro. No caso suspeito de dermatofitose, a coloração revelou diferentes tonalidades: desde preto a cinzento (Figura 9F). Um outro caso com esporos/leveduras, o GMS marcou de modo homogéneo e intenso (cor preta) as estruturas fúngicas, permitindo uma completa definição dos seus limites (parede celular). No geral, as estruturas independentemente da sua morfologia positivas para PAS eram também GMS positivas. No entanto, ocasionalmente estruturas PAS positivas eram negativas para a coloração GMS e vice-versa. Num caso, o GMS permitiu a identificação e distinção de pseudohifas e hifas verdadeiras com ramificação, e pequenas leveduras em gemulação (Figura 10). Perante estes achados foi possível inferir que a morfologia era compatível com *Candida spp.* ^[47; 49].

Os resultados das contagens no total dos 5 campos em cada caso são apresentados na Tabela 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ROMANOWSKY	Leveduras/Esporos	1	54	175	4	25	112	131	166	311	18
	EFP	20	0	0	10	0	0	0	0	0	0
	EFN	12	0	0	3	0	0	0	0	0	0
PAS	Leveduras/Esporos	4	72	592	6	25	184	152	145	347	21
	EFP	35	0	0	13	0	0	0	0	0	0
GMS	Leveduras/Esporos	4	81	481	9	17	214	164	179	398	30
	EFP	56	0	0	23	0	0	0	0	0	0

Tabela 5 – Contagens totais das estruturas fúngicas observáveis nos 5 campos de cada um dos 10 casos citológicos incluídos neste estudo. EFP – Estruturas filamentosas positivas; EFN – Estruturas filamentosas negativas.

Os resultados dos testes estatísticos são apresentados na Tabela 6. O PAS e GMS permitiram, de modo significativo visualizar mais leveduras/esporos ($p < 0,001$), sendo que esta tendência ocorre também com as estruturas filamentosas positivas ainda que as diferenças entre os números observáveis em PAS ou GMS relativamente à coloração de rotina eram menores. Na comparação PAS *versus* GMS, ainda que esta última marque, em média, mais leveduras/esporos e estruturas filamentosas positivas, a diferença entre as duas colorações é menos marcada do que aquela entre Romanowsky *versus* PAS ou Romanowsky *versus* GMS (Tabela 7). Quando agrupamos o número de esporos/leveduras e estruturas filamentosas positivas, verificamos que o GMS permite visualizar de modo significativo um maior número de estruturas comparativamente ao PAS. Para as estruturas filamentosas negativas na coloração de rotina não se procedeu à análise estatística uma vez que não foram identificadas deste modo nas colorações especiais.

		Mínimo	Mediana	Média	Máxima
Romanowsky	EFP	0	0	0.6	8
	EFN	0	0	0.3	5
	Leveduras/Esporos	0	14.5	19.9	102
	EFP + Leveduras/Esporos	0	14.5	20.5	102
PAS	EFP	0	0	1.0	13
	Leveduras/Esporos	0	15.5	31.0	273
	EFP + Leveduras/Esporos	1	16	31.9	273
GMS	EFP	0	0	1.58	22
	Leveduras/Esporos	0	19	31.5	45
	EFP + Leveduras/Esporos	0	20.5	33.1	273

Tabela 6. – Valor médio, mediano, mínimo e máximo de estruturas fúngicas contadas nos campos dos 10 casos incluídos no estudo. EFP – Estruturas filamentosas positivas; EFN – Estruturas filamentosas negativas.

P value	Romanowsky - PAS	Romanowsky - GMS	PAS - GMS
EFP	0.022	0.0057	0.0088
Leveduras/Esporos	0.0001(*)	<0.0001(*)	0.0019
EFP + Leveduras/Esporos	<0.0001(*)	<0.0001(*)	0.0001(*)

Tabela 7 – Resultados do teste Wilcoxon Signed Rank para amostras emparelhadas. O nível de significância para os testes estatísticos foi estabelecido em $p < 0,001$. EFP – Estruturas filamentosas positivas. Asterisco (*) – valor de p estatisticamente significativo.

II.4) DISCUSSÃO

No geral, as colorações do tipo Romanowsky são a base para diagnosticar/suspeitar de infecções fúngicas durante a análise citológica [52]. No entanto, devido a diferentes afinidades dos componentes das estruturas fúngicas para a coloração de rotina, poderá ser necessário a utilização de GMS e PAS para melhor avaliação da morfologia e confirmação do diagnóstico de infecção fúngica [49]. Neste estudo, comprovamos que as colorações PAS e GMS podem ser aplicadas diretamente a amostras citológicas previamente coradas sem necessidade de descoloração, como tinha sido anteriormente publicado [39].

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que, no caso do PAS, há uma maior afinidade de coloração da parede celular dos esporos/leveduras e uma afinidade variável no caso das hifas, o que confirma resultados previamente publicados [49]. Esta ocorrência poderá dever-se à presença de uma maior espessura da parede celular das hifas, o que poderá dificultar a sua coloração [43]. Corroborando estudos prévios, verificamos que o GMS marcava quer o interior, quer a parede do fungo, contribuindo para uma melhor identificação da morfologia celular [24; 25; 38; 49]. Apesar do GMS marcar em média mais estruturas do que o PAS, verificou-se também que ocasionais estruturas PAS positivas eram negativas para a coloração GMS. A possibilidade de discrepância na afinidade das estruturas fúngicas para o PAS e para o GMS, justifica a recomendação para a utilização sequencial das duas colorações (e não de uma apenas) em amostras com suspeita microscópica de fungos [38].

As colorações de PAS e GMS permitem de modo significativo visualizar mais estruturas fúngicas e uma melhor discriminação da sua morfologia, o que poderá ser relevante para amostras com o baixo número de fungos ou com estruturas mal definidas (cuja origem fúngica não possa ser completamente descartada) na coloração de rotina. Num dos casos incluídos neste estudo, ambas as colorações especiais, mas especialmente o GMS permitiu identificar pseudohifas (as quais não eram visíveis na coloração de rotina), pelo que foi possível suspeitar do provável agente etiológico envolvido. A presença de pseudohifas em associação com leveduras e hifas é característico de *Candida albicans*, um fungo considerado polimórfico [47; 49]. Esta observação reforça a importância das colorações PAS e GMS na avaliação citológica de amostras com suspeita clínica ou microscópica de infecção fúngica, levando a hipótese de que estas colorações possam ser constituir um importante exame auxiliar para a identificação da espécie de fungo envolvida no processo patológico. Esta hipótese deverá ser confirmada em estudos futuros com um maior número de casos.

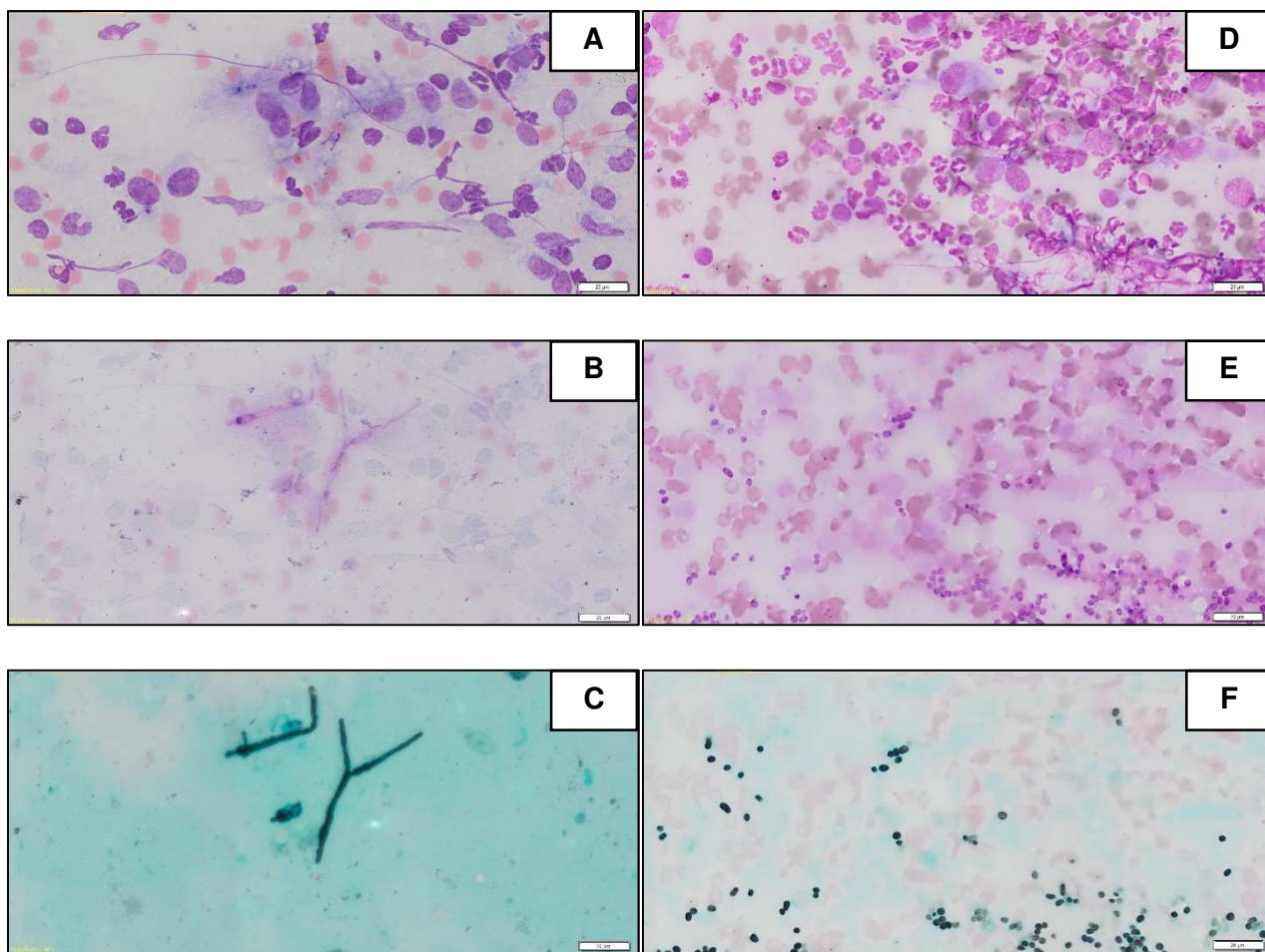


Figura 9 - Exemplo da aplicação das colorações sequenciais em dois casos distintos contendo hifas (**A**, **B** e **C**) e esporos (**D**, **E** e **F**). Em (**A**) e (**D**) preparações citológicas com coloração Romanowsky; em (**D**) e (**E**) as mesmas áreas com a coloração PAS; e em (**C**) e (**F**) as mesmas áreas com a coloração de GMS. Barra = 20 µm.

Uma das dificuldades metodológicas neste estudo foi a identificação dos campos nas preparações digitalizadas coradas com GMS. Esta dificuldade estava relacionada, conforme já referido, com o baixo contraste entre citoplasmas e núcleos que o corante verde-luz permitia. Numa preparação extra de um dos casos o verde-luz foi substituído por hematoxilina (dados não apresentados). Esta alteração permitiu uma melhor distinção dos eritrócitos e das células inflamatórias, pelo que antecipamos que possa facilitar também a identificação de campos e, neste sentido resolve esta dificuldade prática.

Apesar dos resultados promissores relativamente à utilização sequencial das colorações PAS e GMS em preparações citológicas com fungos, este estudo apresenta também limitações. Uma dessas limitações é que nas amostras utilizadas não havia confirmação microbiológica e/ou molecular das espécies fúngicas envolvidas. Além disso, o número de amostras utilizado é reduzido, pelo que o estudo deverá ser alargado com a inclusão de mais casos no sentido de aumentar o seu poder estatístico. No futuro, será também importante avaliar outras colorações, como o mucicarmim ou o Azul de Alcian para avaliar o seu contributo para a identificação de estruturas fúngicas em amostras citológicas. Contribuindo deste modo para sistematizar e criar diagramas de colorações,

semelhantes aos existentes na Medicina Humana, que auxiliem no diagnóstico citológico de infecções fúngicas em animais [43].

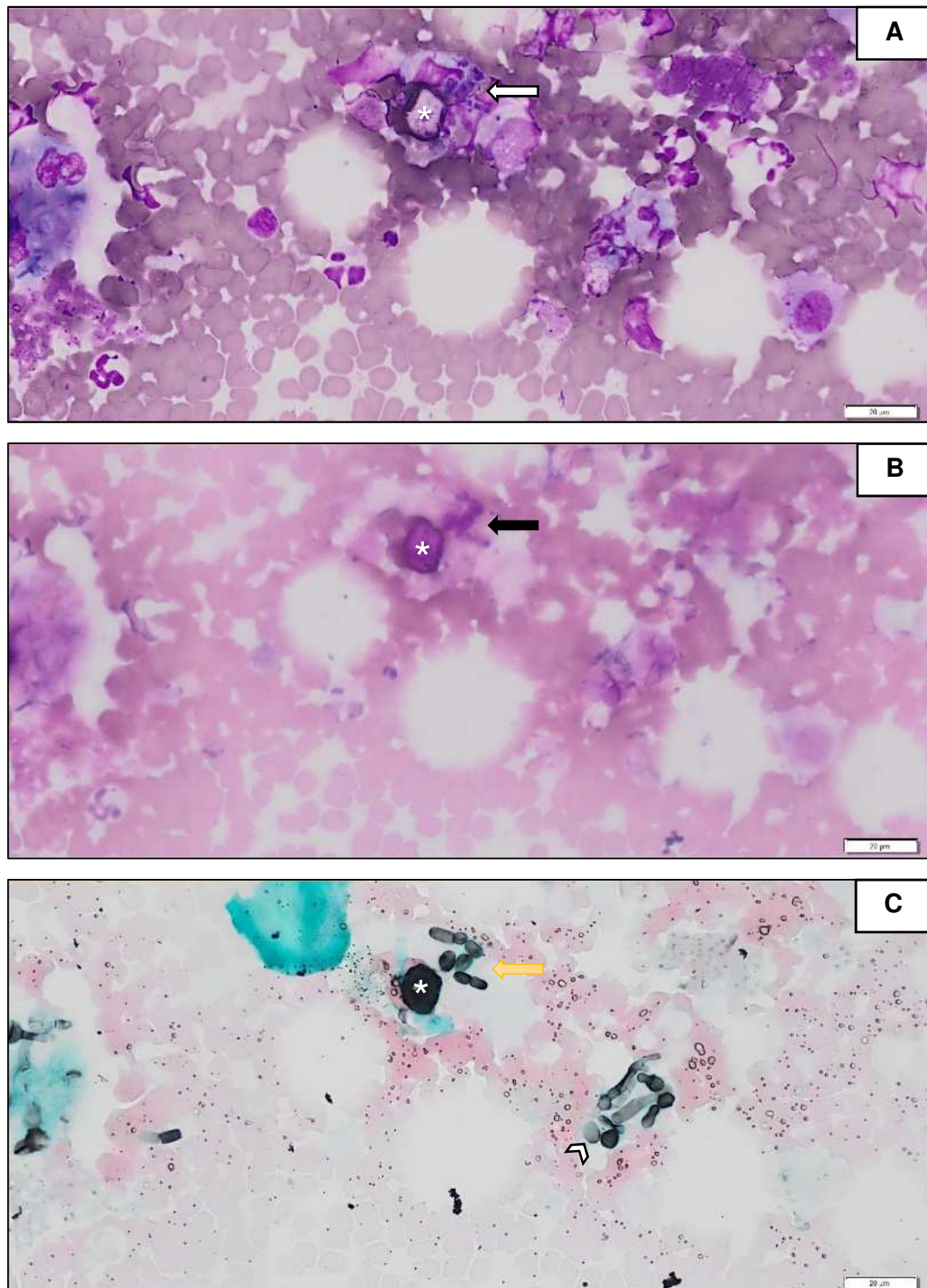


Figura 10 – Caso citológico de um cão onde foram aplicadas sequencialmente as três colorações. Em (A) observa-se a presença de uma estrutura compatível com hifa (seta branca) fagocitada por um macrófago, Diff-Quik. Em (B) verifica-se que a mesma estrutura de (A) é na realidade uma pseudohifa (seta preta), PAS. Em (C) observa-se um maior número de estruturas fúngicas: pseudohifas (seta amarela), esporos (cabeça de seta) e hifas verdadeiras, a maioria das quais não estão coradas pelo PAS, GMS. Há presença de alguns artefactos (*i.e.* grãos de pó de talco) nas 3 imagens, assinalados com asteriscos brancos, que apesar de serem positivos para as colorações especiais, não foram contabilizados como estruturas fúngicas. Barra = 20 µm.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Abbadi MA (2011), 'Basics of cytology', **Avicenna J Med**, 1 (1), 18-28.
2. Alves J, Santos A (2016), 'Prevalence of Giardia spp. in young dogs using a combination of two diagnostic methods', **Acta Parasitol**, 61 (2), 261-6.
3. Andreasen CB (2011), 'Protecting animal and human health and the nation's food supply through veterinary diagnostic laboratory testing', **Clin Lab Med**, 31 (1), 173-80.
4. Archer J (2005), 'Urine Analysis'. In: Villiers E, Blackwood L (ed.), **BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology** (2nd edn.: Wiley), 149-68.
5. Avallone G, *et al.* (2007), 'The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization', **Vet Pathol**, 44 (5), 607-20.
6. Ballegeer EA, *et al.* (2007), 'Correlation of ultrasonographic appearance of lesions and cytologic and histologic diagnoses in splenic aspirates from dogs and cats: 32 cases (2002-2005)', **J Am Vet Med Assoc**, 230 (5), 690-6.
7. Bauer N, *et al.* (2011), 'Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA(R) 2120 for its use in dogs, cats, and horses: Part I--precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count', **J Vet Diagn Invest**, 23 (6), 1168-80.
8. Bauer N, *et al.* (2012), 'Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA (R) 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging', **J Vet Diagn Invest**, 24 (1), 74-89.
9. Bowlit KL, *et al.* (2014), 'Prospective study to investigate the use of fine needle aspiration techniques in UK veterinary practice', **J Small Anim Pract**, 55 (8), 409-14.
10. Bowman DD (2014), 'Diagnostic Parasitology'. In: Bowman DD (ed.), **Georgis' Parasitology for Veterinarians** (10th edn.: Elsevier Health Sciences), 326-31.
11. Cafarchia C, Figueredo LA, Otranto D (2013), 'Fungal diseases of horses', **Vet Microbiol**, 167 (1-2), 215-34.
12. Caniatti M, *et al.* (2001), 'Cytological features of canine haemangiopericytoma in fine needle aspiration biopsy', **Vet Rec**, 149 (8), 242-4.
13. Carrasco L, Perez J (2000), '[Histopathological diagnosis of mycoses in veterinary pathology]', **Rev Iberoam Micol**, 17 (1), S18-22.
14. Christopher MM (2011), 'Veterinary laboratory medicine. Preface', **Clin Lab Med**, 31 (1), xiii-xvi.
15. Christopher MM, Hotz CS, Shelly SM, Pion PD (2008), 'Use of cytology as a diagnostic method in veterinary practice and assessment of communication between veterinary practitioners and veterinary clinical pathologists', **J Am Vet Med Assoc**, 232 (5), 747-54.
16. Day MJ, Schultz RD (2010), 'Serological Testing'. In: Day MJ, Schultz RD (ed.), **Veterinary Immunology: Principles and Practice** (1st edn.: Manson Publishing), 39-49.
17. Dey P (2007), 'Time for evidence-based cytology', **Cytojournal**, 4, 1.
18. Dryden M, Payne P, Smith V (2006), 'Accurate Diagnosis of Giardia spp. and Proper Fecal Examination Procedures', **Veterinary Therapeutics**, 7 (1), 4-14.
19. Fisher MC, *et al.* (2012), 'Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health', **Nature**, 484 (7393), 186-94.
20. Garon CL, Cohn LA, Scott MA (2010), 'Erythrocyte survival time in Greyhounds as assessed by use of in vivo biotinylation', **Am J Vet Res**, 71 (9), 1033-8.
21. Geisinger KR, *et al.* (2003), 'Introduction'. In: Geisinger KR (ed.), **Modern Cytopathology** (1st edn.: Churchill Livingstone), 1-10.
22. Ghisleni G (2006), 'L'esame citologico'. In: Ghisleni G (ed.), **Atlante di Citologia Diagnostica del Cane e del Gatto** (1st edn.: Point Veterinaire Italie), 13-15.
23. Ghisleni G, *et al.* (2006), 'Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats', **Vet Clin Pathol**, 35 (1), 24-30.
24. Guarner J, Brandt ME (2011), 'Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century', **Clin Microbiol Rev**, 24 (2), 247-80.
25. Haque A (2010), 'Special Stains Use in Fungal Infections'. In: Kumar GL, Kiernan JA (ed.), **Special Stains and H & E** (2nd edn.: Dako Education Guides), 233-40.

26. Harvey JW (2011), 'Hematology Procedures'. In: Harvey JW (ed.), **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas** (1st edn.: Elsevier Health Sciences), 11-32.
27. Harvey JW (2011), 'Evaluation of Hemostasis: Coagulation and Platelet Disorders'. In: Harvey JW (ed.), **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas** (1st edn.: Elsevier Health Sciences), 191-233.
28. Harvey JW (2011), 'Evaluation of Leukocytic Disorders'. In: Harvey JW (ed.), **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas** (1st edn.: Elsevier Health Sciences), 122-75.
29. Harvey JW (2011), 'Evaluation of Erythrocytes'. In: Harvey JW (ed.), **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas** (1st edn.: Elsevier Health Sciences), 49-121.
30. Hendrix CM, Post KW (2016), 'Parasitology ', <<http://www.merckvetmanual.com/clinical-pathology-and-procedures/diagnostic-procedures-for-the-private-practice-laboratory/parasitology>>, accessed February 20, 2017.
31. Jain NC (1993), 'Interpretation of Leukocyte Parameters'. In: Jain NC (ed.), **Essentials of Veterinary Hematology** (1st edn.: Wiley), 295-306.
32. Lazcano O, *et al.* (1991), 'Combined Fontana-Masson-mucin staining of Cryptococcus neoformans', **Arch Pathol Lab Med**, 115 (11), 1145-9.
33. Lilliehook I, Tvedten H (2009), 'Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts', **Vet Clin Pathol**, 38 (2), 163-74.
34. Lilliehook I, Tvedten H (2009), 'Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts', **Vet Clin Pathol**, 38 (2), 175-82.
35. Marcos R, Santos M (2011), 'Técnicas de Colheita e Coloração de Esfregaços'. In: Peleteiro MC, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissara H, Carvalho T (ed.), **Atlas de Citologia Veterinária** (1st edn.: Lidel), 1-28.
36. Marcos R, Santos M, Pissarra H, Peleteiro MC (2011), 'Pele, seus Anexos e Tecido Subcutâneo'. In: Peleteiro MC, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissara H, Carvalho T (ed.), **Atlas de Citologia Veterinária** (1st edn.: Lidel), 45-100.
37. Marcos R, *et al.* (2015), 'David and Goliath in a dog's blood', **Vet Clin Pathol**, 44 (4), 475-6.
38. Marcos R, *et al.* (2016), 'The cryptic Cryptococcus', **Vet Clin Pathol**, 45 (4), 532-33.
39. Marcos R, *et al.* (2009), 'Use of destained cytology slides for the application of routine special stains', **Vet Clin Pathol**, 38 (1), 94-102.
40. Masserdotti C (2006), 'Architectural patterns in cytology: correlation with histology', **Vet Clin Pathol**, 35 (4), 388-96.
41. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD (2014), 'Cell Types and Criteria of Malignancy'. In: Cowell RL, Valenciano AC (ed.), **Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat** (4th edn.: Elsevier Inc.), 20-47.
42. Meinkoth JH, Cowell RL, Tyler RD, Morton RJ (2014), 'Sample Collection and Preparation'. In: Cowell RL, Valenciano AC (ed.), **Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat** (4th edn.: Elsevier Inc.), 1-19.
43. Mohan SK (2009), 'Chapter 2'. In: Mohan SK (ed.), **Gram Stain: Looking Beyond Bacteria to Find Fungi in Gram Stained Smear. A Laboratory Guide for Medical Microbiology** (1st edn.: AuthorHouse), 6-20.
44. Moritz A, Becker M (2011), 'Automated Hematology Systems'. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (ed.), **Schalm's Veterinary Hematology** (6th edn.: Wiley), 1054-66.
45. Nasuti JF, Gupta PK, Baloch ZW (2002), 'Diagnostic value and cost-effectiveness of on-site evaluation of fine-needle aspiration specimens: review of 5,688 cases', **Diagn Cytopathol**, 27 (1), 1-4.
46. Oellers DE, *et al.* (2016), 'Optimized gating and reference ranges of reticulated platelets in dogs for the Sysmex XT-2000iV', **BMC Vet Res**, 12 (1), 148.
47. Pantanowitz L, G Leimen, LS Garcia (2011), 'Microbiology'. **Cytopathology of Infectious Diseases** (Springer New York), 54-70.
48. Pinkerton PH, *et al.* (1970), 'An assessment of the Coulter counter model S', **J Clin Pathol**, 23 (1), 68-76.
49. Powers CN (1998), 'Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective', **Clin Microbiol Rev**, 11 (2), 341-65.

50. Rakich PM, Latimer KS (2011), 'Cytology'. In: Kenneth S. Latimer (ed.), **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology** (5th Edition edn.: Wiley-Blackwell), 331-63.
51. Raskin RE (2013), 'Historical Overview of Evidence-Based Diagnostic Cytology Including Bone Marrow in Veterinary Medicine', <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCYQFiAA&url=http%3A%2F%2Fwww.acvp.org%2Fmeeting%2F2013%2FappFiles%2F35_Raskin.docx&ei=OmN-VNN7i7FpwOyCA0&usq=AFQjCNFvDFjvzAv2puEwjWadBCtwg9Vr0Q&sig2=Fqd0UEvtBqTicc2w_QDBYA>, accessed February 20, 2017.
52. Raskin RE (2016), 'General Categories of Cytologic Interpretation'. In: Raskin RE, Meyer DJ (ed.), **Canine and Feline Cytology** (3rd edn.: Elsevier), 16-33.
53. Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Todoli F, Alberola J (2013), 'Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs', **Vet Parasitol**, 191 (3-4), 363-6.
54. Ruslander DA, *et al.* (1997), 'Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders', **In Vivo**, 11 (2), 169-72.
55. Serra M, Freeman KP, Campora C, Sacchini F (2012), 'Establishment of canine hematology reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer using a blood donor database', **Vet Clin Pathol**, 41 (2), 207-15.
56. Sharkey LC, Wellman ML (2011), 'Diagnostic cytology in veterinary medicine: a comparative and evidence-based approach', **Clin Lab Med**, 31 (1), 1-19.
57. Sharkey LC, Dial SM, Matz ME (2007), 'Maximizing the diagnostic value of cytology in small animal practice', **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 37 (2), 351-72, vii.
58. Sirois M (2015), 'Preparation of Cytology Smears'. In: Sirois M (ed.), **Laboratory Procedures for Veterinary Technicians** (6th edn.: Elsevier Inc.), 372-78.
59. Skeldon N, Dewhurst E (2009), 'The perceived and actual diagnostic utility of veterinary cytological samples', **J Small Anim Pract**, 50 (4), 180-5.
60. Tizard IR (2013), 'Immunodiagnostic Techniques'. In: Tizard IR (ed.), **Veterinary Immunology** (9th edn.: Elsevier Health Sciences), 494-514.
61. Tvedten H (2000), 'Disorders of leucocyte number'. In: Day M, Mackin A, Littlewood J (ed.), **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine** (1st edn.: Wiley), 98-106.
62. Vacha J (1983), 'Red cell lifespan'. In: Agar NS, Board PG (ed.), **Red Blood Cells of Domestic Mammals** (1st edn.: Elsevier), 67.
63. Villiers E (2000), 'Introduction to Hematology'. In: Day M, Mackin A, Littlewood J (ed.), **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine** (1st edn.: Wiley), 23-32.
64. Warren AM (2014), 'Veterinary Clinical Laboratory Immunology'. In: Callahan GN, Yates RM (ed.), **Basic Veterinary Immunology** (1st edn.: University Press of Colorado), 295-316.
65. Zajac AM, Saleh M (2013), 'The Baermann test: Try this parasitology test in your practice', **Veterinary Medicine**, 108 (1), 18.

ANEXOS

Anexos I: Tabelas

			<i>N</i> casos	(%)
Lesões benignas	Quistos		10	2.7
	Lesão benigna de conteúdo queratinico		23	6.1
	Outros (Hiperplasia, Negativo para neoplasia...)		16	4.3
	<i>Calcinosis Cutis</i>		2	0.5
Inflamação	Tipos	Piogranulomatosa	48	12.8
		Neutrófila	26	7.0
		Granulomatosa	11	2.9
		Eosinófila	5	1.3
		Mista	9	2.4
	Agentes etiológicos	<i>Coccus</i>	12	3.2
		Bastonetes	6	1.6
		Clostridiose	1	0.3
		<i>Micobacterium</i>	2	0.5
		<i>Actinomyces / Nocardia</i>	4	1.1
		Esporotricose	1	0.3
		Histoplasmose	1	0.3
		Criptococose	1	0.3
		Fungos (hifas)	4	1.1
		<i>Rinosporidium</i>	1	0.3
		<i>Malassezia</i>	6	1.6
		<i>Blastomyces</i>	1	0.3
		Coccidiose	1	0.3
		<i>Leishmania</i>	2	0.5
		<i>Dirofilaria</i>	3	0.8
Pseudomicetoma	1	0.3		
Babesiose	1	0.3		
<i>Hepatozoon canis</i>	1	0.3		
Esgana	1	0.3		
<i>Herpesvirus</i>	1	0.3		
<i>Prototheca</i>	1	0.3		

Tabela 1 – Casuística do diagnóstico citológico na Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano. Foram observados um total de 374 casos citológicos.

			<i>N casos</i>	<i>(%)</i>
Neoplasia	Epitelial	Benigna	28	7.5
		Hiperplasia / Adenoma sebáceo	7	1.9
		Neoplasia de células basais	6	1.6
		Adenoma das glândulas perianais	5	1.3
		Epitelioma sebáceo	1	0.3
		Timoma	2	0.5
		Neoplasias com origem no folículo piloso	7	1.9
		Maligna	26	7.0
		Adenocarcinoma das gl. apócrinas dos sacos anais	5	1.3
		Carcinoma escamoso	8	2.1
		Hepatocarcinoma	2	0.5
		Neoplasia indiferenciada	11	2.9
	Células mesenquimais	Benigna	27	7.2
		Lipoma	24	6.4
		Mixoma	2	0.5
		Rabdomioma	1	0.3
		Maligna	19	5.1
		Lipossarcoma	1	0.3
		Osteossarcoma	3	0.8
		Tumor da Parede Perivascular maligno	2	0.5
		Sarcoma Anaplásico Cél. Gigantes	2	0.5
		Angiossarcoma	1	0.3
	Sarcoma indiferenciado	10	2.7	
	Células redondas	Total	77	20.6
		Histiocitoma	5	1.3
		TVT	2	0.5
		Mastocitoma	10	2.7
Linfoma		39	10.4	
Plasmocitoma		3	0.8	
Sarcoma Histiocitário		1	0.3	
Neoplasia indiferenciada	17	4.5		
Núcleos Livres	Total	2	0.5	
	Adenocarcinoma adrenocortical	1	0.3	
	Feocromocitoma	1	0.3	
Melanoma	Total	8	2.1	
Inconclusivo			37	9.9
TOTAL			374	100

Tabela 2 – (Continuação) Casuística do diagnóstico citológico na Faculdade de Medicina Veterinária - Università degli Studi di Milano. Foram observados um total de 374 casos citológicos.

	Células redondas	Epiteliais	Mesenquimatosas	Núcleos livres
Celularidade	Elevada	Elevada	Tendencialmente de baixa celularidade devido à aderência celular à matriz; tumores malignos podem conter elevada celularidade	Elevada
Distribuição celular	Igualmente distribuída pela amostra	Apresentação em grupos; contudo, as células malignas podem perder coesividade	Isoladas ou em agregados com matriz	Numerosos núcleos livres distribuídos livremente
Tamanho e forma celular	Pequenas a médias dimensões, geralmente com limites citoplasmáticos definidos	Pequenas a grandes dimensões, geralmente com limites citoplasmáticos definidos, de forma redonda a poligonal. Formas cuboidais, colunares ou redondas dependendo do tecido	Fusifforme, ovais ou estreladas, geralmente com limites citoplasmáticos indistintos	Redondas a poligonais, com limites citoplasmáticos indistintos
Outras características sugestivas	Núcleo redondo a indentado	Formação de ácinos ou túbulos; diferenciação escamosa; células grandes com citoplasma abundante; células aderentes	Presença de matriz extracelular eosinofílica; núcleos redondos a elípticos	Núcleo redondo a indentado

Tabela 3 – Critérios gerais de morfologia celular citológica (adaptado de [41; 52]).

Número	Espécie (Canina ou Felina)	Raça	Sexo	Lesão	Modo de recolha de amostra	Estruturas fúngicas
1	C	Pastor Alemão	F	Linfadenopatia sistémica	PAAF	Hifas (provável <i>Aspergillus spp.</i>)
2	C	Cocker Spaniel	F	Cavidade oral	Brushing	Esporos/Leveduras
3	C	Dogue Argentino	M	Massa cutânea, zona abdominal	PAAF	Esporos/Leveduras
4	C	Pastor Alemão	F	Ossos femorais	PAAF	Hifas e Esporos/Leveduras
5	C	Indeterminada	M	Massa abdominal	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>
6	F	Europeu Comum	M	Gânglio pré-escapular	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>
7	F	Europeu Comum	M	Tumefacção nasal	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>
8	F	Europeu Comum	F	Massa cutânea interdigital	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>
9	F	Europeu Comum	F	Tumefacção região supraorbitária	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>
10	F	Europeu Comum	F	Tumefacção nasal	PAAF	Leveduras <i>Cryptococcus spp.</i>

Tabela 4 – Casos citológicos utilizados para o trabalho de investigação.

Anexos II: Gráficos

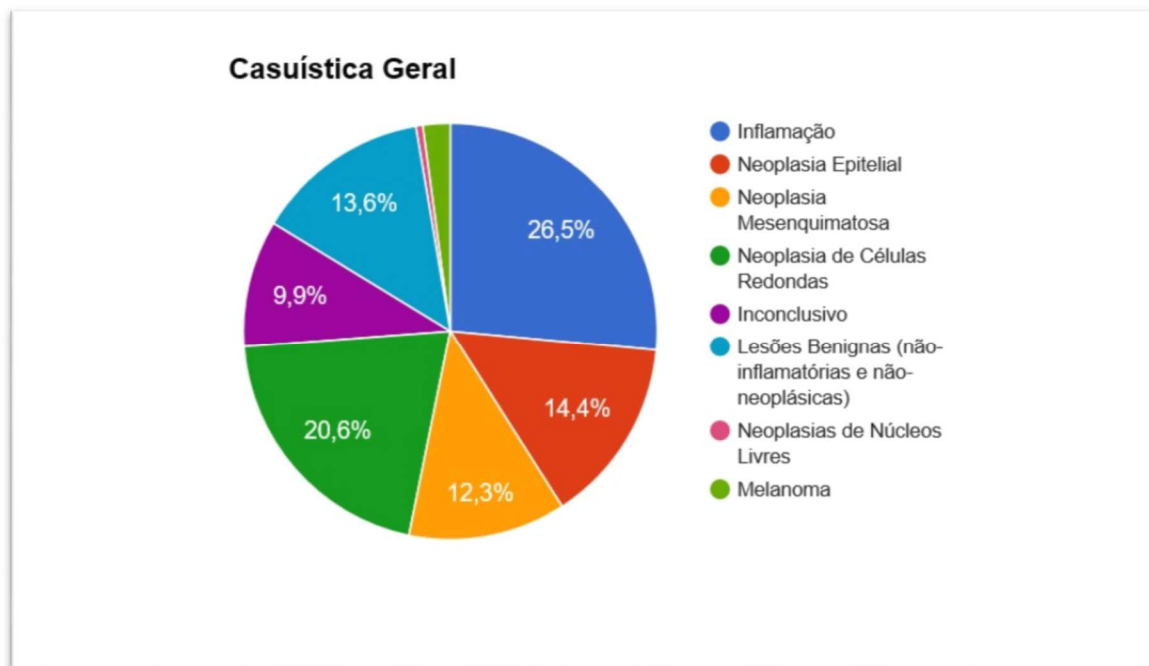


Gráfico 1 – Casuística Geral de todos os casos citológicos observados num período de 9 semanas na Facoltà di Medicina Veterinaria da Università degli Studi di Milano.

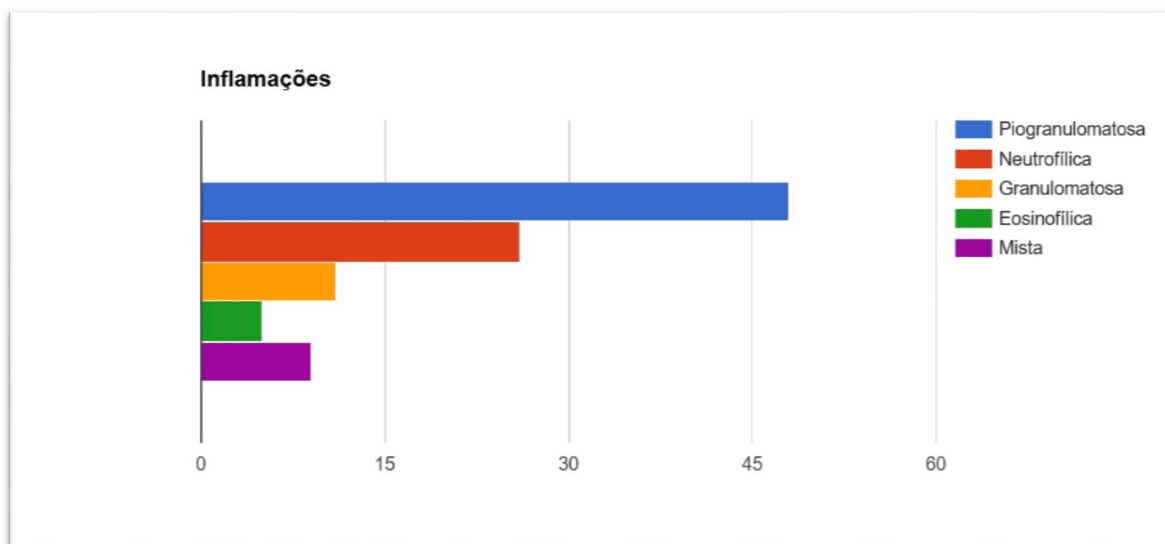


Gráfico 2 – Inflamações observadas nos casos citológicos observados num período de 9 semanas na Facoltà di Medicina Veterinaria da Università degli Studi di Milano

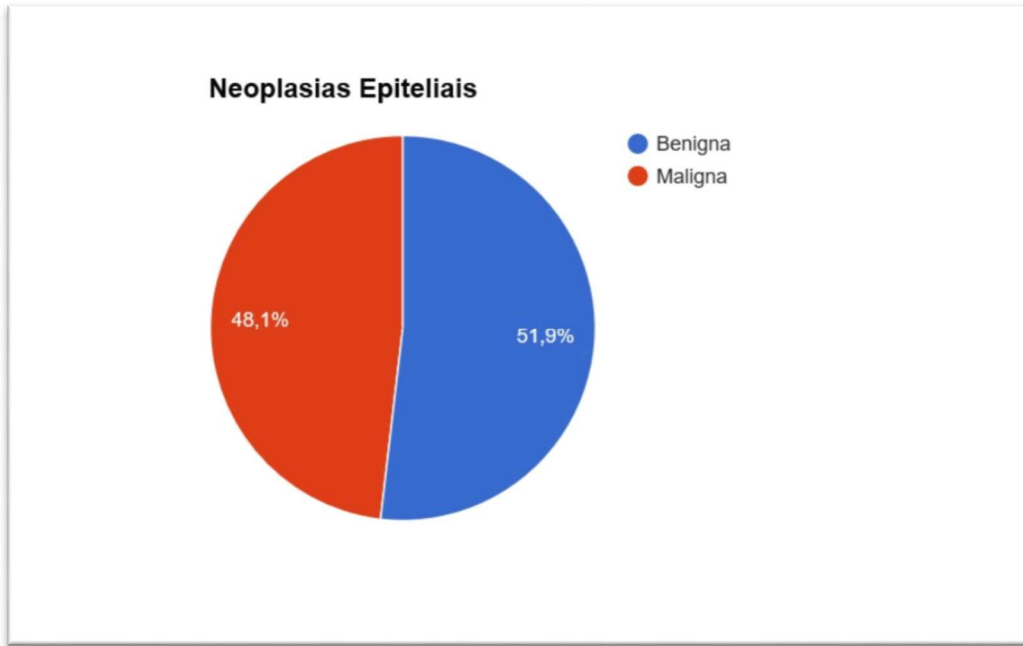


Gráfico 3 – Neoplasias epiteliais observadas nos casos citológicos observados num período de 9 semanas na Facoltà di Medicina Veterinaria da Università degli Studi di Milano.

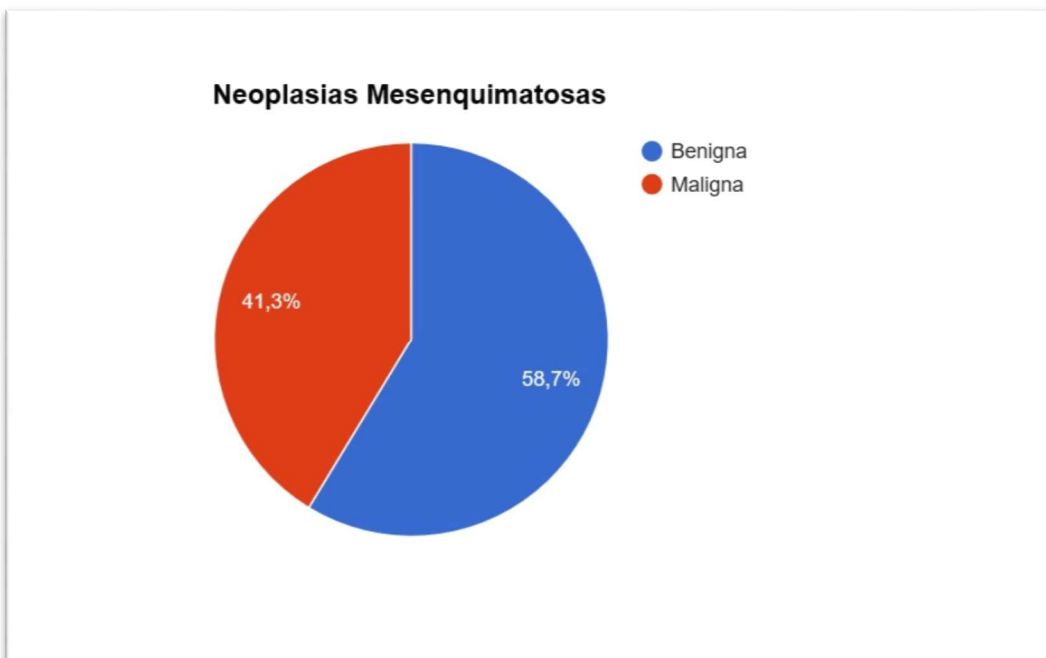


Gráfico 4 – Neoplasias mesenquimatosas observadas nos casos citológicos observados num período de 9 semanas na Facoltà di Medicina Veterinaria da Università degli Studi di Milano.

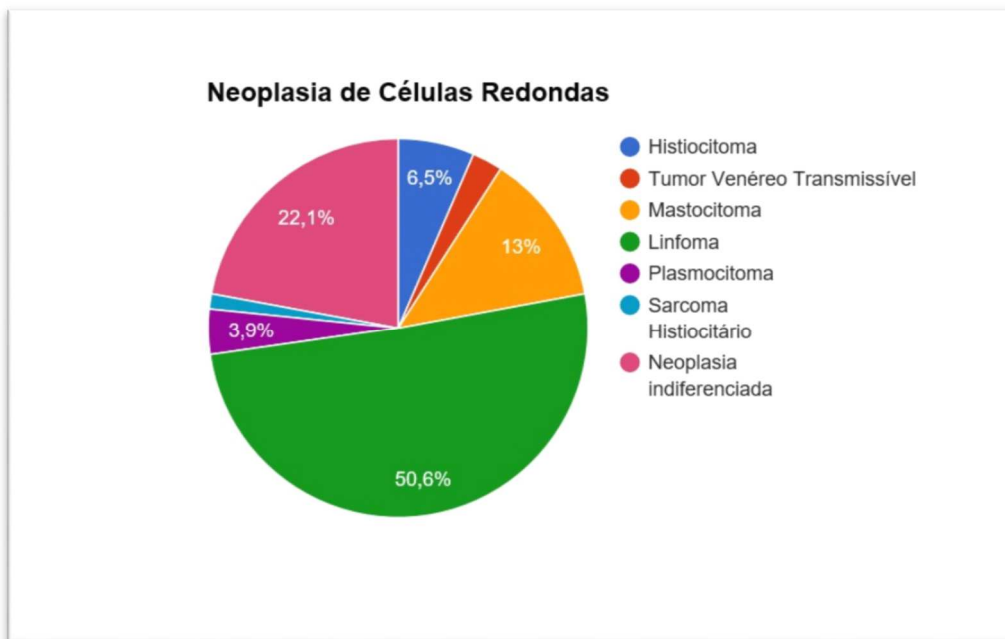


Gráfico 5 – Neoplasias de células redondas observadas nos casos citológicos observados num período de 9 semanas na Facoltà di Medicina Veterinaria da Università degli Studi di Milano.