

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO EM EFUSÕES DE CÃES E GATOS
Aproximando a clínica e o laboratório para um melhor diagnóstico

Carla Susana Reis Marrinhas

Orientador
Professor Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Coorientador
Professor Doutor Mario Caniatti

Porto 2015

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO EM EFUSÕES DE CÃES E GATOS
Aproximando a clínica e o laboratório para um melhor diagnóstico

Carla Susana Reis Marrinhas

Orientador
Professor Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Coorientador
Professor Doutor Mario Caniatti

Porto 2015

Resumo

A citologia é um exame complementar largamente usado na prática clínica, por ser simples, não invasivo, económico, rápido e de elevada repetibilidade. É por isso uma área muito atrativa para os clínicos veterinários, que mesmo com poucos recursos podemos estabelecer um diagnóstico e instituir um tratamento adequado em muitas situações. É isso que tem acontecido no meu exercício de clínica de animais de companhia e, portanto, a realização deste trabalho foi uma oportunidade de reforçar conhecimentos, adquirir experiência em avaliação citológica no geral e, em especial, no estudo de efusões cavitárias — onde este exame é insubstituível e essencial. A realização de um período de estágio na Faculdade de Medicina Veterinária de Milão teve um contributo essencial para a minha aprendizagem em citologia.

Assim, na primeira parte deste trabalho é feita uma revisão bibliográfica sobre efusões cavitárias em cães e gatos, tentando sempre que possível uma abordagem mais prática. Na segunda parte está incluído um primeiro estudo de uma técnica mais simples e económica para obtenção de citoblocos, em que as células de amostras líquidas são concentradas dentro de tubos de microhematócrito, e a partir de aí tratadas como se fossem amostras histológicas. Esta técnica, designada por citotubo, foi aqui aplicada em 18 efusões cavitárias de cães e gatos, procedendo-se depois ao estudo imunohistoquímico com um total de 14 marcadores. Os resultados obtidos são promissores e permitem antever que os citotubos poderão melhorar o diagnóstico de doenças oncológicas em animais de companhia. Esta técnica poderá ser uma valiosa ponte entre o veterinário clínico e o veterinário patologista.

Agradecimentos

À Professora Doutora Marta Santos pela amizade de sempre e a quem dedico este trabalho.

Aos meus orientadores Professor Doutor Ricardo Marcos e Professor Doutor Mario Caniatti por toda a disponibilidade e apoio.

Ao Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS a possibilidade de acompanhamento do processamento do citotubo, em especial à Mestre Fernanda Malhão.

À Professora Doutora Fátima Gartner e ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade do Porto pela colaboração para a realização das técnicas de imunohistoquímica.

À minha segunda casa, e aos meus colegas de trabalho do Hospital Veterinário do Baixo Vouga: à Sónia Miranda, Artur Alves, Hugo Vilhena, Pedro Moreira, Raquel Tomé, Mariana Gonçalves, Hélder Craveiro, Daniela Ribau, Luciana Silva, Pedro Esteves, Joana Oliveira, Daniela Almeida, Liliana Branco, Ângela Francisco, Sandra Beirão, Lyubov Bahriy, Kátia Machado e Graça Rodrigues.

Aos amigos, em especial à Sandra Couto porque sei que vai estar sempre presente.

Aos meus Pais a quem tudo devo...

Ao Duarte e ao Gabriel por serem a minha vida...

A todos os que me apoiaram neste percurso... MUITO OBRIGADA!

Lista de Abreviaturas

ADA	Adenosina deaminase
BPN	<i>Brain natriuretic peptide</i>
dl	Decilitro
DAB	3,3'-diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetracéptico
g	Gramma
°C	Graus centígrados
H&E	Hematoxilina-eosina
Hg	Mercúrio
HVBV	Hospital Veterinário do Baixo Vouga
LGL	<i>Large granular lymphoma</i>
µl	Microlitro
mg	Miligramma
mm	Milimetro
mmol	Milimol
nº	Número
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PIF	Peritonite infecciosa felina
pH	Potencial de hidrogénio
rpm	Rotações por minuto
TNCC	<i>Total nucleated cell count</i>

Índice Geral

Resumo	i
Agradecimentos.....	ii
Lista de abreviaturas.....	iii
Índice Geral	iv

Parte I: Efusões cavitárias em cães e gatos

I.1. Introdução.....	1
I.2. Revisão bibliográfica.....	2
I.2.1. Formação e patofisiologia.....	2
I.2.2. Colheita e processamento.....	3
I.2.3. Avaliação laboratorial (física, química e contagem celular).....	5
I.2.4. Avaliação citológica	6
I.2.5. Classificação e descrição dos tipos de efusões.....	8
I.3. Citoblocos: técnicas, vantagens e desvantagens.....	14

Parte II: A técnica do citotubo aplicada a efusões de cão e gato

II.1. Introdução.....	16
II.2. Material e métodos	17
II.3. Resultados.....	18
II.4. Discussão	23
II.5. Perspetivas futuras	26
Bibliografia.....	27
Anexos	31

Parte I. Efusões cavitárias em cães e gatos

I.1. Introdução

As efusões ou derrames cavitários constituem acumulações anormais de fluidos em cavidades corporais, tais como tórax, abdómen ou pericárdio, em resultado de alterações na produção e/ou remoção do fluido. A sua ocorrência é comum na prática clínica de pequenos animais. Por exemplo, no Hospital Veterinário do Baixo Vouga (HVBV) correspondem a 11% dos casos enviados para análise citológica. As efusões abdominais correspondem a 51% do total das efusões em cães e gatos, enquanto as pericárdicas correspondem apenas a 8% do total e são apenas amostras caninas. As citologias de efusões abdominais são as mais frequentes nos cães, encontrando-se em igual proporção efusões hemorrágicas ou transudados modificados. Já nos gatos são mais frequentes as efusões torácicas, correspondendo a 63% do total de efusões nesta espécie, sendo as neoplásicas as mais comuns.

As efusões são muitas vezes situações urgentes e o seu tratamento, incluindo a drenagem e estabilização do animal são prioritárias relativamente à obtenção de amostras para estudo. Por consequência, pode perder-se a oportunidade de chegar a um diagnóstico rápido, uma vez que as células em suspensão nos líquidos facilmente podem sofrer processos degenerativos. Assim, os clínicos são um elemento chave na cadeia de diagnóstico.

A classificação clássica em transudado, transudado modificado e exsudado tem por base o aspeto macroscópico, o conteúdo proteico, a contagem celular e a avaliação do tipo e morfologia das células (Dempsey & Ewing 2011). Este último parâmetro pode ser considerado o elemento mais importante, porque fornece muitas vezes informação essencial para caracterizar a etiologia da efusão. Um estudo com mais de 400 efusões encontrou uma sensibilidade de 61% a 64% em cães e gatos, respetivamente, e uma elevada especificidade (99% a 100%) para a deteção de neoplasias em efusões abdominais e pleurais (Hirschberger *et al.* 1999). Contudo, pode representar um verdadeiro desafio, na medida em que o meio líquido altera as características morfológicas das células, aumentando o volume, deformando os limites celulares e os núcleos e mimetizando sinais de malignidade (Meinkoth & Allison 2007). Além disso, as células mesoteliais que revestem as cavidades corporais são pleomórficas e, em situações de inflamação ou de neoplasias metastáticas, podem exibir sinais de atipia, sendo difícil de distinguir as células mesoteliais reativas de verdadeiras células neoplásicas de mesotelioma ou carcinoma (Fetsch & Abati 2001, Zimmerman 2005, Wallace *et al.* 2015). Isto é particularmente relevante em Medicina Veterinária, uma vez que as células mesoteliais de pequenos animais parecem ser mais reativas do que as humanas (Hirschberger *et al.* 1999). Assim, a avaliação da morfologia das células

requer grande experiência do observador. A possibilidade de envio para laboratórios externos, e a realização de técnicas de diagnóstico adicionais podem ser ferramentas extremamente úteis em citologia veterinária, tal como acontece na Medicina Humana (Nathan *et al.* 2000, Fetsch & Abati 2001, Herbert 2014, Jain *et al.* 2014, Wallace *et al.* 2015). Os esfregaços de *cytospin* (Andreasen 2003) ou os citoblocos são exemplos dessas técnicas, que permitem realizar técnicas morfológicas adicionais, como colorações especiais. No primeiro caso são usadas citocentrífugas que concentram as células em lâminas, ao passo que no segundo caso são geralmente necessários equipamentos especiais, o que poderá limitar o seu uso na prática clínica veterinária.

Na nossa perspectiva, a técnica designada por citotubo, é uma forma de obter citoblocos que poderá ultrapassar algumas das limitações da utilização da histopatologia para o diagnóstico de efusões na prática clínica veterinária. Esta técnica é económica, de fácil execução e utiliza material disponível nas clínicas como tubos de hematócrito e respetiva centrífuga (Marcos 2013). As células são concentradas e conservadas em formol permitindo o seu posterior envio para laboratórios onde serão depois tratadas como amostras histopatológicas (Marcos 2013). A nossa hipótese é que os citotubos, à semelhança de outros tipos de citoblocos, possam acrescentar informação histológica à avaliação citológica, e permitir a realização de técnicas imunohistoquímicas, com vários marcadores, aumentando assim as possibilidades de obtenção de um diagnóstico.

I.2. Revisão bibliográfica

I.2.1 Formação e patofisiologia

As efusões ou derrames cavitários referem-se à acumulação anormal de fluidos numa cavidade corporal. Em situações normais, está presente apenas uma pequena quantidade de fluido nessas cavidades, para lubrificação das superfícies dos órgãos. Este líquido tem baixa concentração de proteínas e células, resultante da transudação normal em capilares para as cavidades e que é depois reabsorvido por vénulas e vasos linfáticos (Raffe & Roberts 2005, Dempsey & Ewing 2011). A taxa de formação do líquido depende das diferenças de pressão oncótica e hidrostática entre os vasos e as cavidades (forças de Starling), da permeabilidade das células endoteliais e das próprias células mesoteliais (que revestem as cavidades), assim como da integridade da drenagem linfática (Raffe & Roberts 2005, Dempsey & Ewing 2011). A acumulação de líquido ocorre quando a taxa de filtração é maior do que a de reabsorção.

As células mesoteliais revestem as cavidades corporais e é interessante notar que estas células, apesar de epiteliais, também expressam moléculas habitualmente associadas ao tecido conjuntivo (marcadores mesenquimatosos) (Dempsey & Ewing 2011). As células mesoteliais têm muitas

outras funções, como produção de enzimas, transporte transcelular, resposta à estimulação hormonal e a citocinas e produção de ácido hialurónico assim como fosfolípidos, que contribuem para diminuir a fricção entre órgãos. Em termos morfológicas, as células mesoteliais apresentam microvilosidades que aumentam a sua área de superfície e as junções entre elas (*tight junctions*) que contribuem para que a permeabilidade do mesotélio seja semelhante à do endotélio vascular (Dempsey & Ewing 2011).

I.2.2. Colheita e processamento

Relativamente à colheita dos líquidos de efusão, é importante que esteja previamente estabelecido um protocolo, não só de colheita como também de processamento das amostras obtidas (Figura I, Anexos), poupando tempo e maximizando a informação que se pode obter.

A preparação dos locais para punção é asséptica, como para qualquer procedimento cirúrgico. Na abdominocentese, o animal pode ser colocado em decúbito lateral direito ou em estação; a agulha (18-20G) acoplada a válvula de 3 vias e seringa (com extensor se necessário) é inserida 1 a 2 cm caudal ao umbigo, ao nível da linha branca e de forma perpendicular à pele. As complicações deste procedimento são raras e incluem peritonite ou hemoperitoneu, em consequência da laceração de órgãos. Já as contraindicações incluem coagulopatias severas, trombocitopenia, organomegalia ou cirurgia abdominal prévia, em que possam ter ocorrido aderências de intestino à parede. A punção ecoguiada pode ser necessária quando existem baixas quantidades de líquido (Crow & Walshaw 1997, Murphy & Warman 2007). Já na toracocentese, o decúbito esternal é normalmente a posição mais confortável para o animal dispneico e a punção é determinada pela localização radiográfica do líquido. Em efusões generalizadas, a agulha (19-23G) é inserida no 7º ou 8º espaço intercostal, ao nível da junção costochondral, evitando as veias caudais a cada costela (Crow & Walshaw 1997, Waddell & King 2007). Após drenagem, é conveniente realizar novas projeções radiográficas, que muitas vezes revelam a causa da efusão. No geral as complicações são pouco frequentes, mas incluem o pneumotórax, o piotórax iatrogénico, as hemorragias secundárias a laceração pulmonar ou as arritmias por laceração miocárdica. Em coagulopatias severas este procedimento pode estar contraindicado. Já no caso da pericardiocentese, é recomendado sedar o animal e/ou proceder à anestesia local e este é um procedimento de urgência quando ocorre tamponamento cardíaco. O animal é colocado em decúbito lateral esquerdo (o que minimiza o risco de trauma pulmonar e dos principais vasos coronários) ou esternal e monitorizado com eletrocardiograma para detetar eventuais arritmias ventriculares, que surgem quando a agulha contacta com o miocárdio. Habitualmente prepara-se uma ampla área desde o 3º ao 7º espaço intercostal e do esterno à junção costochondral. É recomendada a punção

ecoguiada (com agulha de 14-16G em cães grandes e 19-21G em cães pequenos e gatos) entre o 4º e 6º espaço intercostal, ao nível da junção costochondral. Além das arritmias, pneumotórax e hemorragia, já foi descrita a disseminação de processos infecciosos e neoplásicos com a pericardiocentese (Crow & Walshaw 1997, Stepien & Boswood 2007).

Em qualquer dos procedimentos atrás descritos, e imediatamente a seguir à colheita, deverão ser realizados 2 esfregaços diretos para contagem e avaliação celular, sendo uma parte do líquido conservada em tubo com anticoagulante (ácido etilendiaminotetracético, EDTA) e refrigerado, ao passo que outra parte é recolhida para tubo seco para avaliação bioquímica. O restante material é mantido na seringa ou armazenado em tubo estéril, podendo depois realizar-se cultura microbiológica (para aeróbios e anaeróbios). O EDTA previne a formação de coágulos que interferem na contagem e avaliação celular e inibe a atividade fagocítica, permitindo uma preservação celular (Marcos & Santos 2011). No geral, é aceite que as amostras devem ser processadas e avaliadas o mais rapidamente possível e que depois de 48 horas de armazenamento podem ocorrer alterações significativas, quer em número de células, quer em termos morfológicos, que podem mesmo influenciar a classificação da efusão (Maher *et al.* 2010, Marcos & Santos 2011, Antonangelo *et al.* 2012). Já no que respeita às culturas microbiológicas, importa referir que, por vezes, apenas uma administração de antibiótico sistémico pode ser suficiente para não permitir crescimento bacteriano. As culturas de anaeróbios não devem ser refrigeradas e também devem ser processadas em 24 horas após a colheita (Dempsey & Ewing 2011). O uso de meios moleculares seria o ideal para diagnóstico de algumas situações como peritonite infecciosa felina (PIF), infeções por *Bartonella* (Dempsey & Ewing 2011), mas por motivos económicos esta ainda não é uma prática comum.

No caso de efusões sanguinolentas é importante realizar rapidamente um microhematócrito da efusão e comparar com o hematócrito sanguíneo, para distinguir uma hemorragia iatrogénica de uma efusão hemorrágica. Estas últimas têm geralmente microhematócritos superiores a 10%. É importante referir que a identificação de todas as amostras de efusões, com o nome do animal e a origem da amostra é fundamental e, por vezes, é um ponto crítico em termos práticos.

Em Medicina Veterinária, ao contrário da prática em Medicina Humana, é raro proceder a lavagens peritoneais e pleurais em animais sem efusão, mas com diagnóstico prévio de neoplasia (por exemplo, carcinomas do estômago e pulmão). Nestas situações, introduz-se soro fisiológico na cavidade corporal que depois é removido para análise. Tendo em conta que o procedimento produz alterações celulares, os critérios de avaliação são ligeiramente diferentes (Shidham & Epple 2007). Estes estão claramente definidos em Medicina Humana, mas não em Medicina Veterinária.

I.2.3. Avaliação laboratorial (física, química e contagem celular)

A avaliação física do líquido compreende a determinação do volume, cor, odor, transparência, viscosidade e coagulação, sendo realizada no momento da colheita. Esta pode fornecer indicações acerca da natureza da efusão e sugerir a realização de testes adicionais mais específicos.

Efusões vermelhas (Fig. 1) podem ser devidas a sangue de hemorragia, de contaminação iatrogênica ou de efusões neoplásicas, e é de extrema importância comparar o microhematócrito do líquido com o do sangue periférico. Já efusões opacas, brancas a amarelas e até esverdeadas, com odor intenso, são muito sugestivas de exsudados infecciosos sépticos. Líquidos abdominais de cor amarela esverdeada a acastanhada podem ocorrer em rotura da vesícula biliar, ao passo que líquidos brancos opacos, mesmo depois de centrifugação (portanto, com aspeto leitoso) são mais sugestivos de efusões quilosas ou pseudoquilosas. Líquidos pleurais ou abdominais “amarelo-palha”, viscosos e por vezes com coágulos, colhidos em gatos, são sugestivos de PIF. Em casos de rotura de bexiga o líquido pode ter um odor a urina.

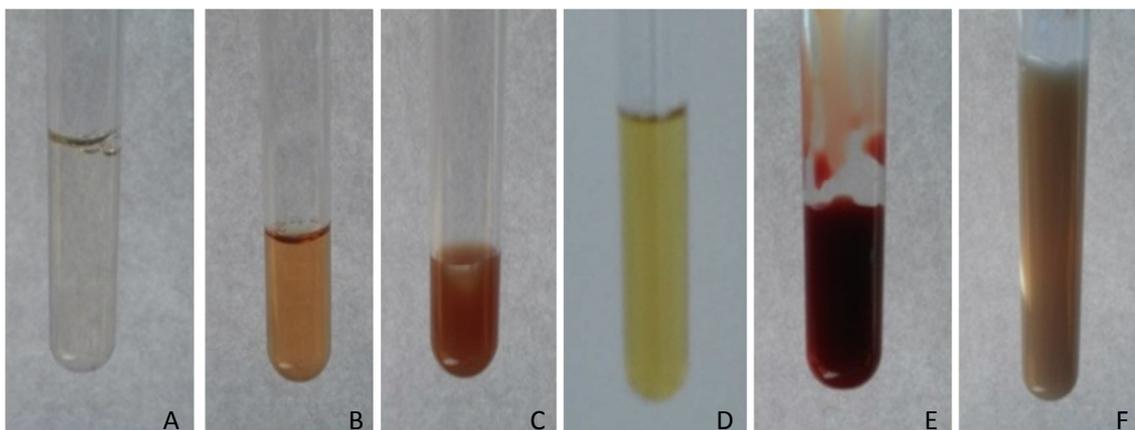


Figura 1 – Diferentes aspetos macroscópicos de efusões em cães e gatos. A: transudado; B: transudado modificado; C: exsudado; D: PIF; E: efusão hemorrágica; F: efusão quilosa.

A avaliação bioquímica da efusão consiste primariamente na quantificação de proteínas que, juntamente com a quantificação de células nucleadas, é usada para a classificação do tipo de efusão, e para a elaboração de uma lista de diagnósticos diferenciais. A concentração proteica de um fluido cavitário normal é inferior a 2,5 g/dl (Alleman 2003). Esta quantificação pode ser feita com máquina de análises bioquímicas ou com o refratômetro manual, como se usa para o plasma. Pode usar-se diretamente o líquido ou o sobrenadante, quando os líquidos são opacos, turvos ou sanguinolentos. Existem diversos estudos acerca da validade de um ou outro método mas, na prática, não existem diferenças significativas porque este não é o único critério de classificação (Rebar & Thompson 2010). A análise deve ser feita da amostra recolhida de tubo seco, porque

alguns tubos com EDTA têm aditivos que aumentam os valores de proteínas (Dempsey & Ewing 2011).

Estão descritas provas bioquímicas adicionais em casos específicos de efusões (Quadro I, Anexos) de acordo com o aspeto do líquido, a suspeita e história clínica. A determinação da glicose em suspeita de efusões sépticas, e do pH em efusões pericárdicas, deve ser feita imediatamente a seguir à colheita, pois o armazenamento altera os resultados (Antonangelo *et al.* 2010, Rebar & Thompson 2010). Em Medicina Humana são usados muitos outros marcadores em efusões, nomeadamente a adenosina deaminase (ADA) e o interferão- γ em suspeitas de tuberculose, e o péptido natriurético cerebral (*brain natriuretic peptide*, BPN) em efusões associadas a insuficiência cardíaca (McGrath *et al.* 2010).

A contagem celular, também designada contagem total de células nucleadas (TNCC, *total nucleated cell count*) pode ser feita manualmente ou de forma automática, usando amostras conservadas em EDTA. O armazenamento prolongado, além das 48 horas, diminui a contagem celular (Maher *et al.* 2010, Marcos & Santos 2011, Antonangelo *et al.* 2012). Tradicionalmente, a contagem é feita manualmente, com a câmara de Neubauer, mas a celularidade também pode ser estimada em esfregaços diretos (Alleman 2003, Santos & Marcos 2011) na zona de monocamada. Neste caso considera-se:

$$TNCC \text{ (células}/\mu\text{l)} = (n^{\circ} \text{ médio de células nucleadas contadas por campo}) \times (\text{ampliação da objetiva})^2$$

Com contadores automáticos (máquinas de hemograma), rapidamente se contabiliza um elevado número de células, com um elevado grau de fiabilidade, podendo até conseguir-se alguma informação acerca dos tipos de células presentes. Ainda assim, a presença de agregados celulares ou de material amorfo em suspensão, pode interferir com a contagem nestes contadores automáticos, nomeadamente em efusões por PIF (Cunha *et al.* 2009, Gorman *et al.* 2009). Convém acrescentar que esta não é usada na rotina clínica da veterinária, pois implica um custo adicional que muitas vezes não se justifica, uma vez que não substitui a avaliação citológica e uma estimativa aproximada pode ser suficiente. Independentemente do método, a TNCC de líquidos cavitários normais em cães e gatos é inferior a 3000 células/ μl (Alleman 2003).

I.2.4. Avaliação citológica

A observação microscópica do esfregaço avalia o tipo e a morfologia das células presentes e é muitas vezes o critério mais importante na procura da etiologia das efusões, nomeadamente quando se suspeita de infeções bacterianas ou de processos neoplásicos. Os esfregaços podem ser realizados pela técnica usada para o sangue ou podem realizar-se “esfregaços em linha”, em

que se interrompe o movimento de arrasto, de modo a formar uma linha em que se concentram as células (Meyer *et al.* 2010, Marcos & Santos 2011). Em amostras com baixas contagens celulares, podem ser usadas outras técnicas além do esfregaço direto, nomeadamente uma centrifugação, durante 5 minutos entre 1000 a 1500 rpm para a maioria das centrífugas (Alleman 2003, Marcos & Santos 2011). Uma outra hipótese, em que se obtêm muito bons resultados, consiste na utilização das citocentrífugas. Os esfregaços são diretamente realizados pelas citocentrífugas, sendo circulares e em monocamada (Andreasen 2003, Shidham & Epple 2007, Marcos & Santos 2011). No entanto, este tipo de centrífugas não faz parte do equipamento de laboratório da maioria das clínicas ou hospitais veterinários. Já uma última alternativa consiste na centrifugação da amostra em tubos capilares, numa centrífuga de microhematócrito (portanto, durante 5 minutos a 12000 rpm), realizando depois esfregaços a partir do *buffy-coat* do líquido. Isto permite uma boa preservação celular, sendo especialmente útil em efusões hemorrágicas, uma vez que separa a porção hemática das restantes (Meyer *et al.* 2010, Marcos & Santos 2011). A citologia em meio líquido (*ThinPrep*®) é uma técnica usada diariamente em Medicina Humana, em que se recorre a um líquido conservante que permite aumentar o tempo de armazenamento. Com esta técnica consegue-se uma boa preservação da morfologia celular, embora com algumas diferenças em relação a outros esfregaços. Contudo, é um procedimento mais dispendioso e, talvez por isso, é usado muito raramente em Medicina Veterinária (Shidham & Epple 2007, Fernandes *et al.* 2015). Após secagem, as lâminas podem ser coradas com colorações de tipo Romanowsky, como o May-Grünwald-Giemsa, Giemsa ou o Diff-Quik, vulgarmente usado na prática clínica veterinária (Marcos & Santos 2011). As células consideradas normais em citologia de efusões incluem macrófagos, linfócitos, ocasionais neutrófilos não degenerados e as células mesoteliais. Estas surgem frequentemente com características de reatividade, com tamanho variável (12-30 µm, o que equivale a 2 a 5 eritrócitos), basofilia citoplasmática, bordo frisado eosinófilo (coroa rosada), um ou mais núcleos de tamanho semelhante, frequentemente com nucléolos visíveis e ocasionais figuras de mitose (Fig. 2A). Podem apresentar-se isoladas ou em grupos coesos, tipicamente com fendas entre elas, vulgarmente designadas por “janelas” (Fig. 2B) (Zimmerman 2005, Rebar & Thompson 2010, Santos & Marcos 2011). A variação celular pode ser tão exuberante que pode não ser possível distinguir entre hiperplasia mesotelial e neoplasia (Fetsch & Abati 2001, Zimmerman 2005, Wallace *et al.* 2015). Podem ter vacuolização citoplasmática e serem confundidas com macrófagos ou, quando em grandes grupos por vezes tridimensionais, podem ser erradamente interpretadas como metástases de neoplasias epiteliais (Hirschberger *et al.* 1999). No caso de amostras de lavagens peritoneais, as células mesoteliais surgem frequentemente em agregados papilares com núcleos aumentados, pelo uso de soluções salinas

(Zimmerman 2005, Shidham & Epple 2007). Já os outros tipos celulares encontrados em citologias de efusões têm características semelhantes aos de outras amostras, embora os núcleos possam aparecer com aspeto mais túrgido por se encontrarem em meio líquido (Meinkoth & Allison 2007).

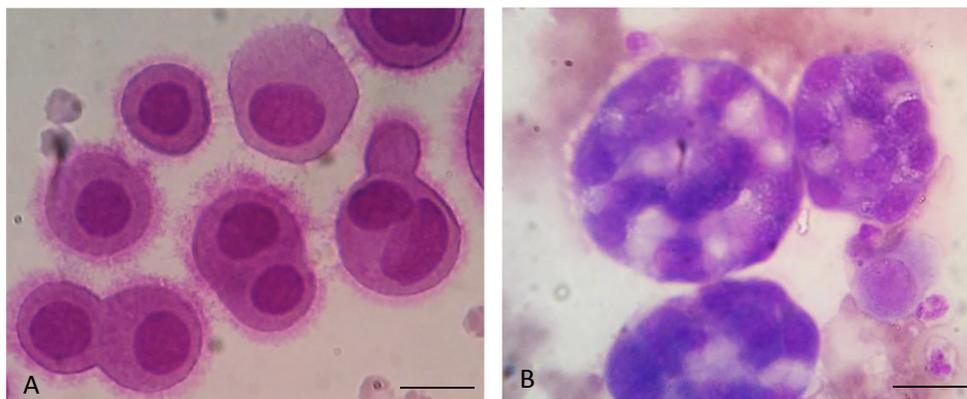


Figura 2 – A: Células mesotélias reativas isoladas com o bordo frisado característico e com frequente binucleação; B: Células mesoteliais reativas em grupos, observando-se as típicas fendas (áreas mais claras) entre as células; Diff-Quik, barra = 20 μ m (A), 35 μ m (B).

Em algumas situações podem ser usadas técnicas adicionais para diagnóstico, nomeadamente a imunocitoquímica. No entanto, esta tem algumas limitações práticas em efusões por habitualmente terem marcação inespecífica de fundo, devido ao material proteináceo e/ou conteúdo hemático associado aos líquidos. Além disso, pelo número reduzido de esfregaços disponíveis, pode ser mais difícil utilizar uma maior diversidade de marcadores (Fetsch & Abati 2001, Fetsch *et al.* 2002, Shi *et al.* 2011). Os citoblocos (abordados mais à frente) podem ser um importante complemento no processo diagnóstico (Nathan *et al.* 2000, Herbert 2014, Jain *et al.* 2014, Wallace *et al.* 2015).

1.2.5. Classificação e descrição dos tipos de efusões

A classificação das efusões tem como principal objetivo fornecer ao clínico uma lista de diagnósticos diferenciais, de acordo com a sintomatologia e história do animal, possibilitando a tomada de decisões, quer terapêuticas, quer em termos de exames complementares. A classificação tradicional, atendendo ao teor proteico, TNCC e tipo celular, permite agrupar as efusões em 3 categorias gerais (Quadro 1) que estão relacionadas com a sua etiologia.

Os transudados resultam de alterações da dinâmica do fluido cavitário, como o aumento da pressão vascular hidrostática ou a diminuição da pressão oncótica, não havendo alterações em termos de celularidade (comparando com um líquido normal). São geralmente líquidos transparentes, incolores, com baixa concentração proteica e celularidade. As células são mononucleares, nomeadamente mesoteliais, macrófagos e pequenos linfócitos, com muito

ocasionais neutrófilos não degenerados. A causa mais comum em animais é a hipoalbuminemia (Dempsey & Ewing 2011) mas outras causas também estão na lista de diferenciais, como a hipertensão portal, a insuficiência hepática, o *shunt* porto-sistêmico e a insuficiência cardíaca em fase inicial (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011, Santos & Marcos 2011).

Características	Tipo de efusão		
	Transudado	Transudado modificado	Exsudado
Aspetto	Incolor, transparente	Amarelo claro a alaranjado, transparente a opaco	Amarelo a alaranjado, opaco
Proteínas totais g/dl	< 2,5	≥ 2,5	> 3
TNCC/ μ l	< 1000	> 1000	> 5000
Tipos celulares predominantes	Mononucleares	Mononucleares	Neutrófilos

Quadro 1 – Classificação das efusões (adaptado de Rebar & Thompson 2010).

Os transudados modificados têm maior teor proteico e celular do que um transudado puro, e ocorrem por aumento da pressão hidrostática capilar. Esta situação causa uma reação por parte das células mesoteliais, que aumentam em número (hiperplasia), passando a apresentar características de reatividade, como o aumento da basofilia citoplasmática, do número de núcleos, ou a presença de nucléolos visíveis e mitoses. Com a morte destas células, libertam-se agentes quimiotáticos para macrófagos que são responsáveis pela fagocitose de detritos celulares. Por isso, com o tempo vai aumentando a proporção de células inflamatórias, até mesmo neutrófilos, e pode ser difícil distinguir transudados modificados crônicos de exsudados. Os primeiros tendem a ser líquidos opacos, com alto teor de lípidos e colesterol. Tal ocorre porque a maioria dos componentes celulares é removida por fagocitose, mas o conteúdo lipídico persiste e acumula-se na efusão. As causas deste tipo de efusões incluem a insuficiência cardíaca, a cardiomiopatia, compressão de vasos por neoplasias, alterações vasculares como a trombose pulmonar, assim como a inflamação ou a torção de órgãos (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011, Santos & Marcos 2011).

Os exsudados têm elevado conteúdo proteico e celular, resultante da alteração da permeabilidade mesotelial e/ou endotelial, em resposta a um estímulo inflamatório. Este estímulo pode ser exógeno, associado a vírus, bactérias ou fungos, ou pode ser endógeno, como urina, enzimas pancreáticas, sais biliares ou células neoplásicas. As células mesoteliais tornam-se reativas, com as características referidas anteriormente e, pelas mesmas razões, a celularidade do infiltrado inflamatório aumenta de forma significativa com o tempo. A própria celularidade e acumulação de

fibrina provocam uma diminuição na drenagem linfática, aumentando ainda mais a acumulação do fluido. A avaliação citológica destas efusões é muito relevante: se existirem neutrófilos degenerados (em cariólise e cariorréxis) é importante procurar bactérias intracelulares e realizar testes bioquímicos adicionais (Quadro I, Anexos), nomeadamente avaliar a glicose e o lactato, assim como enviar o líquido para cultura microbiológica.

Os exsudados sépticos ocorrem em feridas penetrantes, rotura de órgão gastrointestinal ou urogenital com infeção, translocação bacteriana de doença pulmonar ou mesmo por disseminação hemática de um foco infeccioso distante. Em gatos machos não esterilizados, são comuns as feridas por mordeduras causadas por bactérias filamentosas do género *Nocardia* e *Actinomyces*, bactérias que são anaeróbias e que, portanto, causam menos sinais degenerativos nos neutrófilos. Nestes exsudados podem-se observar macroscopicamente os chamados grânulos de enxofre, que correspondem a colónias destas bactérias (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011, Santos & Marcos 2011). Em infeções fúngicas o infiltrado inflamatório pode ser misto ou granulomatoso. Os exsudados não sépticos podem ser infecciosos, como em infeções por PIF ou micoplasmas ou não infecciosos, como ocorre na rotura de bexiga, vesícula biliar, na pancreatite ou na necrose tecidual. Nestes casos, a história clínica e exames adicionais são fundamentais para um diagnóstico definitivo (Quadro I, Anexos).

É importante referir que nem sempre é possível classificar as efusões de acordo com os critérios tradicionais, e deve ter-se presente que estes processos não são estáticos no tempo. Dependendo da fase em que se observa o líquido pode encontrar-se um transudado, transudado modificado ou um exsudado para uma mesma situação. O uso de determinados fármacos também pode alterar as características iniciais das efusões, como é o caso de diuréticos em insuficiência cardíaca que tendem a produzir efusões com características de exsudados, pelo aumento de teor proteico (McGrath *et al.* 2010).

Para além destes três tipos de efusões, existem outros que pela sua frequência ou pela importância clínica importa destacar. Uma delas são as efusões associadas à forma exsudativa de PIF. Estas são efusões que são caracterizadas como viscosas, de cor amarelo-palha e com coágulos. Embora muito sugestivos, estes achados não são exclusivos e podem ocorrer noutros tipos de efusões. As efusões de PIF têm elevado conteúdo proteico, superior a 4,5 g/dl (maioritariamente imunoglobulinas, uma vez que a relação albumina: globulina é inferior a 0,8) e elevada celularidade (1000 a 3000 células/ μ l). Em termos microscópicos, caracteriza-se por um infiltrado de neutrófilos não degenerados, macrófagos, e ocasionalmente pequenos linfócitos e plasmócitos. O mais característico destas efusões é o fundo eosinofílico granular, que corresponde a imunoglobulinas. O diagnóstico definitivo é difícil mas o uso da efusão é preferível a outras

amostras para a realização de serologia ou do PCR (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011, Santos & Marcos 2011).

A pancreatite é uma situação frequente e em alguns casos está associada a efusão exsudativa estéril, que também pode ter baixas concentrações de glicose, o que em certas situações poderá ser difícil de distinguir de peritonite séptica. A imagem ecográfica é fundamental e a comparação entre os níveis de lipase e amilase sérica e do fluido podem ser importantes para o diagnóstico (Quadro I, Anexos). As efusões associadas à pancreatite podem-se tornar sépticas em casos de abscessos pancreáticos ou por translocação bacteriana (Dempsey & Ewing 2011).

As efusões biliares não são frequentes, mas podem ocorrer secundariamente a trauma (iatrogénico por exemplo) ou a obstrução da vesícula biliar, colangite ou podem ocorrer espontaneamente. Inicialmente pode haver pouco líquido, cujas características se enquadram num transudado modificado, mas como a bÍlis é muito irritante para os tecidos, evolui para exsudado que pode mesmo tornar-se séptico. Podem ser efusões amarelo-esverdeadas ou acastanhadas em que predominam neutrófilos ligeiramente degenerados, macrófagos, muitas vezes com pigmento biliar, esverdeado a preto acastanhado ou dourado, fagocitado ou extracelular, e células mesoteliais reativas. O pigmento pode ser difícil de distinguir de cristais de hematóidina (dourados) ou grânulos de hemossiderina (azul-esverdeados), que são produtos da degradação de eritrócitos. Pode ainda existir material amorfo, granular e basófilo de fundo. A comparação dos níveis de bilirrubina séricos com os do fluido pode ser diagnóstica, inclusivé em lavagens peritoneais nas fases iniciais com pouco líquido, mas em que se suspeita de rotura de vesícula biliar (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011).

O uroabdomen é uma peritonite química (à semelhança das efusões biliares) que resulta de rotura do trato urinário por trauma ou obstrução. Macroscopicamente são efusões claras, transparentes e que podem ter odor urinoso. A concentração proteica e celular é baixa, o que justifica que sejam classificados inicialmente como transudados modificados, mas que evoluem geralmente para exsudados neutrófilicos. Os neutrófilos podem ter alterações nucleares (bordos rasgados) pela irritação da urina. Podem ser sépticos no caso de existir infeção urinária prévia e podem ser detetados cristais urinários na citologia. Níveis de creatinina e potássio superiores no líquido aos do sangue também sustentam o diagnóstico (Rebar & Thompson 2010, Santos & Marcos 2011).

As efusões quilosas podem ser classificadas entre transudados modificados a exsudados pelo teor proteico e celular, mas o que as distingue é o facto de terem um aspeto leitoso, branco opaco que persiste mesmo após centrifugação com níveis de triglicéridos superiores a 100 mg/dl. Ocorrem com mais frequência no tórax, e são geralmente secundárias a doença cardíaca, dirofilariose, torção de lóbulo pulmonar, trauma (rotura do ducto torácico), compressão de massa (associadas a

neoplasias como linfoma, timoma ou granulomas) ou pode mesmo ser idiopático. Inicialmente a celularidade destas efusões é constituída por pequenos linfócitos, mas com o tempo podem apresentar células mesoteliais reativas, macrófagos com pequenos vacúolos com lípidos, neutrófilos e até eosinófilos. Podem ser observadas pequenas gotículas lipídicas não coradas no pano de fundo. Já as efusões pseudoquilosas têm um aspeto macroscópico semelhante às efusões quilosas, mas não persiste após centrifugação. Adicionalmente, o teor de colesterol é elevado, mas não há aumento dos triglicéridos. A explicação para a sua ocorrência foi referida anteriormente e está relacionada com a cronicidade das efusões: ao contrário de outros componentes celulares (fagocitados) o colesterol não é eliminado e acumula-se. Os macrófagos e as células mesoteliais podem ter também vacúolos lipídicos (e quando em grandes grupos podem lembrar células secretoras) e podem ser detetados cristais de colesterol, que são estruturas retangulares não coradas (Rebar & Thompson 2010, Santos & Marcos 2011).

As efusões hemorrágicas são comuns na prática clínica veterinária. É importante fazer um microhematócrito destes líquidos e comparar com o de sangue, para distinguir a efusão de contaminação iatrogénica. Tipicamente, são líquidos vermelhos a acastanhados, com cor uniforme durante todo o processo de recolha, não coagulam e apresentam hematócritos superiores a 10%. A citologia é de extrema importância para o diagnóstico, já que as efusões hemorrágicas têm predominantemente eritrócitos e células nucleadas em menor número, não têm plaquetas e têm macrófagos com fagocitose de eritrócitos ou de hemossiderina (nas hemorragias com mais de 2 dias). Podem existir líquidos com características semelhantes mas com contagens de leucócitos muito superiores aos sanguíneos e que podem devem ser considerados exsudados com hemorragia associada ou no caso da observação de células neoplásicas, serem classificados como efusões neoplásicas com hemorragia. As principais causas de efusões hemorrágicas incluem o trauma e torção de órgãos (como baço, fígado), neoplasias (hemangiossarcomas atriais e esplénicos, carcinomas, mesoteliomas), dirofilariose e coagulopatia (por exemplo por intoxicação por raticidas). É importante recorrer à ecografia para deteção de massas e/ou realizar provas de coagulação. Na maioria das vezes as efusões pericárdicas do cão são hemorrágicas e têm a particularidade de ter maior celularidade, com macrófagos, neutrófilos e células mesoteliais reativas geralmente com muitas características de atipia, semelhantes a células neoplásicas (Alleman 2003). A citologia nestes casos é particularmente difícil até porque hemorragias idiopáticas benignas e neoplasias ocorrem com igual frequência. O uso de tiras de urina para determinação do pH pode ser útil em situações de urgência (pH < 7 encontra-se associado a situações benignas), ao passo que os níveis de troponina cardíaca I podem ser indicadores de hemangiossarcoma (Alleman 2003, Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011).

Quando se detetam células neoplásicas, o líquido é classificado como efusão neoplásica, um tipo específico de exsudado por ter elevada celularidade e proteínas. Mas na grande maioria das vezes as efusões secundárias a neoplasias ou são hemorrágicas ou transudados modificados, não se detetando células neoplásicas. Ou então, pode persistir a dúvida na atribuição da classificação porque citologicamente é difícil distinguir células mesoteliais reativas de células neoplásicas (Hirschberger *et al.* 1999). A história e os dados do animal podem ajudar, mas muitas vezes só com outras técnicas (como colorações especiais e imunomarcadores) é que se pode ter uma classificação. Os carcinomas primários ou metastáticos são as neoplasias mais comuns em efusões peritoneais e pleurais de cães e em efusões peritoneais de gatos, ao passo que os linfomas são as efusões neoplásicas mais comuns em efusões pleurais de gatos. Outros tumores que podem estar associados a efusões são os mastocitomas, histiocitose maligna e mesoteliomas, no entanto estes são menos frequentes (Rebar & Thompson 2010, Santos & Marcos 2011).

As efusões carcinomatosas são geralmente constituídas por grandes agregados celulares, por vezes em arranjos papilares tridimensionais ou em formações acinares. As células têm bordos citoplasmáticos distintos, são redondas a poliédricas, com basofilia citoplasmática. No caso dos adenocarcinomas podem observar-se vacúolos secretores. Para suportar o diagnóstico destas efusões têm de estar presentes mais de quatro critérios de malignidade entre os seguintes: pleomorfismo, múltiplos núcleos, macrocariose, anisocariose, nucléolos grandes, angulares e múltiplos, padrões de cromatina anormais, mitoses atípicas. Habitualmente, considera-se que grupos volumosos, com mais de 100 células, são muito sugestivos de efusão carcinomatosa (Santos & Marcos 2011). Nas fêmeas, as efusões pleurais carcinomatosas mais frequentes são metástases de carcinomas mamários, ao passo que nos machos, são as metástases de carcinomas prostáticos e carcinomas de células de transição. Outras neoplasias podem estar envolvidas, tais como os adenocarcinomas pulmonares (tumores primários do pulmão) e carcinomas da tiroide. Já no caso das efusões peritoneais, estas podem estar associadas a adenocarcinomas ováricos e carcinomas mamários em fêmeas, carcinomas prostáticos em machos, assim como adenocarcinomas pancreáticos e colangiocarcinomas (Alleman 2003, Rebar & Thompson 2010).

Os mesoteliomas são citologicamente semelhantes a carcinomas, como já foi referido anteriormente. Tendem a produzir amostras muito celulares, com células arredondadas, de núcleos centrais, com nucléolos proeminentes e citoplasma basófilo, misturadas com células gigantes multinucleadas e figuras de mitoses. São neoplasias raras, que são consideradas malignas porque rapidamente se implantam nas serosas e produzem grande acumulação de fluidos. Para o diagnóstico definitivo é recomendada biopsia, mas podem ser usadas colorações

especiais, tais como o azul de alciano, que marca células mesoteliais, permitindo assim diferenciar de adenocarcinomas (que marcam com o ácido periódico de Schiff, PAS) ou marcadores imunocitoquímicos (Alleman 2003, Rebar & Thompson 2010, Santos & Marcos 2011).

Numa efusão associada a linfoma, a maioria das células são linfócitos imaturos, de médio a grande tamanho (1,5 a 5 vezes um eritrócito), com nucléolos proeminentes e número variável de mitoses. Os linfomas mediastínicos ou linfomas tímicos são os que mais frequentemente produzem efusões. Nestes últimos, são frequentemente de fenótipo T e portanto têm núcleos indentados e formas nucleares mais irregulares. Também podem ocorrer efusões associadas a linfomas hepáticos e gastrointestinais (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011, Santos & Marcos 2011). Estão disponíveis exames complementares como imunocitoquímica, biologia molecular ou citometria de fluxo para fazer a distinção entre linfomas de células B ou T, entre linfomas de células pequenas e efusões quilosas, ou distinção entre linfomas e outros tumores de células redondas (como processos histiocitários), contudo estes exames ainda não são usados de modo generalizado nos laboratórios de diagnóstico veterinário (Rebar & Thompson 2010, Dempsey & Ewing 2011).

Importa ainda referir que as efusões hemorrágicas também podem estar associadas a hemangiossarcomas. Neste caso, tratando-se de neoplasias mesenquimatosas, não costumam estar presentes muitas células no líquido. Só ocasionalmente se conseguem observar células isoladas ou em pequenos grupos, de aspeto fusiforme a estrelada, com núcleos grandes, nucléolos proeminentes, e por vezes multinucleadas (Alleman 2003).

I.3. Citoblocos: técnicas, vantagens e desvantagens

A técnica de citobloco foi descrita pela primeira vez em 1896 e começou a ser largamente usada em Medicina Humana na segunda metade do século passado (Jain *et al.* 2014). Corresponde a um método complementar que é praticamente ignorado no meio veterinário (Zanoni *et al.* 2012), com escassas referências bibliográficas. Há mais de 20 anos, foi apresentado um primeiro estudo com 70 casos com citoblocos (Caniatti *et al.* 1993) que não teve o impacto merecido. Já nos últimos 3 anos têm surgido esporadicamente alguns trabalhos sobre citoblocos em Medicina Veterinária (Joiner & Spangler 2012, Zanoni *et al.* 2012, Taylor *et al.* 2013, Fernandes *et al.* 2015), mas ainda falta avaliar a sua real contribuição para o diagnóstico. Em Medicina Humana, o citobloco é considerado um importante complemento ao estudo citológico de efusões, existindo trabalhos que apontam para um aumento na acuidade diagnóstica entre 12 a 55% (Liu *et al.* 1998, Nathan *et al.* 2000). O citobloco é usado principalmente em situações neoplásicas ou quando se pretendem

realizar técnicas de histoquímica (por exemplo, colorações para fungos) ou de imunohistoquímica (Nathan *et al.* 2000, Shidham & Epple, 2007; Shi *et al.* 2011).

Estão descritas muitas vantagens dos citoblocos: 1) a concentração celular permite avaliar rapidamente um número de células representativo; 2) a separação entre a parte com células da parte líquida aumenta a preservação celular, uma vez que o líquido existente entre as células causa alterações morfológicas e interfere na sua fixação; 3) a arquitetura celular é relativamente mantida, simplificando a comparação com amostras de histopatologia; 4) permitem vários cortes e diferentes aplicações, como técnicas de histoquímica, imunohistoquímica, de biologia molecular ou até microscopia eletrónica; 5) permite um arquivamento de material, em que depois facilmente se podem realizar estudos retrospectivos (Shi *et al.* 2011). Em termos de qualidade, a imunohistoquímica em cortes histológicos, obtidos a partir dos citoblocos, é preferível à imunocitoquímica em esfregaços de citologia. A presença de material proteico de fundo nestes últimos pode interferir com a marcação e interpretação dos resultados da imunocitoquímica (Fetsch *et al.* 2002, Shidham & Epple 2007, Shi *et al.* 2011, Herbert 2014, Jain *et al.* 2014).

Estão descritas várias técnicas de citobloco, com o uso ou não de meios adicionais, mas os procedimentos base são os mesmos: concentração inicial, seguida de fixação e processamento, como qualquer outra amostra histológica (Shidham & Epple 2007, Jain *et al.* 2014). Recomenda-se que todos os passos sejam realizados em laboratórios especializados, não só pela fragilidade das amostras, mas também porque são necessários meios especiais (tais como a agarose), que não estão habitualmente disponíveis nas clínicas e hospitais veterinários.

A amostra recolhida em tubo com EDTA é primeiro centrifugada (1000 a 3000 rpm, 10 minutos), o sobrenadante é desprezado e o sedimento celular (*pellet*) é envolvido em agarose morna, esperando-se até arrefecer e solidificar. O sedimento celular já solidificado é removido do tubo, é cortado o excesso de agar até próximo das extremidades e o sedimento é colocado numa cassete para processamento histológico. Durante 24 horas é mantida numa solução fixadora (por exemplo, álcool a 50% e formol tamponado a 10% em partes iguais), seguindo-se depois a inclusão em parafina, corte em micrótopo e coloração com hematoxilina e eosina (H&E). É importante que o intervalo de tempo entre a colheita e a realização do citobloco seja o menor possível (inferior a 2 horas e refrigerado). Se tal não for possível, pode ser adicionado formol a 10% à amostra de eusão, em partes iguais, informando o laboratório para que não se proceda a nova fixação (Peleteiro 2011). Existem vários métodos de fixação e a sua escolha pode influenciar as técnicas imunológicas (Nathan *et al.* 2000, Ramos-Vara *et al.* 2010, Herbert 2014, Jain *et al.* 2014). É relevante referir que podem ser usados outros produtos em alternativa à agarose, tais como a albumina, gelatina, HistoGel® ou podem ser realizadas outras técnicas como o método plasma-

trombina ou “colloidion bag” (Shidham & Epple 2007, Joiner & Spangler 2012, Jain *et al.* 2014). Aliás, as técnicas de citobloco continuam a evoluir em Medicina Humana e até existem sistemas completamente automáticos, como por exemplo o Cellient™ Automated Cell Block (Jain *et al.* 2014).

Os cortes de citobloco, apesar de serem agregados celulares e não tecidos, podem fornecer informação histológica importante em termos da arquitetura, porque se mantém parte da matriz extracelular responsável pela coesão celular (que normalmente é perdida com os esfregaços convencionais). Assim, é possível obterem-se amostras com formações papilares, acinares, em “favo de mel”, em paliçada, trabecular e até em arranjos perivasculares, contribuindo para a representação do tecido no geral, especialmente em neoplasias epiteliais e mesenquimatosas (Shidham & Epple 2007, Zanoni *et al.* 2012, Herbert 2014, Jain *et al.* 2014).

As principais desvantagens dos citoblocos são o aumento do trabalho e tempo de processamento das amostras, exigindo técnicas e meios que só estão disponíveis em laboratórios especializados, necessitando ainda de transporte desde as clínicas/hospitais até ao laboratório. Além disso, pode existir alguma variabilidade de resultados por ausência de uniformização de técnicas de processamento entre laboratórios (Jain *et al.* 2014). Assim, no cômputo geral, a relação benefício/custo pode não ser a ideal em muitas situações.

Parte II. A técnica do citotubo aplicada a efusões de cão e gato

II.1. Introdução

A avaliação citológica de efusões permite chegar ao diagnóstico final em muitas situações, e mesmo quando não produz um diagnóstico, permite distinguir entre processos inflamatórios e neoplásicos. Contudo, a prática clínica veterinária tem evoluído no sentido dos proprietários quererem “certezas” e o “tratamento mais adequado”. Para dar essas respostas, a citologia por si só poderá não ser suficiente. Além de muitas vezes ser difícil distinguir entre células neoplásicas e células mesoteliais, reativas ou neoplásicas, como já foi referido, mesmo em efusões neoplásicas de células redondas, a citologia pode não diferenciar entre linfoma, timoma, leucemia, sarcoma histiocítico ou mastocitoma (Wallace *et al.* 2015). Já nas efusões hemorrágicas, é muito complicado observar células neoplásicas quando o microhematócrito da efusão é superior a 20% (Hirschberger *et al.* 1999). Nesse sentido, é cada vez mais importante procurar técnicas que ajudem a chegar a um diagnóstico definitivo. A imunocitoquímica seria uma opção à partida, mas tem limitações práticas em citologia (Fetsch *et al.* 2002, Shidham & Epple 2007, Jain *et al.* 2014).

Já a transformação de amostras líquidas em microbiopsias, através da técnica do citobloco, abre novas perspectivas para o diagnóstico de efusões em cães e gatos. A arquitetura celular é mantida, conseguem-se fazer múltiplos cortes passíveis de serem usados em técnicas imunohistoquímicas, de biologia molecular ou outras. Além disso, os citoblocos permitem que as amostras líquidas sejam conservadas quase indefinidamente, o que de outra maneira seria quase impossível.

Já a técnica do citotubo reúne todas as vantagens dos citoblocos, sendo mais simples, económica e com uma maior intervenção metodológica da parte dos médicos veterinários (Marcos 2013). Esta técnica ainda não tinha sido aplicada a um número substancial de animais, pelo que este trabalho pretendeu avaliar o contributo dos citotubos para a obtenção de um diagnóstico definitivo em efusões de cães e gatos.

II.2. Material e métodos

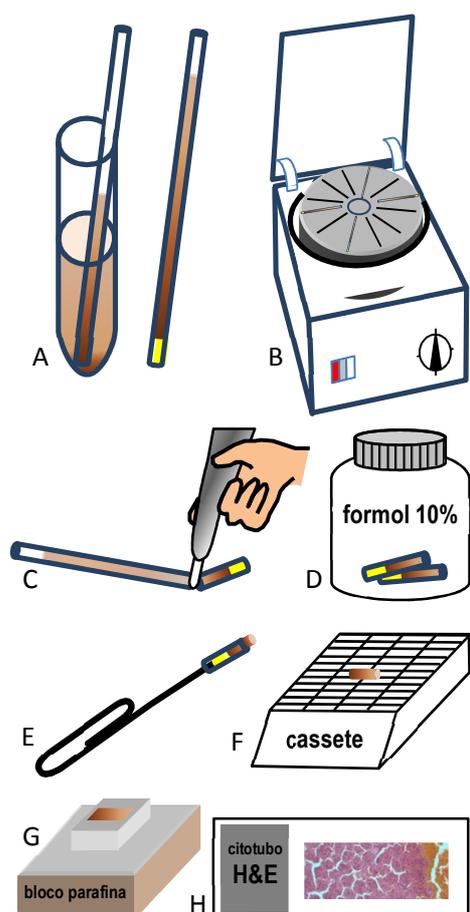


Figura 3 – Técnica do citotubo; (A-D) foram realizados na clínica e (E-H) no laboratório (ver detalhes no texto).

Foram recolhidas 18 amostras de efusões cavitárias, 10 de cães e 8 de gatos. Cada uma foi avaliada em relação às características físicas, quantificação proteica, TNCC e estudo celular para a classificação em transudados, transudados modificados e exsudados. Em todas as amostras foram realizados esfregaços diretos e esfregaços com citocentrífuga ou a partir do *buffy-coat*. As lâminas foram coradas com Diff-Quik (Hemacolor, Merck) e a avaliação citológica foi realizada pelo autor (CM) e por um citopatologista (Mario Caniatti, Ricardo Marcos ou Marta Santos). As amostras foram classificadas como “neoplásicas” ou “suspeitas de neoplasia”. Assim, incluíram-se 7 efusões com população de células redondas (Quadro II, Anexos), 6 efusões carcinomatosas (Quadro III, Anexos) e 5 efusões hemorrágicas com suspeita clínica ou imagiológica de neoplasia de células mesenquimatosas (hemangiossarcoma) (Quadro IV, Anexos).

Em todas as amostras foram realizados dois a quatro citotubos (Marcos 2013). Primeiramente recolheu-se líquido para tubos de microhematócrito (Fig. 3A), que

foram selados com plasticina e centrifugados (12000 rpm, 5 minutos) (Fig. 3B). Estes foram cortados, com uma caneta com ponta de diamante, ligeiramente acima da interface sólido-líquido (Fig. 3C), sendo depois colocados em formol a 10% durante 24 horas (Fig. 3D). Depois foram colocados em álcool a 70% e enviados para o Laboratório de Histologia do ICBAS, onde se procedeu ao processamento para inclusão em parafina. Aqui usou-se um processamento de rotina, apenas com a particularidade da remoção dos citotubos dos tubos de microhematócrito através de um clip (Fig. 3E). Os citotubos foram processados no interior de cassetes, com qualquer outra microbiopsia (Fig. 3F). Os blocos de parafina (Fig. 3G) foram depois cortados a \approx 5 μ m, obtendo-se quatro a seis lâminas por caso; uma foi corada com H&E (Fig. 3H) e as restantes foram congeladas a -80°C para posterior imunohistoquímica.

O processamento de imunohistoquímica foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária do ICBAS e a escolha dos anticorpos dependeu da avaliação citológica dos esfregaços e observação das lâminas de H&E dos citotubos. Nas amostras com população de células redondas foram usados marcadores PAX-5 e CD3, para linfócitos B e T, respetivamente (Ramos-Vara *et al.* 2010) (Quadro V, Anexos). Em duas das amostras com suspeita de timoma foram usados marcadores para células do estroma do timo, AE1/AE3, desmina e S100 (Zóltowska *et al.* 1998, Queiroga *et al.* 2004) e num caso suspeito de tumor neuroendócrino usou-se a cromogranina e sinaptofisina (Ramos-Vara *et al.* 2010). Já nas efusões carcinomatosas usaram-se AE1/AE3, E-caderina, CK-14 e p63 (Ramos-Vara *et al.* 2010, Peña *et al.* 2014). Foram ainda usados marcadores de células mesoteliais, vimentina e calretinina (Fetsch & Abati 2001, Ramos-Vara *et al.* 2010, Przewdziecki & Sapierzynski 2014). Nas efusões hemorrágicas com suspeita de hemangiossarcomas usou-se um marcador de células de endotélio vascular, CD31 (Ramos-Vara *et al.* 2010).

O protocolo de imunohistoquímica foi realizado com o *kit* NovoLinkPolymerDetectionSystem (Novocastra, Newcastle, Reino Unido). Procedeu-se à recuperação antigénica em banho-maria com a solução Target Retrieval a 10% (Dako, Glostrup, Dinamarca), em todos os anticorpos, exceto S100 e E-caderina. No primeiro não foi feita recuperação antigénica, ao passo que na E-caderina a recuperação foi feita em micro-ondas (600W, 10 minutos) em solução Target Retrieval com 0.5 ml solução Extran MA01 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A revelação foi feita com 3,3'-diaminobenzidine (DAB) e para a coloração nuclear usou-se hematoxilina. Em todos os casos usaram-se controlos positivos e negativos, empregues no Laboratório de Patologia Veterinária, correspondentes a tecidos cuja marcação pelo anticorpo está devidamente confirmada.

II.3. Resultados

Comparando com os esfregaços diretos, as técnicas de concentração celular eram comparáveis, com um melhor detalhe celular nos esfregaços de *buffy-coat* em comparação com os esfregaços de sedimento após centrifugação (Fig. 4). Nos esfregaços de *buffy-coat*, as células não apareceram tão deformadas pelo meio líquido envolvente, os arranjos de células epiteliais e/ou mesoteliais (quando presentes) não se encontravam alterados, e a porção hemática (quando existente) estava separada.

A obtenção dos citotubos não foi alvo de problemas relevantes na clínica. No laboratório, a remoção dos citotubos do tubo de microhematócrito (Fig. 3E) foi mais difícil em amostras muito hemáticas, em que foi mais complicado manter a estrutura cilíndrica. No entanto, o arrefecimento do citotubo com um cubo de gelo facilitava esta remoção.

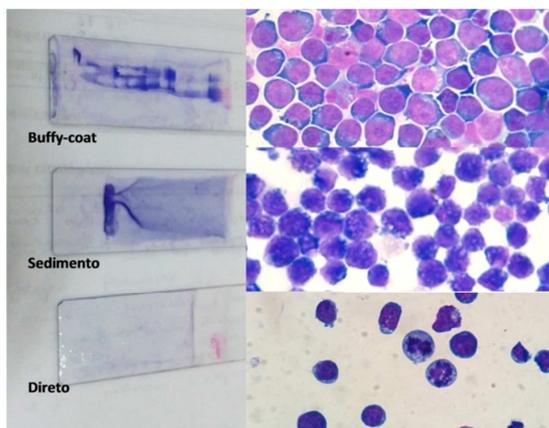


Figura 4 – Aspectos macroscópico e microscópico dos esfregaços direto, do sedimento após centrifugação e do *buffy-coat* de uma efusão abdominal de linfoma; Diff-Quik.

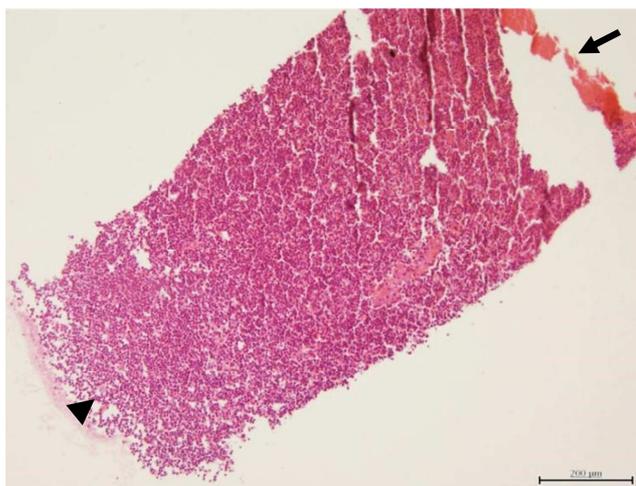


Figura 5 – Aspecto histológico do citotubo. Os eritrócitos surgem na extremidade próxima da plasticina (seta) e as células inflamatórias na extremidade oposta (ponta de seta); H&E, barra = 200 µm.

A caracterização celular nos cortes de citotubos foi concordante com a avaliação dos esfregaços, com a vantagem de nos de efusões carcinomatosas se conseguirem observar bem as células nos arranjos tridimensionais (nos esfregaços o detalhe das células nos arranjos perdia-se) (Fig. 6).

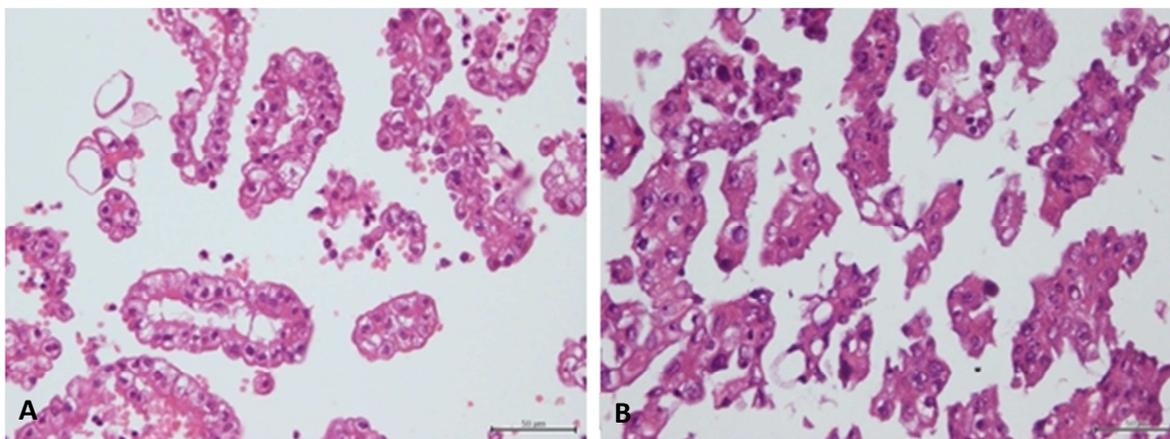


Figura 6 – Preparações histológicas obtidas do citotubo de efusões carcinomatosas. A: arranjos acinares indicativos de diferenciação glandular; B: presença de grupos sólidos em monocamada. H&E, barra = 50 µm.

Nos citoblocos, além das células estarem separadas por camadas (e ser mais fácil a distinção entre as neoplásicas e as inflamatórias) podem surgir arranjos claramente papilares ou acinares, característicos de epiteliais (Fig. 6). Já na amostra de linfoma LGL (tal como nas amostras histológicas das massas) os grânulos não eram facilmente detetados nos citotubos.

O estudo com imunomarcadores foi no geral bastante satisfatório (Quadro II, III e IV, Anexos). Em todos os casos de efusões de linfoma (Fig. 7), incluindo o caso de LGL, houve reação positiva para CD3, permitindo identificação das populações de linfócitos como T (Fig. 8). Numa das efusões suspeita de timoma (depois confirmado com histologia da massa) houve marcação positiva para CD3 nos linfócitos e para AE1/AE3, sugerindo a presença de células epiteliais reticulares; no entanto, nesse caso os resultados com S100 e desmina foram negativos.

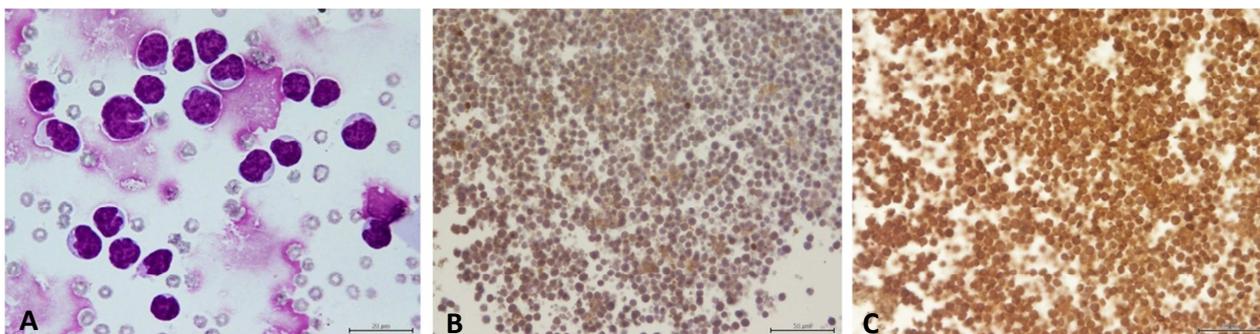


Figura 7 – Linfoma mediastínico T. A: preparação citológica com linfócitos médios a grandes de núcleos irregulares; B: a maioria dos linfócitos é negativa para PAX5 (com ligeira marcação inespecífica de fundo); C: intensa marcação CD3. Diff-Quik (A) e imunomarcacão/cromogénio DAB (B, C). Barra = 20 µm (A), 50 µm (B, C).

Na efusão suspeita de neoplasia neuroendócrina a marcação com a cromogranina e sinaptofisina não permitiu estabelecer um diagnóstico definitivo, devido à excessiva marcação de fundo. É importante referir que nesse caso, a biopsia transtorácica da massa também não permitiu chegar a um diagnóstico definitivo. Inicialmente o diagnóstico seria de tumor anaplásico, altamente compatível com linfoma, mas os testes de imunohistoquímica com CD3, CD79a e vimentina foram negativos, excluindo quer essa hipótese, quer a de tumor mesenquimatoso. Infelizmente não se fizeram marcadores para tumores neuroendócrinos em histopatologia.

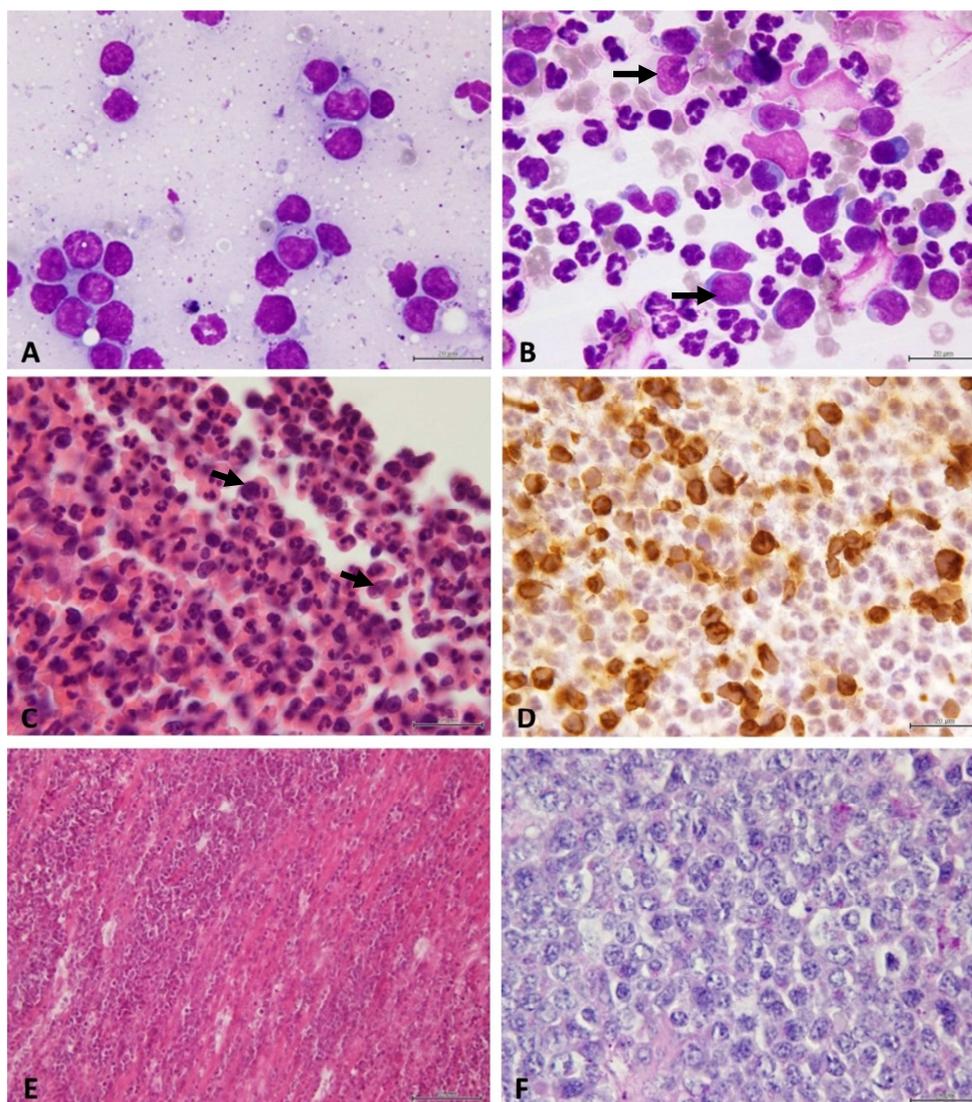


Figure 8 – Linfoma do tipo LGL. A: esfregaço da massa abdominal com linfócitos grandes com grânulos citoplasmáticos púrpura (também em pano de fundo); B: esfregaço do *buffy-coat* da efusão peritoneal com linfócitos semelhantes aos da massa (setas); C: linfócitos atípicos no citotubo da efusão (setas); D: marcação com CD3 dos linfócitos atípicos; E: preparação histológica da massa (removida na necrópsia) com linfócitos neoplásicos; F: população neoplásica com grânulos citoplasmáticos evidenciados pela coloração de PAS. Diff-Quik (A, B), H&E (C, E), imunomarcção/cromogénio DAB. Barra = 20 μ m (A, B, D, E, F), 50 μ m (C).

Todas as efusões carcinomatosas, foram positivas a AE1/AE3. As que foram testadas com vimentina foram negativas, sendo que numa dessas amostras havia marcação com vimentina na zona de células mesoteliais, com uma distinção clara entre as zonas do citotubo (Fig. 9). Na amostra em que se usou também a E-caderina obteve-se uma boa marcação (Fig. 10), ao passo que na amostra em que se usou o p63 não se registaram células marcadas. Já no caso da calretinina, usada apenas numa das amostras, obteve-se apenas marcação de fundo inespecífica. Nas efusões hemorrágicas secundárias a hemangiossarcomas o CD31 foi negativo.

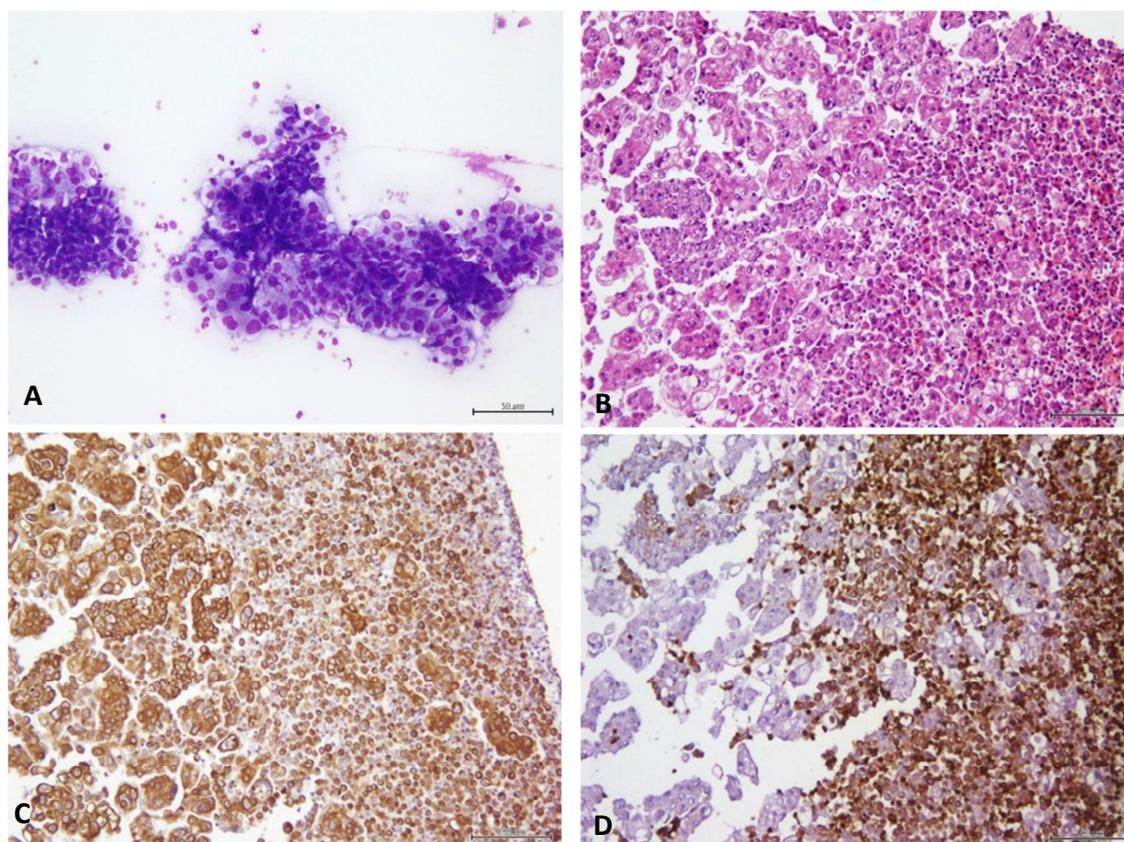


Figura 9 – Efusão carcinomatosa de metástase de carcinoma mamário. A: esfregaço com grupos papilares de células vacuolizadas, com anisocariose; B: corte histológico do citotubo em que se observam os grupos celulares neoplásicos e células redondas misturadas com células inflamatórias; C: As células neoplásicas em grupos, e as mais pequenas e redondas são positivas para AE1/AE3; D: As células redondas mais pequenas também são positivas para a vimentina, o que apoia a sua origem mesotelial. Diff-Quik (A), H&E (B), imunomarcção/cromogénio DAB (C, D); barra = 50 µm.

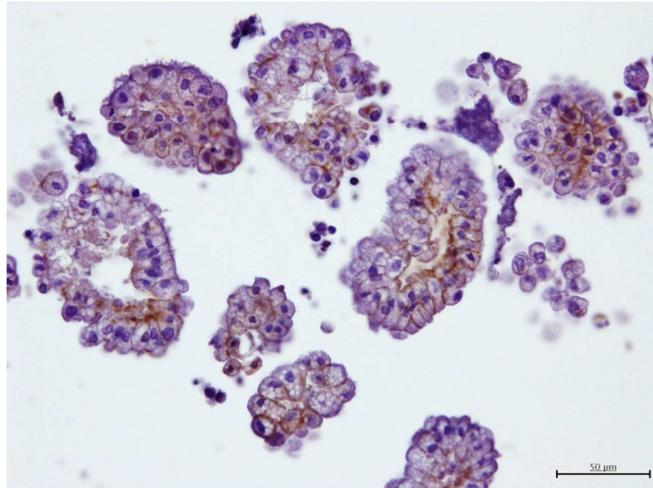


Figura 10 – Efusão carcinomatosa. As células neoplásicas têm marcação para E-caderina nas membranas basolaterais comprovando a sua origem epitelial. Imunomarcação/cromogénio DAB; barra = 50µm.

III.4. Discussão

Os esfregaços de efusões continuam a ser elementos com excelente relação qualidade/custo para obter um diagnóstico (Liu *et al.* 1998, Herbert 2014). Os diretos são essenciais para estimar a celularidade da efusão, caracterizar a população predominante e avaliar o grau de coesão e os arranjos celulares. Já as técnicas de concentração permitem avaliar uma maior quantidade de células e são essenciais quando a contagem celular da efusão é muito baixa. A técnica de *buffy-coat* pode ser uma boa alternativa às citocentrífugas em Medicina Veterinária, uma vez que os clínicos geralmente não têm este equipamento.

Os citotubos não pretendem ser substitutos mas sim complementos aos esfregaços, dando informação adicional sem um significativo acréscimo de custo. Aqui comprovámos a facilidade do método: todos os procedimentos até à fixação (Fig. 2A-D) podem ser feitos em qualquer clínica ou hospital, sem necessidade de meios técnicos especializados, estando os líquidos conservados, virtualmente, por tempo indeterminado. Além dos tubos de hematócrito e centrífuga, o único material adicional será a caneta de ponta de diamante ou, em alternativa, poderão ser usados tubos plásticos de microhematócrito, que facilmente se cortam com um bisturi. Esses tubos são substancialmente mais caros que os de vidro e não foram objeto de estudo neste trabalho. Após fixação, os citotubos podem ser enviados para laboratórios de referência sem perda de material nem de qualidade (mesmo que a efusão tenha sido recolhida numa urgência, sexta-feira à noite!). Mesmo conservados em EDTA, períodos prolongados (além das 48 horas) podem levar a uma significativa diminuição de detalhe celular (Maher *et al.* 2010, Marcos & Santos 2011, Antonangelo *et al.* 2012).

Em estudos prévios foi sugerido que amostras com elevada celularidade podem ser mais difíceis de fixar (Marcos 2013). Nestas é preferível usar menor quantidade de líquido, produzindo citotubos mais pequenos. Em teoria, a fixação dos citotubos em formol pode influenciar negativamente a realização de imunohistoquímica (Fetsch & Abati 2001, Shidham & Epplé 2007, Ramos-Vara *et al.* 2010, Jain *et al.* 2014). No entanto, os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios, provavelmente porque se usaram técnicas de recuperação antigénica para quase todos os marcadores. É importante referir que podem ser feitos muitos cortes histológicos a partir de um citotubo. Em termos de cortes de rotina ($\approx 5 \mu\text{m}$), os citotubos permitem obter uma média de 100 cortes, permitindo a realização de uma panóplia de colorações de histoquímica ou imunohistoquímica muito posterior à data da recolha das efusões. Uma particularidade do citotubos reside na separação entre camadas celulares. Esta apresentação é útil na distinção entre células neoplásicas, mesoteliais e inflamatórias ao avaliar um citotubo corado. Além disso, facilita a imunohistoquímica, na medida em que diminuem os artefactos de fundo. Esta é, sem dúvida, uma vantagem em relação à utilização de esfregaços de efusões para imunocitoquímica.

A imunofenotipagem em efusões de células redondas é uma grande mais-valia porque melhora o diagnóstico, permitindo uma abordagem terapêutica mais adequada e o estabelecimento do prognóstico (Vail 2007, Vail & Young 2007, Regan *et al.* 2012, Wallace *et al.* 2015). As técnicas de PCR e citometria de fluxo são usadas nestes tumores, por rotina, em Medicina Humana e também em Medicina Veterinária em alguns países, mas essa não é a realidade em Portugal (Ramos-Vara *et al.* 2010, Dempsey & Ewing 2011). De acordo com os nossos resultados, a imunofenotipagem pode ser conseguida com os citotubos. Para além disso, o uso de marcadores de linfócitos B e T poderá ser importante para distinguir efusões quilosas (com marcação positiva para ambos os tipos de linfócitos) (Fig. 11) de linfomas (em que habitualmente existirá um claro predomínio de um tipo de linfócitos) (Fig. 7 e Quadro II, Anexos). Neste trabalho, a maioria das efusões era pleural e em gatos jovens, pelo que se registou uma predominância de linfomas de células T, tal como era esperado de acordo com a bibliografia (Vail 2007). Também nos cães, os linfomas mediastínicos são mais frequentemente de linfócitos T (Vail & Young 2007), o que foi concordante com os resultados aqui obtidos. Existem estudos que indicam que este tipo de fenótipo tem pior prognóstico, pois está associado a períodos de sobrevivência menores e pior resposta a quimioterapia (Vail 2007, Vail & Young 2007, Regan *et al.* 2012). Já os LGL são muito raros em cães; são também de tipo T e têm uma evolução clínica extremamente agressiva (Turinelli *et al.* 2005). O caso incluído neste trabalho foi coincidente com estes dados, uma vez que o animal sobreviveu menos de uma semana após o diagnóstico. Os timomas são raros em cães e ainda mais em gatos. Nestes, a ocorrência de efusões é ainda menos comum, sendo também rara a

observação de células reticulares epiteliais (Rebar & Thompson 2010). Contudo, numa das amostras deste estudo, num gato jovem (com confirmação histológica de timoma) foi possível observar a marcação positiva de AE1/AE3. Esta distinção é importante em termos clínicos, uma vez que o tratamento de eleição para os timomas é cirúrgico, ao passo que no linfoma a quimioterapia é o tratamento a ponderar (Vail 2007, Vail & Young 2007, Withrow 2007, Zitz *et al.* 2008).

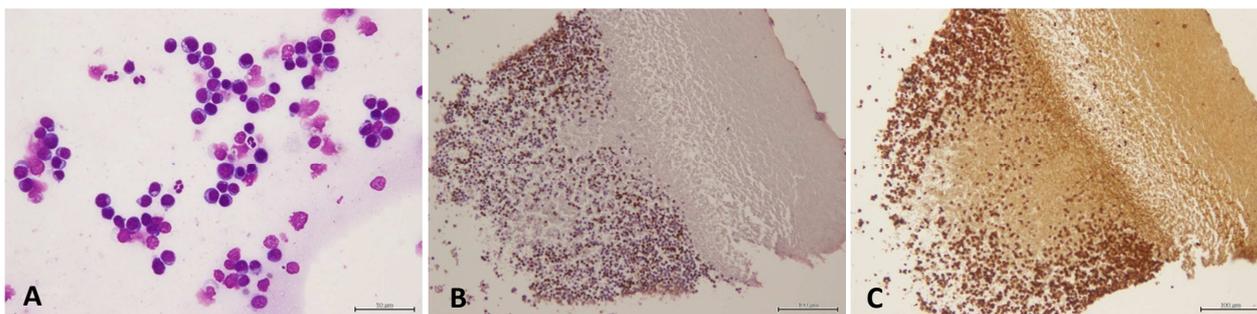


Figura 11 – Efunção quilosa. A: preparação citológica com predomínio de linfócitos médios, mas com alguns linfócitos grandes. Os linfócitos no citotubo marcavam com PAX5 (B) e com CD3 (C). Diff-Quik (A) e imunomarcagem/cromogénio DAB (B, C). Barra= 50µm.

As células epiteliais neoplásicas são muitas vezes difíceis de distinguir das mesoteliais reativas ou neoplásicas. Há estudos que indicam que, comparando com outras técnicas como a citocentrifugação, os citoblocos são superiores em termos de interpretação morfológica (Fetsch *et al.* 2002). Neste trabalho não tivemos amostras suspeitas de mesoteliomas para poder comparar e avaliar a eficácia do citotubo e, além disso, não foram incluídas efusões abdominais carcinomatosas, o que poderia aumentar a variabilidade deste tipo de efusões. Os imunomarcadores podem permitir um diagnóstico definitivo de carcinomas, principalmente se incluídos num painel (Przedziecki & Sapierzynski 2014, Wallace *et al.* 2015). Nas amostras deste estudo, foi usado o AE1/AE3 que marca células epiteliais e mesoteliais em efusões, e todas foram positivas. Já a vimentina é um marcador de células mesoteliais, mas também de células epiteliais em carcinomas pouco diferenciados, nomeadamente quando estas exibem transição epitélio-mesênquima (Przedziecki & Sapierzynski 2014, Peña *et al.* 2014). Neste estudo todas as amostras testadas com este marcador foram negativas. Assim, para um diagnóstico definitivo, era importante o uso de um terceiro marcador, como a calretinina, que marca células mesoteliais (Ramos-Vara *et al.* 2010). Infelizmente este marcador não funcionou nas nossas mãos, sendo necessários novos estudos para perceber a real utilidade da calretinina no estudo das efusões neoplásicas de cães e gatos. A desmina poderia ser outra opção (Przedziecki & Sapierzynski 2014, Wallace *et al.* 2015), assim como as citoqueratinas de elevado peso molecular (Ramos-Vara

et al. 2010). Um outro problema nas preparações citológicas prende-se com as células vacuolizadas, em que podem existir dúvidas na sua identificação como macrófagos, células mesoteliais ou mesmo epiteliais. Nestes casos a imunomarcação com AE1/AE3 (aqui testada com bons resultados) assim como outros marcadores, tais como o CD18, poderão ser úteis.

No caso das efusões hemorrágicas a técnica do citotubo seria uma grande mais-valia, principalmente em efusões pericárdicas, em que muitas vezes persiste a dúvida se são ou não idiopáticas (Hirschberger *et al.* 1999). Muitas vezes, o diagnóstico de massas cardíacas é difícil, ou devido à técnica ecográfica ou por se tratarem de animais que, normalmente, não estão estáveis hemodinamicamente. Adicionalmente, a avaliação citológica destas efusões é difícil porque as células mesoteliais, sujeitas a maior trauma pelo reduzido espaço do saco pericárdico, surgem com maiores alterações reativas (Hirschberger *et al.* 1999). Assim, se fosse possível detetar células de hemangiossarcoma com o citotubo e imunohistoquímica, poderíamos ter um diagnóstico definitivo. O CD31, marcador para células de endotélio vascular, foi negativo em todas as amostras. É característico dos tumores mesenquimatosos a baixa libertação de células e é provável que seja esta a explicação para a marcação negativa. De qualquer modo, o estudo de outros marcadores de endotélio vascular, como o Fator VIII (Ramos-Vara *et al.* 2010), poderá ser útil neste contexto. Ainda assim, o citotubo será útil para efusões hemorrágicas em que surjam células neoplásicas epiteliais ou linfóides misturadas. Para além destas aparecerem separadas do sangue no citotubo, a imunomarcação produzirá aí bons resultados, como já demonstrámos neste trabalho.

III.5. Perspetivas futuras

Este trabalho foi apenas um ponto de partida, que pretendeu avaliar a utilidade dos citotubos para complementar o diagnóstico citológico de efusões. Em termos de tempo, a obtenção de resultados demora uma média de 2 a 3 dias (após o envio) e relativamente ao custo, será o equivalente ao das biopsias. Na prática, a utilização dos citotubos compensa, por ter a vantagem de se pouparem os animais a novos procedimentos cirúrgicos, mais invasivos e com significativos custos adicionais. Portanto, o citotubo é uma técnica de citobloco mais fácil e mais acessível aos médicos veterinários clínicos.

É oportuno referir que o método do citotubo ainda está em fase de melhoramento, nomeadamente no que se refere às técnicas de imunohistoquímica. Apesar dos bons resultados com a maioria dos marcadores testados, pretende-se melhorar a técnica para obter uma marcação com a calretinina. O objetivo último será o de estabelecer painéis imunohistoquímicos para que se possa ter um diagnóstico definitivo entre neoplasias epiteliais e células mesoteliais (neoplásicas ou reativas).

Também se pretende estudar mais casos de efusões hemorrágicas com suspeita de hemangiossarcoma associado, alargando o painel de imunohistoquímica a outros marcadores vasculares.

A prevalência de efusões na prática clínica é relativamente elevada (pelo menos no HVBV) e prevê-se que rapidamente se consigam obter mais amostras de citotubos para poder alargar este estudo, incluindo também procedimentos de histoquímica, ou até mesmo usar microscopia eletrónica para estudar efusões de cães e gatos. Esta última técnica poderá ser importante, por exemplo, em casos suspeitos de tumor neuroendócrino, uma vez que a microscopia eletrónica poderia confirmar a presença de grânulos nas células neoplásicas (Ramos-Vara *et al.* 2010).

Com a possibilidade de utilização de diversos marcadores imunohistoquímicos na técnica do citotubo, podemos dar um passo em frente na caracterização de muitas patologias. Sabendo que esta técnica não é exclusiva de efusões, funcionando noutros líquidos como sangue, medula óssea, urina, lesões quísticas ou lavagens traqueobrônquicas (Marcos 2013), perspectiva-se que se possa avaliar a utilização de citotubos noutras amostras. Esta técnica poderá também ser útil em punções de órgãos sólidos, se for realizada a partir de lavados de agulha (Marcos 2013, Fernandes *et al.* 2015). Após aferir e otimizar protocolos de imunohistoquímica poderá estar aqui uma ferramenta útil para diagnosticar tumores anaplásicos ou metastáticos (Ramos-Vara *et al.* 2010, Taylor *et al.* 2013).

No fundo, o citotubo poderá contribuir para melhorar o diagnóstico e respetivo estadiamento, permitindo que o tratamento de doenças oncológicas em animais de companhia se aproxime um pouco mais ao praticado na Medicina Humana. Pelo menos e para já, assim espero, consegui demonstrar aqui que o citotubo poderá ser uma valiosa ponte entre o veterinário clínico e o veterinário patologista.

Bibliografia

Alleman A R (2003) "Abdominal, thoracic and pericardial effusions", **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, 33, 89-118.

Andreasen CB (2003) "Bronchoalveolar lavage", **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, 33, 69-88.

Antonangelo L, Vargas F S, Acencio M M P, Carnevale G G, Corá A P, Teixeira L R, Sales R K B, Genofre E H (2010) "Pleural fluid: are temperature and storage time critical preanalytical error factors in biochemical analyses?", **Clinica Chimica Acta**, 411, 1275-1278.

- Antonangelo L, Vargas F S, Acencio M M P, Corá A P, Teixeira L R, Genofre E H, Sales R K B (2012) "Effect of temperature and storage time on cellular analysis of fresh pleural fluid samples", **Cytopathology**, 23, 103-107.
- Caniatti M, Roccabianca P, Marconi V, Scarpa V, Faverzani S, Gualtieri (1993) "Cell block technique in veterinary cytology" in **Atti Della Società Italiana Delle Scienze Veterinarie**, XLVII, 885-889.
- Crow S E, Walshaw S O (1997) "Centesis" in **Manual of Clinical Procedures in the dog, cat and rabbit**, 2nd Ed, Capítulo 22, 217- 220.
- Cunha N P, Giordano A, Caniatti M, Paltrinieri S (2009) "Analytical validation of the Sysmex XT-2000iv for cell counts in canine and feline effusions and concordance with cytologic diagnosis", **Veterinary Clinical Pathology**, 38, 230-241.
- Dempsey S M, Ewing P J (2011) "A review of the pathophysiology, classification and analysis of canine and feline cavitory effusions", **Journal of American Animal Hospital Association**, 47, 1-11.
- Fernandes N C C A, Guerra J M, Réssio R A, Wasques D G, Etlinger-Colonelli D, Lorente S, Nogueira E, Dagli M L Z (2015) "Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples", **Veterinary and Comparative Oncology**, doi:10.1111/vco.12137, 1-10.
- Fetsch P A, Abati A (2001) "Immunocytochemistry in effusion cytology", **Cancer Cytopathology**, 93, 293-308.
- Fetsch A, Simsir A, Brosky K, Abati A (2002) "Comparison of three commonly used cytologic preparations in effusion immunocytochemistry", **Diagnostic Cytopathology**, 26, 61-66.
- Gorman M E, Villarroel A, Tornquist S J, Flachsbarth J, Warden A, Boeder L (2009) "Comparison between manual and automated total nucleated cell counts using the ADVIA 120 for pleural and peritoneal fluid samples from dogs, cats, horses and alpacas", **Veterinary Clinical Pathology**, 38, 388-391.
- Herbert A (2014) "Cell blocks are not a substitute for cytology: why pathologists should understand cytopathology particularly in their chosen speciality", **Cytopathology**, 25, 351-355.
- Hirschberger J, DeNicola D, Hermanns W, Kraft W (1999) "Sensitivity and specificity of cytologic evaluation in the diagnosis of neoplasia in body fluids from dogs and cats", **Veterinary Clinical Pathology**, 28, 142-146.
- Jain D, Mathur S R, Iyer V K (2014) "Cell blocks in cytopathology: a review of preparative methods, utility in diagnosis and role in ancillary studies", **Cytopathology**, 25, 356-371.
- Joiner K S, Spangler E A (2012) "Evaluation of HistoGelTM-embedded specimens for use in veterinary diagnostic pathology", **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 24, 710-715.
- Liu K, Dodge R, Glasgow B J, Layfield L J (1998) "Fine-needle aspiration: comparison of smear, cytospin and cell block preparations in diagnostic and cost effectiveness", **Diagnostic Cytopathology**, 19, 70-74.
- Maher I, Tennant K V, Pappasoulotis K (2010) "Effect of storage time on automated cell count and cytological interpretation of body cavity effusions", **The Veterinary Record**, 167, 519-22.
- Marcos R, Santos M (2011) "Técnicas de colheita e coloração de esfregaços" in Peleteiro M, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H, Carvalho T, **Atlas de Citologia Veterinária**, Lidel, 1-27.

- Marcos R (2013) "Cell tube: a new technique for making cell blocks from needle rinses", **Veterinary Clinical Pathology**, 42, 401-402.
- McGrath E E, Warriner D, Anderson P B (2010) "The use of non-routine pleural fluid analysis in the diagnosis of pleural effusion", **Respiratory Medicine**, 104, 1092-1100.
- Meinkoth J H, Allison R W (2007) "Sample Collection and handling: getting accurate results" **Veterinary Clinics of North America Small animal practice**, 37, 203-219.
- Meyer D J, Connolly S L, Heng H G (2010) "The acquisition and management of cytology specimens" *in* Raskin R E, Meyer D J, **Canine and Feline Cytology: a color atlas and interpretation guide**, Saunders Elsevier 2nd Ed, 1-14.
- Murphy K, Warman S M (2007) "Approach to gastrointestinal emergencies" *in* King L G, Boag A, **BSAVA Manual of canine and feline emergency and critical care**, 2nd Ed, Capítulo 11, 162-163.
- Nathan N A, Narayan E, Smith M M, Horn M J (2000) "Cell Block Cytology, Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology", **American Journal of Clinical Pathology**, 114, 599-606.
- Peleteiro M C (2011) "Citoblocos" *in* Peleteiro M, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H, Carvalho T, **Atlas de Citologia Veterinária**, Lidel, 297-302.
- Peña L, Gama A, Goldschmidt M H, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, Diez L, Gartner F, Hellman E, Kiupel M, Millan Y, Miller A, Nguyen F, Poli A, Sarli G, Zappulli V, Mulas J M (2014) "Canine mammary tumors: a review and consensus of standard Guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype marker, HER2 and Hormone receptor assessment using immunohistochemistry", **Veterinary Pathology**, 51, 127-145.
- Przedziecki R, Sapierynsski R (2014) "Using of immunocytochemistry in differential diagnosis of neoplasms of serosal cavities in dogs", **Polish Journal of Veterinary Sciences**, 17, 149-159.
- Queiroga E M, Chikota H, Bacchi C E, Moran C A, Suster S (2004) "Rhabdomyomatous carcinoma of the thymus", **American Journal of Surgery Pathology**, 28, 1245-1250.
- Raffe M R, Roberts J (2005) "Edema" *in* Ettinger S J, Feldman E C, **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, Elsevier Saunders 6th Ed, 70-72.
- Ramos-Vara J A, Avery A C, Avery P R (2010) "Advanced diagnostic techniques" *in* Raskin RE, Meyer D J, **Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide**, Saunders Elsevier 2nd Ed, 395-437.
- Rebar A H, Thompson C A (2010) "Body cavity fluids" *in* Raskin RE, Meyer DJ, **Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide**, Saunders Elsevier 2nd Ed, 171-191.
- Regan R C, Kaplan M S W, Bailey D B (2012) "Diagnostic evaluation and treatment recommendations for dogs with substage-a high-grade multicentric lymphoma: results of a survey of veterinarians", **Veterinary and Comparative Oncology**, 11 (4), 287-295.
- Santos M, Marcos R (2011) "Derrames cavitários" *in* Peleteiro M, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H, Carvalho T, **Atlas de Citologia Veterinária**, Lidel, 233-247.
- Shi S, Shi Y, Taylor C R (2011) "Antigen Retrieval Immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades", **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 59, 13-32.

- Shidham V B, Epple J (2007) "Collection and processing of effusion fluids for cytopathologic evaluation" *in* Shidham V B, Atkinson B F, **Cytopathologic diagnosis of serous fluids**, Saunders Elsevier, 207-235.
- Stepien R L, Boswood A (2007) "Cardiovascular emergencies" *in* King L G, Boag A, **BSAVA Manual of canine and feline emergency and critical care**, 2nd Ed, Capítulo 6, 70.
- Taylor B E, Leibman N F, Luong R, Loar A S, Craft D M (2013) "Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology", **Veterinary Clinical Pathology**, 42, 85-91.
- Turinelli V, Marchal T, Ponce F, Bonnefont-Rebeix C, Fournel-Fleury C (2005) "Aggressive large granular lymphocyte lymphomas in five dogs: a clinical cytohistological and immunological study", **Comparative Clinical Pathology**, 13, 109-118.
- Vail D M (2007) "Feline lymphoma and leukemias" *in* Withrow SJ, Vail DM, **Withrow & MacEwen Small animal clinical oncology**, W. B. Saunders Elsevier 4th Ed, Capítulo 31, 733-749.
- Vail D M, Young KM (2007) "Canine lymphoma and lymphoid leukemias" *in* Withrow S J, Vail DM, **Withrow & MacEwen Small animal clinical oncology**, W. B. Saunders Elsevier 4th Ed, Capítulo 31, 699-722.
- Waddell L S, King L G (2007) "General approach to dyspnoea" *in* King L G, Boag A, **BSAVA Manual of canine and feline emergency and critical care**, 2nd Ed, Capítulo 7, 99.
- Wallace K A, Goldschmidt M H, Patel R T (2015) "Converting fluid-based cytologic specimens to histologic specimens for immunohistochemistry", **Veterinary Clinical Pathology** 44, 303-309.
- Withrow S J (2007) "Thymoma" *in* Withrow S J, Vail DM, **Withrow & MacEwen Small animal clinical oncology**, W. B. Saunders Elsevier 4th Ed, Capítulo 32, 795-799.
- Zanoni D S, Grandi F, Rocha N S (2012) "Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an old and forgotten method", **Veterinary Clinical Pathology**, 41, 307-310.
- Zitz J C, Birchard S J, Couto G C, Samii V F, Weisbrode S E, Young G S (2008) "Results of excision of thymoma in cats and dogs: 20 cases (1984-2005)," **Journal of American Veterinary Medical Association**, 232, 1186-1192.
- Zimmerman R L (2005) "Effusion cytology: keeping researchers and journals in business for the past 20 years- and it is not over yet", **Current Diagnostic Pathology**, 11, 194-202.
- Zóltowska A, Pawelczyk T, Stopa M, Skokowski J, Stepinski J, Roszkiewicz A, Nyka W. (1998) "Myoid cells and neuroendocrine markers in myasthenic thymuses", **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 46, 253-257.

Anexos

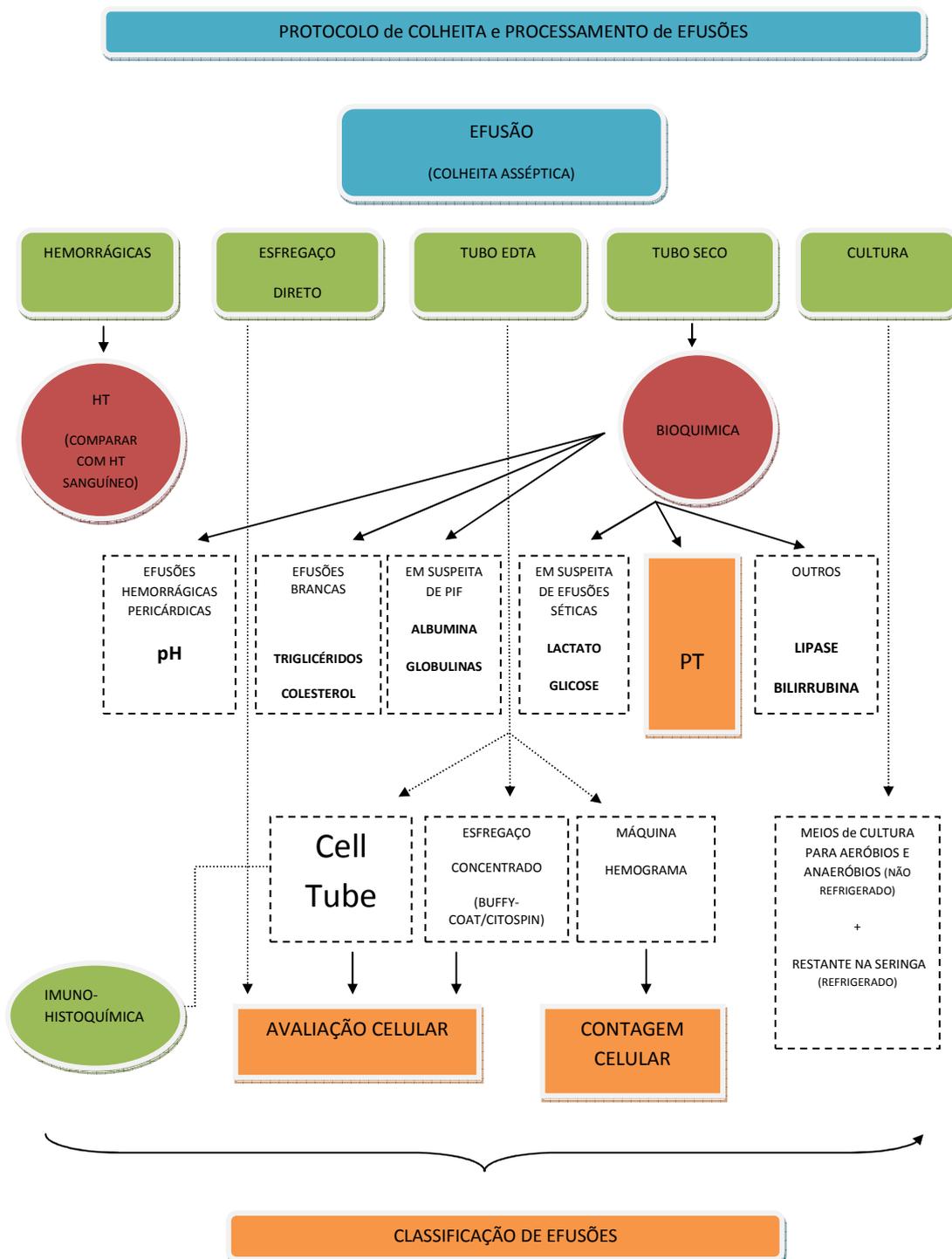


Figura I – Protocolo de colheita e processamento de amostras de efusões no HIV/AIDS.

Testes	Espécie	Resultados	Efusão
Elektroforese proteica		Concentrações de gama-globulina >1g/dl Concentração de proteína total >8g/dl Determinação de albumina (A) e globulinas (G) com ratio A:G < 0,8	
Teste de Rivalta	G	Misturar num tubo, 5 ml de água destilada, 1 gota de vinagre e adicionar 1 gota da amostra, observando a formação de coágulo definido (resultado positivo)	Sugestivo de infeção por PIF
Anticorpos (Ac) coronavírus felino		Ac 1:1600	
PCR coronavírus felino		Positivo	
pH (tira de urina)	C	Efusões pericárdicas, pH <7 (medição imediatamente após colheita)	Efusão pericárdica benigna/ não neoplásica
Troponina cardíaca I	C	Níveis elevados de troponina canina	Efusão pericárdica neoplásica por hemangiossarcoma
Glicose	C e G	Diferenças superiores a 20 mg/dl entre a glicose sérica e a da efusão	Peritonite séptica
pH, glicose, pCO ₂ , lactato	C e G	pH < 7, Glicose < 50 mg/dl, pCO ₂ > 55 mm Hg e lactato > 5,5 mmol/L	Efusão séptica
Lactato	C e G	Diferenças de -2,0mmol/L (em cães) entre o lactato sérico e a efusão	Peritonite séptica
Creatinina/ potássio	C (G)	Quando creatinina/ potássio do líquido é superior ao sérico	Uroabdómen
Triglicédeos	C e G	Triglicédeos > 100 mg/dl	Quilo
Colesterol	C e G	Colesterol no fluido superior ao sérico	Efusões pseudoquilosas
Lipase/amilase	C	Lipase e/ou amilase superiores aos do soro	Pancreatite
Bilirrubina	C e G	Bilirrubina superior aos níveis séricos	Peritonite biliar/ pleurite

Quadro I – Testes diagnósticos adicionais para efusões; C, cão; G, gato [adaptado de Rebar & Thompson (2010) e Dempsey & Ewing (2011)].

Animal	Idade	Sexo	História prévia	Efusão	Diagnóstico citológico	Citotubo	Imunohistoquímica/ interpretação
1G	?	M	Massa mediastínica	Pleural	Linfoma	Concordante com citologia	(+) CD3 (-) Pax5 <i>Linfoma T</i>
2G	1a	F	Massa mediastínica	Pleural	Timoma/ Linfoma	Concordante com citologia	(+) CD3 (-) Pax5 (+) AE1/AE3 (-) Desmina <i>Mais provável timoma</i>
3G	2,5a	F	Massa mediastínica	Pleural	Linfoma/ Timoma	Concordante com citologia	(+) CD3 (-) Pax5 (+) AE1/AE3 ocasional (-) S100 (-) Desmina <i>Mais provável linfoma T</i>
4G	8m	F	Massa mediastínica, FeIV +	Pleural	Linfoma	Concordante com citologia	(+) CD3 (-) Pax5 <i>Linfoma T</i>
5C	11a	F	Massa abdominal, enterite, pancreatite	Abdominal	Linfoma (<i>large granular lymphoma</i>)	Concordante com citologia; grânulos citoplasmáticos menos visíveis.	(+) CD3 (-) Pax5 <i>Linfoma T</i>
6C	14a	M	Massa mediastínica	Pleural	Linfoma	Concordante com citologia	(+) CD3 (-) Pax5 <i>Linfoma T</i>
7C	10a	M	Massa torácica (diagnóstico prévio de tumor anaplásico negativo para CD3, CD79a e vimentina)	Pleural	Exsudado, piogranulomatoso com componente eosinofílica	Concordante com citologia	Cromogranina: marcação inespecífica Sinaptofisina: marcação inespecífica <i>Inconclusivo</i>

Quadro II – Efusões suspeitas de neoplasias de células redondas. C, cão; G, gato; a, anos; m, meses; M, macho; F, fêmea.

Animal	Idade	Sexo	História prévia	Efusão	Diagnóstico citológico	Citotubo	Imunohistoquímica
8C	11a	F	Carcinoma mamário	Pericárdica	Efusão neoplásica carcinomatosa	Concordante com citologia	(+) AE1/AE3 (-) p63
9G	?	F	Carcinoma mamário	Pleural	Efusão neoplásica carcinomatosa	Concordante com citologia; arranjos papilares bem definidos	(+) AE1/AE3 (-) Vimentina (positivo nas células mesoteliais)
10C	7a	F	Padrão pulmonar nodular difuso	Pleural	Efusão neoplásica carcinomatosa	Concordante com citologia; arranjos papilares bem definidos	(+) AE1/AE3 (+) E-Cad (-) Vimentina (-) CK-14
11G	18a	F	Nódulos mamários	Pleural	Efusão neoplásica carcinomatosa, CCE	Concordante com citologia	(+) AE1/AE3
12G	?	F	Carcinoma mamário	Pleural	Efusão neoplásica carcinomatosa	Concordante com citologia	(+) AE1/AE3 (-) Vimentina
13G	13a	M	Massa torácica	Pleural	Efusão neoplásica carcinomatosa CCE	Concordante com citologia	Calretinina: marcação inespecífica

Quadro III – Efusões neoplásicas carcinomatosas. C, cão; G, gato; a, anos; m, meses; M, macho; F, fêmea.

Animal	Idade	Sexo	História prévia	Efusão	Diagnóstico citológico	Citotubo	Imunohistoquímica
14C	12a	M	Hemangiossarcoma metastizado	Abdominal	Efusão hemorrágica	Concordante com citologia	(-) CD31 (-) CD3
15C	12a	M	Massa hepática e esplênica	Abdominal	Efusão hemorrágica	Concordante com citologia	(-) CD31
16C	8a	M	Hemangiossarcoma	Abdominal	Efusão hemorrágica	Concordante com citologia	(-) CD31 (-) CD3
17C	10a	M	Massa esplênica	Abdominal	Efusão hemorrágica	Concordante com citologia	(-) CD31
18C	9a	M	Hemangiossarcoma átrio direito	Pericárdica	Efusão hemorrágica	Concordante com citologia	(-) CD31

Quadro IV – Efusões hemorrágicas com predomínio de células mesoteliais reativas e ocasionais células mesenquimatosas suspeitas de neoplásicas. C, cão; G, gato; a, anos; M, macho.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fornecedor
Pancitoqueratina	AE1/AE3	1:300	Zymed ^a
Citoqueratina (CK) 14	LL002	1:10	Serotec ^b
α -actina	HHF35	1:300	Dako ^c
Vimentina	V9	1:500	Dako
p63	4A4	<i>Ready-to-use</i>	Ventana ^d
Desmina	D33	1:20	Dako
S100	Policlonal	1:500	Dako
CD3	Policlonal	1:50	Dako
Pax5	1EW	1:40	Novocastra ^e
CD31	JC70A	1:50	Dako
E-caderina	4A2C7	1:50	InVitrogen ^f
Calretinina	Policlonal	1:20	InVitrogen
Cromogranina	Policlonal	1:500	Thermo Scientific ^g
Sinaptofisina	SP11	1:150	Thermo Scientific

Quadro V – Lista de anticorpos e respectivas diluições usadas no estudo imunohistoquímico o citotubo em efusões de cão e gato. ^aZymed Laboratories, San Francisco, Estados Unidos da América (EUA); ^bSerotec, Puchheim, Alemanha; ^cDako, Glostrup, Dinamarca; ^dVentana, Tucson, EUA; ^eNovocastra, Newcastle, Reino Unido; ^fInVitrogen LifeTechnologies, Frederick, EUA.

