

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Mauren Picada Emanuelli

**CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA COMO MÉTODO
DIAGNÓSTICO PRECOCE EM ENFERMIDADES EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

Santa Maria, RS
2016

Mauren Picada Emanuelli

**CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO
PRECOCE EM ENFERMIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Trabalho de conclusão apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS
2016

Mauren Picada Emanuelli

**CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO
PRECOCE EM ENFERMIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Trabalho de conclusão apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 04 de abril de 2016:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Rafael de Almeida Figuera, Dr. (UFSM)

Glauca Denise Kommers, PhD. (UFSM)

Maria Andreia Inkelmann, Dr. (Unljuí)

Eduardo Kenji Masuda, Dr.

Santa Maria, RS
2016

RESUMO

CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PRECOCE EM ENFERMIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA

AUTOR: Mauren Picada Emanuelli
ORIENTADOR: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

A citologia aspirativa por agulha fina é uma técnica fácil, rápida, de baixo custo e minimamente invasiva, que pode fornecer informações diagnósticas importantes rapidamente, principalmente para prover bem estar e qualidade de vida ao paciente. O objetivo desta tese envolveu a utilização e aplicação da citologia aspirativa por agulha fina em doenças específicas em animais domésticos. Para isso, inclui um artigo que compara o diagnóstico citopatológico de tumores mamário em cadelas, com o histopatológico e descreve elementos citológicos importantes para a diferenciação e classificação adicional dos tipos de tumores; e outro artigo que descreve os achados citológicos na seneciose em bovinos. O primeiro trabalho incluiu 101 amostras citológicas de tumores de mama de 61 cadelas entre 2012 e 2014. Destes, a análise citológica classificou 96% dos tumores malignos e 4% benignos. Entre todos os tumores mamários malignos, o mais comum foi carcinoma simples (54,17%), seguido de carcinoma complexo (20,83%) e carcinoma em tumor misto (17,71%). Carcinossarcoma (4,17%), osteossarcoma (2,08%) e carcinoma de células escamosas (1,04%) foram infrequentes. Os tumores benignos incluíram dois adenomas complexos (40%) e três tumores mistos benignos (60%). Os diagnósticos citológicos foram comparados com os histopatológicos, resultando em acurácia de 99%, sensibilidade de 100% e especificidade de 83%. A concordância diagnóstica foi de 92,5% para carcinoma simples, 57,89% para carcinoma complexo, 57,14% para carcinoma em tumor misto, 27,27% para carcinossarcoma e 100% para osteossarcoma. Células mioepiteliais foram identificadas em sete carcinomas complexos e dez carcinomas em tumor misto, por isso sua ocorrência não pode auxiliar na distinção destes dois tumores através da citologia. Células mesenquimais alongadas (prováveis fibroblastos) foram diferenciadas, através da citologia, de células mioepiteliais, o que permitiu distinguir carcinoma simples com reação desmoplásica de carcinomas complexo e mistos. Matriz magenta, interpretada como condroide e/ou osteoide, foi identificada em 66,66% dos carcinomas em tumor misto, 63,64% dos carcinossarcomas, 50% dos tumores misto benignos, 50% dos osteossarcomas e 10,53% dos carcinomas complexos. Uma matriz rosa, finamente granular e abundante ao fundo da lâmina (matriz mixoide) foi encontrada em 28,57% dos carcinomas em tumor misto, 27,27% dos carcinossarcomas e 50% dos tumores misto benignos. Este tipo de matriz foi ausente nos tumores complexos, por isso sua presença pode ser indicativa de tumores mistos. No segundo estudo foi realizada a citologia aspirativa por agulha fina do fígado de um bovino suspeito de intoxicação por *Senecio* spp., o que demonstrou a presença de megalocitose, principal achado histopatológico para a confirmação do diagnóstico. A CAAF na seneciose ainda não foi descrita, e os achados citológicos tiveram boa correlação com os histopatológicos, o que indica a possibilidade de incluir este método no diagnóstico precoce de seneciose em bovinos. Portanto, nossos resultados melhoram a confiabilidade da citologia aspirativa por agulha fina como método diagnóstico em tumores mamários de cadelas e demonstram a eficácia da CAAF no diagnóstico de seneciose em bovinos, possibilitando o diagnóstico precoce destas enfermidades e consequentemente fornecer ao clínico informações importantes para decisões sobre conduta e tratamento a ser selecionado.

Palavras-chave: Citologia. Tumores de mama. Caninos. Seneciose. Bovinos.

ABSTRACT

FINE-NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY AS AN EARLY DIAGNOSIS METHOD IN VETERINARY MEDICINE

AUTHOR: Mauren Picada Emanuelli
ADVISOR: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Fine-needle aspiration cytology is an easy, rapid, low cost, and minimally invasive technique, consequently contributes to a faster diagnosis leading to a faster decision, mainly to provide welfare and quality of life to patients. The objective of this study was to use FNAC in specific diseases of domestic animals. One study evaluated the association between cytopathology and histopathology diagnosis of mammary tumors in female dogs and described important cytology elements to further differentiate and classify tumors; and another study described cytological findings on bovine seneciosis. The first study included 101 samples of 61 dogs from 2012 to 2014. Cytologic examination classified 96 samples as malignant tumors and five as benign. Among all malignant tumors, the most frequent was simple carcinoma (54.17%), complex carcinoma (20.83%) and malignant mixed tumor (17.71%). Carcinosarcoma (4.17%), osteosarcoma (2,08%) and squamous cell carcinoma (1,04%) were the least common. Benign tumors were complex adenomas (n=2; 40%) and mixed tumors (n=3; 60%). Cytology diagnoses were compared to histopathology with 99% accuracy, 100% sensibility and 83% specificity. Cyto-histologic correlation was 92.50% for simple carcinomas, 57.89% for complex carcinomas, 57.14% for malignant mixed tumor, 27.27% for carcinosarcomas and 100% for osteosarcomas. Myoepithelial cells in nests were seen in both complex and mixed tumors and therefore should not be considered as a cytologic feature for differential diagnosis. Mesenchymal cells (probably fibroblasts) were differentiated from myoepithelial cells by FNAC, allowing us to differentiate simple carcinomas with desmoplastic reactions from complex and mixed tumors. Magenta matrix, interpreted as condroid/osteoid, was found in malignant mixed tumors (66.66%), carcinosarcomas (63.64%), benign mixed tumors (50%), osteosarcomas (50%), and complex carcinomas (10.53%). Abundant extracellular pink and finely granular matrix throughout the background was found in six malignant mixed tumors (28.57%), three carcinosarcomas (27.27%) and two benign mixed tumors (50%). This matrix was absent in complex tumors. For this reason, it can be used as an indicator of mixed tumors. The second study was performed on a bovine liver presenting clinical signs and history of Senecio spp. poisoning. Cytology slides showed megalocytosis, the main finding on histopathology to confirm the diagnosis. FNAC is not described as a diagnostic method for Seneciosis. Cyto-histo correlation was good, suggesting that FNAC can be used as a diagnostic method for bovine Seneciosis. Consequently, our results suggest FNAC as a valid method for diagnosing malignant mammary tumors in female dogs and also have efficacy on bovine seneciosis diagnosis. These results give an early and rapid diagnosis, allowing the veterinarian to choose the best treatment option, or determine the prognosis for an animal.

Keywords: Cytology. Mammary tumors. Canine. Senecioses. Bovine.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	7
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA	10
CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	22
CAPÍTULO 4 – ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	62
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO	70
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO	71
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O uso da citologia como método diagnóstico em Medicina Veterinária vem se expandindo. A citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é uma técnica fácil, rápida, de baixo custo e minimamente invasiva, que pode fornecer informações diagnósticas importantes rapidamente (Christopher *et al.*, 2008). O exame citológico pode fornecer informações para um diagnóstico definitivo e, quando isso não ocorre, pode direcionar o clínico no uso de testes diagnósticos adicionais, determinar a melhor opção de tratamento ou prognóstico do animal (Cowell e Tyler, 2002; Bohn e Callan, 2007).

Em cães, as neoplasias mamárias são os tumores que ocorrem com maior frequência nas fêmeas, e aproximadamente 50% deles são tumores malignos (Sleeckx *et al.*, 2011; Withrow *et al.*, 2013). Devido a alta incidência e comportamento maligno dos tumores de mama nesta espécie é imprescindível fornecer suporte diagnóstico adequado e estratégias terapêuticas eficientes para garantir qualidade de vida e saúde à população de cães. Neste cenário, a CAAF torna-se uma ferramenta diagnóstica válida para a escolha do tratamento, determinação do prognóstico e expectativa de vida do animal.

O uso da CAAF como método diagnóstico nos tumores mamários de cadelas vem aumentando, e a concordância diagnóstica com a histopatologia tem mostrado sucesso em estudos mais recentes (Allen *et al.*, 1986; Hellmen e Lindgren, 1989; Rocha e Tostes, 2006; Cassali *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2009; Haziroglu *et al.*, 2010; Sontas *et al.*, 2012). Entretanto, a maioria dos estudos já publicados são feitos com um número limitado de amostras, o que dificulta a análise estatística. Com base nisso, um estudo com maior número de amostras resultaria em melhor avaliação estatística e, conseqüentemente, em uma maior acurácia diagnóstica. Além disso, a maioria dos estudos utilizando CAAF para o diagnóstico de neoplasias mamárias diferencia tumor benigno de maligno (Hellmen e Lindgren, 1989; Zuccari *et al.*, 2001; Simeonov e Stoikov, 2006; Cassali *et al.*, 2007; Haziroglu *et al.*, 2010), e não aborda a diferenciação entre tumores simples, mistos e complexos, o que seria relevante, já que o comportamento biológico pode variar entre os tumores.

Ainda não existem estudos comparativos dos achados citopatológicos em cada tipo de tumor, e também não se conseguiu diferenciar, citologicamente, tumores complexos de tumores mistos, o que poderia ser utilizado como indicativo de prognóstico no pré-operatório. A presença ou não de matriz, e a identificação dos diferentes tipos de matrizes parece parte importante no diagnóstico diferencial de tumores simples, complexos e mistos (Cassali *et al.*, 2009; Cassali *et al.*, 2011; Cassali *et al.*, 2012), no entanto, não parece haver um consenso quanto aos tipos de tumores em que é encontrada, além de não existir atualmente nenhum estudo que aborda este elemento no diagnóstico citológico.

Baseado na ausência deste detalhamento morfológico e de elementos que possam auxiliar no diagnóstico, foi realizado um estudo completo, que classifique os tumores através da CAAF e identifique elementos presentes (células, matrizes, necrose e inflamação) em cada tumor. Devido a relevância desta neoplasia e praticidade do exame citológico, estudos que identifiquem critérios de classificação para os diferentes tipos de tumores mamários se tornam importantes. Eles aumentam a precisão no diagnóstico e a confiabilidade do clínico na escolha da CAAF como método válido para o auxílio diagnóstico de neoplasias mamárias em cães. Acreditamos que a CAAF de tumores mamários em cadelas terá alta especificidade, sensibilidade e acurácia diagnóstica comparada ao diagnóstico histopatológico, e esperamos que o detalhamento citológico dos tipos de tumores forneça elementos suficientes para a diferenciação de tumores simples, complexos e mistos.

Em animais de produção a citologia ainda é um método diagnóstico negligenciado apesar de ser um procedimento relativamente fácil e que pode fornecer informações diagnósticas importantes em um curto período de tempo. O desconhecimento por parte do clínico da indicação, procedimento para obtenção da amostra e critérios para interpretação dos resultados parece ser determinante na falta de utilização deste método (Bohn e Callan, 2007). Além disso, no Brasil, laboratórios que avaliem e interpretem corretamente estas amostras são poucos ou não estão prontamente disponíveis ao clínico de campo.

Em bovinos, a seneciose é a principal causa de morte em bovinos adultos na região central do Rio Grande do Sul (Rissi *et al.*, 2007). A ocorrência da doença está relacionada à ingestão de plantas do gênero *Senecio* spp. que contém alcaloides pirrolizidínicos. A intoxicação crônica por *Senecio* spp. provoca lesões hepáticas

progressivas e, geralmente, pode-se observar sinais clínicos vários meses após a ingestão. As mortes ocorrem de forma esporádica durante um período prolongado de tempo (Barros *et al.*, 1987; Méndez *et al.*, 1987; Driemeier *et al.*, 1991). De acordo com Barros *et al.* (1987), não existe tratamento específico, nem sintomático, que permita recuperar os animais com sinais clínicos da doença. Portanto, o diagnóstico precoce permite que medidas possam ser tomadas para minimizar prejuízos produtivos, tais como o abate pré-terminação ou de animais não terminados.

O método de eleição para o diagnóstico de intoxicação por *Senecio* spp. é o exame histopatológico (Grecco *et al.*, 2010), que revela a presença de megalocitose dos hepatócitos, proliferação das células biliares e fibrose em grau de distribuição variável. Para o diagnóstico precoce, o exame histopatológico pode ser realizado com amostra de biópsia hepática (Braga *et al.*, 1985; Craig *et al.*, 1991; Molyneux *et al.*, 1991; Barros *et al.*, 2007). No entanto, o envio, processamento da amostra até a liberação do resultado pode resultar em demora na decisão clínica.

A CAAF, ainda que com uso limitado na medicina de produção, já é utilizada para diferenciar processos inflamatórios sépticos de não sépticos e para diferenciar lesões inflamatórias de neoplásicas (Bohn e Callan, 2007). No caso de tecidos parenquimatosos como o fígado, a CAAF é descrita no diagnóstico de lipidose (Hoff *et al.*, 1996) e para a confirmação de abscessos observados no ultrassom (Braun *et al.*, 1995). No entanto o uso da CAAF para o diagnóstico de seneciose ainda não foi descrito na literatura.

Neste cenário, a validação da citologia como método diagnóstico na seneciose parece ser de extrema importância, uma vez que o estabelecimento do diagnóstico precoce pode minimizar perdas econômicas. Assim, esperamos identificar achados citológicos semelhantes aos histopatológicos e desta forma disponibilizar aos clínicos um método rápido e confiável para o diagnóstico de seneciose em bovinos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumores mamários em cães

2.1.1 Caracterização dos tumores mamários

Neoplasmas mamários estão entre os tumores mais comuns em cães (Misdorp, 2002), e, quando são consideradas apenas fêmeas, são os que ocorrem com maior frequência, correspondendo a 52% de todos os tumores (Queiroga e Lopes, 2002; Sleenckx *et al.*, 2011). Em países como Estados Unidos, e em alguns países da Europa ocidental, onde a ovariário-histerectomia ou a ovariectomia são realizadas preventivamente, a incidência de neoplasia mamária é baixa. No entanto, em outras regiões da Europa e no Brasil, a prevalência é muito maior, já que a castração eletiva não é praticada rotineiramente (Moe, 2001; Oliveira Filho *et al.*, 2010).

A glândula mamária é uma glândula sudorípara modificada. Na espécie canina há frequentemente cinco pares, ocasionalmente quatro ou seis pares, arranjados de forma bilateralmente simétrica. O tecido glandular consiste de glândulas túbulo-acinares, ductos intralobulares e tecido conjuntivo interlobular (Bacha e Bacha, 2006). A porção alveolar secretória é composta por células epiteliais cuboidais secretórias, enquanto a porção ductal é formada por células epiteliais colunares e cuboidais não secretórias, já os ductos papilares apresentam epitélio escamoso estratificado queratinizado. Ao redor das células epiteliais alveolares encontram-se as células mioepiteliais, e ao redor dos grandes ductos, bandas de músculo liso e fibras elásticas. Os alvéolos e pequenos ductos são suportados por tecido conjuntivo (Banks, 1986).

A maioria dos tumores mamários afeta as glândulas abdominais caudais e inguinais (Oliveira Filho *et al.*, 2010), provavelmente devido a maior quantidade de receptores hormonais de estrogênio e progesterona nessas glândulas, o que parece favorecer a ocorrência desses tumores (Donnay *et al.*, 1995). Em um estudo realizado por Benjamin *et al.* (1999), no qual neoplasia mamária foi induzida por radiação, cerca de 60% das cadelas apresentaram mais de um tumor, que muitas

vezes foram histologicamente distintos e apresentaram comportamento biológico diferente.

O tamanho dos nódulos mamários é considerado fator independente para o prognóstico (Cassali *et al.*, 2011). Tumores menores que 3 cm têm melhor prognóstico quando comparados com tumores maiores. O tamanho do tumor deve ser sempre considerado no estadiamento clínico, juntamente com a presença de metástases em linfonodos regionais e metástases à distância (Owen, 1980; Yamagami *et al.*, 1996).

Foi sugerido por Sorenmo *et al.* (2009) que tumores malignos possam se desenvolver a partir de tumores benignos, ou seja, uma progressão maligna a partir de uma lesão benigna em um estágio final. Essas conclusões foram baseadas na idade do paciente, no tamanho do tumor e na aparência histológica, na qual animais mais velhos apresentaram tumores maiores e evidências de progressão para a malignidade. Com base nisso, alguns autores afirmam que tumores maiores que 5 cm de diâmetro têm prognóstico desfavorável (Foster, 2007).

Os fatores de risco mais importantes para o aparecimento de tumores mamários incluem: idade, exposição hormonal e alimentação; mas raça e genética também são considerados fatores relevantes. A média de idade para aparecimento dos tumores mamário está entre 10-11 anos, no entanto há um aumento no risco a partir de 6-7 anos (a chamada "idade do câncer") (Moulton, 1990; Sontas *et al.*, 2012). Sucessivas exposições à progesterona ao longo da vida predispõe ao aparecimento do tumor, sendo um dos mecanismos responsáveis à indução da produção do hormônio do crescimento pela glândula mamária (Queiroga *et al.*, 2008; Sleenckx *et al.*, 2011). A administração exógena de progestágenos, usados comumente como contraceptivos, também é incriminada no aumento da prevalência dos tumores mamários (Sorenmo, 2003; Sleenckx *et al.*, 2011). A condição corporal e a dieta também influenciam no aparecimento do tumor. Cães magros entre 9-12 meses de idade têm menor risco de desenvolver tumores de mama (Sonnenschein *et al.*, 1991; Sleenckx *et al.*, 2011), semelhantemente com o que ocorre em mulheres (Sleenckx *et al.*, 2011; Ribas *et al.*, 2012), nas quais a obesidade é considerada fator de risco no desenvolvimento de câncer de mama (Cleary *et al.*, 2010; Sleenckx *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou um risco maior em desenvolver tumor de mama em cães que ingerem grande quantidade de carne bovina e suína, e baixa quantidade de carne de frango (Perez Alenza *et al.*, 1998; Sleenckx *et al.*, 2011). Algumas raças

como Poodle, Cocker spaniel, Pastor alemão, Maltês, Yorkshire terrier e Dachshund apresentam maior risco de desenvolver tumores de mama (Sorenmo, 2003; Raskin e Meyer, 2010), no entanto, acredita-se que isto possa variar de acordo com as raças de maior ocorrência na região ou país (Sontas *et al.*, 2009; Sontas *et al.*, 2012). Maior prevalência em cães de raças grandes também já foi descrita (Itoh *et al.*, 2005; Raskin e Meyer, 2010). Há também um possível componente genético (Borge *et al.*, 2011; Sleenckx *et al.*, 2011), no entanto nenhuma mutação genética foi identificada até o momento em cães com tumores de mama (Sleenckx *et al.*, 2011).

Os tumores mamários são principalmente de origem epitelial (incluindo mioepitelial), isto porque há íntima associação entre o epitélio e o mioepitélio, o que resulta em uma combinação nos chamados adenoma e carcinoma complexo. Os tumores mistos apresentam componente epitelial, mioepitelial e cartilagem e/ou osso (Foster, 2007). Aproximadamente 50% dos tumores mamários são malignos, destes a maioria são carcinomas e menos de 5% são sarcomas (Sleenckx *et al.*, 2011; Withrow *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Cassali *et al.* (2009) com 1.040 tumores mamários, aproximadamente 25% foram carcinoma em tumor misto e 20% tumor misto benigno. Outro estudo mais recente que incluiu 1.465 tumores mamários, dos quais cerca de 27% foram benignos. Destes 40% eram tumor misto benigno, 31% adenoma simples e 24% adenoma complexo; os tumores malignos perfizeram cerca de 73%, sendo a maioria carcinoma simples (40%), seguido por carcinoma complexo (25%) e tumor misto maligno (15%) (Oliveira Filho *et al.*, 2010). Os poucos tumores de origem mesenquimal incluem principalmente fibroma/fibrossarcoma, condroma/condrossarcoma e osteoma/osteossarcoma.

Os tumores mamários são clinicamente diagnosticados com base no histórico do paciente, na idade, no histórico reprodutivo, nos sinais clínicos e no exame físico (Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003; Withrow *et al.*, 2013), mas o diagnóstico definitivo e o tipo de tumor são determinados pelo exame anatomopatológico, principalmente histopatológico (Misdorp, 2002; Sorenmo, 2003; Sorenmo *et al.*, 2009). O exame histopatológico é considerado o método padrão-ouro para o diagnóstico, no entanto pode limitar prévia decisão clínica e/ou cirúrgica, já que, na maioria dos casos, a avaliação histológica do nódulo/massa somente é feita pós remoção cirúrgica. A histopatologia possibilita a avaliação estrutural do tecido, além de permitir observar detalhadamente a presença de pleomorfismo, o grau de diferenciação, o número de mitose, a ocorrência de necrose e as margens cirúrgicas (Misdorp *et al.*, 1999). Uma

alternativa no auxílio diagnóstico é a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), um método rápido, minimamente invasivo e com baixo custo. A CAAF já é um método valioso no diagnóstico de várias doenças, incluindo as de origem neoplásica (Ventura *et al.*, 2012); para tumores de pele, por exemplo, a concordância diagnóstica (citopatológica/histopatológica) pode ultrapassar 90% (Ghisleni *et al.*, 2006).

2.1.2 Citologia aspirativa por agulha fina em neoplasias mamárias

A CAAF é utilizada rotineiramente no diagnóstico pré-cirúrgico de tumores de mama em mulheres, por ser rápida e minimamente invasiva, sendo considerada uma alternativa à biópsia incisional prévia à extirpação (Ogawa *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004). Em Medicina Veterinária, a CAAF é utilizada amplamente para o diagnóstico de vários tumores (Magalhães *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2012) e os achados citológicos possuem boa correlação com o diagnóstico histopatológico (Griffiths *et al.*, 1984; Magalhães *et al.*, 2001; Simeonov, 2010). O valor diagnóstico deste método é questionado quando aplicado a neoplasias mamárias de cães (Magalhães *et al.*, 2001), devido principalmente à baixa sensibilidade e especificidade demonstradas em alguns estudos (Allen *et al.*, 1986; Hellmen e Lindgren, 1989).

Especificamente nas neoplasias mamárias de cães, a concordância do diagnóstico citológico com o histopatológico atualmente é considerada boa (Hellmen e Lindgren, 1989; Rocha e Tostes, 2006; Simeonov e Stoikov, 2006; Cassali *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2009; Haziroglu *et al.*, 2010; Sontas *et al.*, 2012), no entanto, há estudos que demonstraram inadequada acurácia da citologia no diagnóstico (Griffiths *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1986; Zuccari *et al.*, 2001). A acurácia diagnóstica variou de 25% a 96,5% quando as amostras citológicas inadequadas/não diagnósticas não foram consideradas (Tabela 1). Definição dos critérios de malignidade, presença de necrose e/ou inflamação, heterogeneidade do tumor e reconhecimento de células mioepiteliais em tumores complexos e mistos são fatores limitantes para o diagnóstico citológico de tumores mamários (Allen *et al.*, 1986). A percentagem de amostras inadequadas/não diagnósticas variou de 9,86% a 27,7% (Allen *et al.*, 1986; Hellmen e Lindgren, 1989; Rocha e Tostes, 2006; Cassali *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2009; Haziroglu *et al.*, 2010; Sontas *et al.*, 2012). Alguns dos fatores limitantes para a obtenção de uma amostra citológica de qualidade são a

inabilidade ou a falta de experiência do profissional que realiza a CAAF (Allen *et al.*, 1986) e número insuficiente de aspirações em cada tumor (Simon *et al.*, 2009). A realização da CAAF por um profissional experiente e a amostragem de pelo menos quatro diferentes aspirações em cada tumor aumentam substancialmente a acurácia e sensibilidade do exame (Sontas *et al.*, 2012).

Tabela 1. Resumo dos estudos publicados em diagnóstico citológico de tumores mamários em cadelas

Referência	N	Amostras inadequadas %	Sensibilidade %	Especificidade %	Acurácia diagnóstica %
Griffiths <i>et al.</i> (1984)	19	-	-	-	42
Allen <i>et al.</i> (1986)	75	17,6	21	55,5	25
Hellmen e Lindgren (1989)	84	11	65	94	79
Zuccari <i>et al.</i> (2001)	35	-	73	83	63
Simeonov e Stoikov (2006)	70	-	-	-	81,4
Rocha e Tostes (2006)	71	9,86	-	-	80
Cassali <i>et al.</i> (2007)	77	24,7	100	88,6	92,2
Simon <i>et al.</i> (2009)	50	14	88	96	93
Haziroglu <i>et al.</i> (2010)	31	10,4	-	-	88,5
Sangha <i>et al.</i> (2011)	23	-	87,5	85,7	70
Sontas <i>et al.</i> (2012)	90	27,7	96,2	100	96,5

Na glândula mamária canina, o uso da CAAF pode permitir o diagnóstico diferencial de mastites, além de outros tumores, principalmente oriundos da pele que recobre as mamas, como lipomas e mastocitomas (Queiroga e Lopes, 2002; Cassali *et al.*, 2011). Com relação às neoplasias mamárias, o principal objetivo é diferenciar lesões benignas de malignas (Sangha e Singh, 2012), e se possível fazer a distinção entre carcinomas simples, complexo e misto, visto que o prognóstico está diretamente relacionado ao tipo de tumor.

A maioria dos estudos utilizando CAAF para o diagnóstico de neoplasias mamárias foca na diferenciação de tumor benigno e maligno (Hellmen e Lindgren, 1989; Zuccari *et al.*, 2001; Simeonov e Stoikov, 2006; Cassali *et al.*, 2007; Haziroglu *et al.*, 2010). Simon *et al.* (2009) associaram os achados citológicos com o prognóstico, e sugeriram o uso da CAAF, em conjunto com outros parâmetros para avaliar prognóstico no pré-cirúrgico. Allen *et al.* (1986) avaliaram o uso dos critérios de malignidade utilizados na citologia como preditores de mortalidade, no entanto, nenhum dos critérios foi capaz de predizer mortalidade. Poucos estudos tentaram diferenciar tumores simples de mistos e complexos através da identificação das células mioepiteliais, mas não obtiveram sucesso (Allen *et al.*, 1986; Sontas *et al.*, 2012). Em cães, carcinomas complexos e mistos podem ter melhor prognóstico que carcinomas simples (Misdorp *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2014). Estudos em

humanos sugerem que as células mioepiteliais podem agir como supressoras ou promotoras de crescimento tumoral (Pandey *et al.*, 2010) e que isto pode estar relacionado ao grau de diferenciação celular, assim células menos diferenciadas seriam mais frequentes em tumores mais agressivos (Clarke *et al.*, 2005). O papel das células mioepiteliais nos tumores mistos em cães, assim como sua capacidade de suprimir ou promover carcinogênese ainda precisa ser elucidado, e estudos adicionais podem auxiliar na determinação do comportamento biológico tumoral e consequentemente prognóstico do paciente.

A CAAF consiste na obtenção de uma amostra a partir de um aumento de volume (pápula, nódulos, placa, massa) pela introdução de uma agulha 25x7 mm acoplada ou não a uma seringa estéril de variável volume. Esta agulha é movimentada em várias direções, por 3-4 vezes, e se a agulha estiver acoplada à seringa, será aplicada pressão negativa a fim de se obter quantidade adequada de material. A pressão negativa deverá ser interrompida antes da remoção da agulha do tecido e, em seguida, a amostra é transferida para a lâmina e adequadamente espalhada (Cowell *et al.*, 2008; Raskin e Meyer, 2010; Sangha e Singh, 2012). Pelo menos quatro punções devem ser feitas de diferentes áreas, pois este procedimento aumenta a probabilidade de acessar áreas distintas de um tumor heterogêneo e minimiza a obtenção de amostras inadequadas e/ou de baixa celularidade (Simon *et al.*, 2009; Sleenckx *et al.*, 2011; Sangha e Singh, 2012). Outro cuidado na obtenção da amostra é evitar o centro da lesão, principalmente de tumores grandes, que tendem a formar “áreas císticas” devido à necrose (Raskin e Meyer, 2010).

Os tumores mamários, com base nas características celulares, podem ser classificados citologicamente quanto ao comportamento (Meinkoth e Cowell, 2002; Cowell *et al.*, 2008), tecido de origem (Alleman e Bain, 2000) e severidade (Mouriquand *et al.*, 1986). Quanto ao comportamento podem ser benignos ou malignos, de acordo com os critérios celulares de malignidade conforme Cowell *et al.* (2008). A presença de três ou mais critérios indica malignidade, caso contrário o tumor é benigno (Cowell *et al.*, 2008). Com base no tecido de origem, os tumores podem ser classificados em epiteliais, mesenquimais ou mistos (Alleman e Bain, 2000), no entanto, esta classificação é dificultada pela incerteza da origem celular de vários tumores mamários relacionada ao mioepitélio nos tumores complexos e mistos (Misdorp *et al.*, 1999). Existem três linhas de pensamento com relação à origem de osso e cartilagem nos tumores mistos: formação a partir do epitélio (Allen,

1940; Monlux *et al.*, 1977), formação a partir do tecido conjuntivo (Vos *et al.*, 1993), e formação a partir das células mioepiteliais (Pulley, 1973; Tateyama e Cotchin, 1977; Destexhe *et al.*, 1993). A última hipótese é mais bem suportada. Acredita-se que haja uma transformação progressiva das células mioepiteliais em células mesenquimais durante a formação da cartilagem, indicada pela diminuição da expressão de marcadores de mioepitélio (citoqueratina, p63, α -actina de músculo liso e *maspin*) com positividade para marcadores mesenquimais (vimentina e S-100) (Gartner *et al.*, 1999). Quanto à severidade os tumores podem ser classificados em grau I, grau II e grau III, de acordo com um sistema numérico utilizado por Mouriquand *et al.* (1986).

A identificação das células mioepiteliais também é parte importante na diferenciação dos tumores. O mioepitélio é organizado de forma diferente nos ductos e alvéolos da glândula mamária. As células mioepiteliais que revestem ductos e alvéolos são as chamadas suprabasais em repouso (alongadas e achatadas) e proliferativas (poligonais) (Tateyama *et al.*, 2001; Gama *et al.*, 2003). As células mioepiteliais ductais são alongadas e estão mais ou menos arranjadas em monocamada contínua, enquanto as células mioepiteliais alveolares são individualizadas, não formam uma camada contínua e apresentam um formato estrelado (Moumen *et al.*, 2011). Existem ainda as células mioepiteliais intersticiais móveis alongadas e estreladas, que revestem o espaço intersticial e podem estar arranjadas em nichos sólidos ou isoladas no interstício (Tateyama *et al.*, 2001; Gama *et al.*, 2003). A identificação pode ser confirmada através da imuno-histoquímica, na qual as células são imunomarcadas para a proteína nuclear p63 (Gama *et al.*, 2003; Bertagnolli *et al.*, 2009; Ramos-Vara *et al.*, 2010; Beha *et al.*, 2012) e para proteínas citoplasmáticas, como a citoqueratina 5 (CK5) (Ramos-Vara *et al.*, 2010; Beha *et al.*, 2012), a citoqueratina 14 (CK14) (Gama *et al.*, 2003; Grandi *et al.*, 2011; Beha *et al.*, 2012), a alfa-actina de músculo liso (α -SMA) e a vimentina (VIM) (Gama *et al.*, 2003; Beha *et al.*, 2012). Segundo Beha *et al.* (2012), as células mioepiteliais suprabasais são melhor caracterizadas com p63 e CK14, enquanto as células mioepiteliais móveis com α -SMA e VIM. Para uma maior especificidade e sensibilidade, pelo menos dois marcadores devem ser usados para a identificação de células mioepiteliais (Dewar *et al.*, 2011). As células epiteliais do lúmen são imunomarcadas pela citoqueratina 19 (CK19) e citoqueratina AE1-AE3, e as células mesenquimais são imunomarcadas pela vimentina (VIM) (Gama *et al.*, 2010).

Gama *et al.* (2003) e Beha *et al.* (2012) observaram que nos tumores complexos e mistos de cadelas, os marcadores para células mioepiteliais foram positivos nas células mioepiteliais suprabasais, mas a marcação foi gradativamente perdida, sendo as células mioepiteliais intersticiais móveis alongadas e estreladas positivas apenas para VIM, o que reforça a teoria de que as células mioepiteliais se transformam em mesenquimais com a formação de cartilagem e osso nos tumores mistos mamários.

A presença ou não de matriz, e a identificação dos tipos de matrizes parece parte importante no diagnóstico diferencial de tumores simples, complexos e mistos (Cassali *et al.*, 2009; Cassali *et al.*, 2011; Cassali *et al.*, 2012), no entanto, não parece haver um consenso quanto os tipos de tumores em que é encontrada, além de que nenhum estudo aborda este elemento no diagnóstico citológico. Uma matriz mixoide, descrita como abundante nos tumores mistos benignos, aparece na citologia como um material extracelular, amorfo, granular e rosa espalhado ao fundo da lâmina (Raskin e Meyer, 2010), que pode ser confirmada pela coloração de azul Alciano (Alcian Blue) ou ácido periódico de Schiff (PAS) (Ramos-Vara *et al.*, 2010). A matriz osteoide, que pode estar presente nos tumores mistos, aparece como um material intercelular, variavelmente fibrilar, rosa e brilhante (Cowell *et al.*, 2008), que pode ser confirmada utilizando o tricrômico de Masson (Ramos-Vara *et al.*, 2010). A matriz condroide, também frequentemente presente nos tumores mistos, principalmente quando jovem pode se assemelhar muito com a matriz mixoide (Misdorp, 2002) e também é positiva para a coloração azul Alciano. Na citologia ela aparece como um material finamente granular a fibrilar, denso e magenta (Kini, 2011).

Para a interpretação da CAAF existem protocolos que facilitam a interpretação por patologistas, clínicos e cirurgiões, e auxiliam no diagnóstico dos tumores mamários em cadelas, como o guia da Sociedade Papanicolau de Citopatologia para Aspiração com Agulha Fina (Practice, 1997), ou o protocolo desenvolvido por Cassali *et al.* (1998). De forma geral, a maioria dos trabalhos faz adaptações de protocolos existentes, ou desenvolvem seu próprio protocolo (Allen *et al.*, 1986; Simon *et al.*, 2009; Hazirolu *et al.*, 2010; Sontas *et al.*, 2012).

2.1.3 Classificação histopatológica das neoplasias mamárias em cães

A classificação histopatológica dos tumores mamários de cães segue o preconizado pela Organização Mundial de Saúde – *Armed Forces Institute of Pathology* (OMS-AFIP) (Misdorp *et al.*, 1999). No entanto, há particularidades em classificações propostas por diferentes autores, e por isso diferentes classificações podem ser utilizadas em um mesmo estudo (Benjamin *et al.*, 1999; Cassali *et al.*, 2011; Goldschmidt *et al.*, 2011).

Os tumores benignos são classificados segundo Misdorp *et al.* (1999) e incluem, entre outros, adenoma simples, adenoma complexo e tumor misto benigno. Adenoma simples é composto exclusivamente por células epiteliais. No caso de adenoma complexo há também proliferação do mioepitélio (Misdorp *et al.*, 1999), mas ausência de formação de matriz mixoide e de necrose e atipia celular (Cassali, 2002). No entanto, Misdorp (2002) descreve que as células mioepiteliais parecem produzir uma substância mucinosa em alguns tumores deste tipo, o que pode ser confundido com matriz condroide jovem, presente em alguns tumores mistos benignos. Os tumores mistos benignos apresentam componente epitelial benigno (epitélio e/ou mioepitélio) e componente mesenquimal benigno, com produção de cartilagem e/ou osso e/ou gordura, eventualmente com tecido conjuntivo fibroso (Misdorp *et al.*, 1999). O mioepitélio proliferado está frequentemente embebido em abundante matriz extracelular, e certo grau de pleomorfismo e atipia está sempre presente neste tipo de tumor (Cassali *et al.*, 2011).

A classificação histológica dos tumores mamários malignos, segundo Misdorp *et al.* (1999), inclui, entre outros, carcinoma complexo, carcinoma simples, carcinoma anaplásico, carcinoma de células escamosas, carcinossarcoma e carcinoma em tumor benigno. Carcinoma complexo é composto por epitélio e mioepitélio, sendo o epitélio, na maioria das vezes, o componente maligno (Misdorp *et al.*, 1999). Segundo Cassali *et al.* (2011) não há evidência de matriz mixoide, e necrose, atipia celular e mitoses são frequentes. No entanto, Misdorp (2002) relata que pode ter substância mucoide intercelular nestes tipos de tumores. No carcinoma simples há apenas um componente maligno, que pode ser epitélio ou mioepitélio (Misdorp *et al.*, 1999). Este tipo de tumor geralmente se desenvolve durante longos períodos sem intervenção cirúrgica, e áreas de necrose são comuns (Cassali, 2002). O carcinoma anaplásico é formado por células epiteliais altamente pleomórficas, com alto grau de

atipia e é considerado o tumor com prognóstico mais desfavorável. O carcinoma de células escamosas é formado por mantos sólidos de células com áreas de diferenciação escamosa. Carcinossarcomas apresentam componente epitelial, incluindo mioepitélio, e componente mesenquimal malignos (Misdorp *et al.*, 1999). Quando o epitélio neoplásico maligno é abundante em meio a ilhas de diferenciação cartilaginosa ou óssea benignas, pode-se utilizar a classificação de Benjamin *et al.* (1999) na qual designa carcinoma em tumor misto ao invés de carcinossarcoma. Segundo (Misdorp *et al.*, 1999), carcinoma em tumor benigno é caracterizado por área focal ou nodular de epitélio maligno em um tumor primariamente misto benigno.

2.2 Intoxicação por *Senecio* spp.

Doenças tóxicas são a segunda maior causa de morte em bovinos no Sul do Brasil (Karam *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Rissi *et al.* (2007), cerca de 15% das mortes de bovinos foram devido a ingestão de plantas tóxicas, sendo a intoxicação por *Senecio* spp. a mais frequente (Barros *et al.*, 2007; Rissi *et al.*, 2007; Karam *et al.*, 2011). O manejo de forma semi-intensiva ou extensiva, que é predominante no sul do Brasil, pode contribuir para a intoxicação, já que as plantas do gênero estão presentes no campo e servem de alimento para os animais, principalmente em épocas de escassez de pasto de boa qualidade (Mendez, 1993). Estudos realizados por Karam *et al.* (2004) e Rissi *et al.* (2007), concluíram um aumento no número de casos de intoxicação por *Senecio* spp. nos últimos anos, e que a diminuição do rebanho ovino, controladores naturais da planta, e alterações climáticas como longos períodos de seca, poderiam ter contribuído para isso.

A toxicidade das plantas do gênero *Senecio* spp. é amplamente conhecida e seus efeitos foram descritos em vários países, sob diversas denominações. Bull *et al.* (1968) descrevem que fazendeiros da Grã-Bretanha, desde 1787, atribuíam a morte de animais à planta *Senecio jacobaea*. O primeiro relato de intoxicação no Brasil foi descrito por Carvalho e Mauge (1946) em equinos. Existem mais de 128 espécies descritas no Brasil, sendo a mais freqüente e popular o *Senecio brasiliensis*, popularmente conhecido como Tasneirinha, Catião, Flor das Almas e Maria Mole (Mendez, 1993).

O *Senecio* spp. apresenta em sua composição os chamados alcalóides pirrolizidínicos, compostos que são produzidos como metabólitos secundários com a função, dentre outras, de repelir insetos herbívoros (Fu *et al.*, 2007). Quando ingeridos, estes compostos são metabolizados e ativados para formar metabólitos pirrólicos que são altamente hepatotóxicos. Estes compostos ainda podem ter ação genotóxica, mutagênica e carcinogênica (Li *et al.*, 2011). A intoxicação clássica por *Senecio* spp provoca lesões hepática progressivas, e geralmente pode-se observar sinais clínicos vários meses após a ingestão. As mortes ocorrem de forma esporádica durante um período prolongado de tempo (Barros *et al.*, 1987; Méndez *et al.*, 1987; Driemeier *et al.*, 1991). De acordo com Barros *et al.* (1987), não existe tratamento específico, nem sintomático, que permita recuperar os animais com sinais clínicos da doença. Portanto, o diagnóstico precoce permite que medidas possam ser tomadas para minimizar prejuízos produtivos, tais como o abate pré-terminação ou de animais não terminados.

O método de eleição para o diagnóstico de intoxicação por *Senecio* spp. é o exame histopatológico (Grecco *et al.*, 2010), que revela a presença de megalocitose dos hepatócitos, proliferação das células biliares e fibrose em grau de distribuição variável. Para o diagnóstico precoce, o exame histopatológico pode ser realizado com amostra de biopsia hepática (Braga *et al.*, 1985; Craig *et al.*, 1991; Molyneux *et al.*, 1991; Barros *et al.*, 2007).

2.2.1 Citologia aspirativa por agulha fina em animais de produção

Em animais de produção a citologia ainda é um método diagnóstico pouco utilizado apesar de ser um procedimento relativamente fácil e que pode fornecer informações diagnósticas importantes em um curto período de tempo. O desconhecimento por parte do clínico da indicação, procedimento para obtenção da amostra e critérios para interpretação dos resultados parece ser determinante na falta de utilização deste método (Bohn e Callan, 2007). A CAAF, ainda que de uso limitado na medicina de produção, já é utilizada para diferenciar processos inflamatórios sépticos de não sépticos e para diferenciar lesões inflamatórias de neoplásicas (Bohn e Callan, 2007). No caso de tecidos sólidos como o fígado, a CAAF é descrita no diagnóstico de lipidose (Hoff *et al.*, 1996) e para a confirmação de abscessos observados no ultrassom (Braun *et al.*, 1995).

2.2.2 Citologia aspirativa por agulha fina do fígado

Para a realização da CAAF é necessário preparar a área da pele correspondente a localização do fígado. É feita a tricotomia da área e posterior antissepsia do campo com álcool iodado. Uma agulha 0,8 x 40 mm é levemente direcionada cranialmente e introduzida no fígado. Pode-se utilizar a técnica descrita por Barros *et al.* (2007) na qual se introduz a agulha no 11° espaço intercostal direito, 20 cm abaixo da linha do dorso, correspondente à posição anatômica do lobo direito do fígado. Certa resistência é notada quando a agulha penetra o parênquima hepático. Em seguida utilizando uma seringa de 10 ml é realizada a aspiração, sempre movimentando a agulha para frente e para trás no fígado. Assim que amostra suficiente for obtida, a sucção é interrompida e a agulha removida. Imediatamente a amostra é transferida para uma lâmina e adequadamente espalhada (Bohn e Callan, 2007). Outra alternativa é utilizar os fragmentos de fígado obtidos por biopsia para confecção das lâminas citológicas por “imprint”. Neste caso, os fragmentos cilíndricos entre 0,5 e 1,5 cm de comprimento por 0,1 cm de espessura são levemente pressionados e/ou deslizados sobre a lâmina, várias vezes e em diferentes posições. Em seguida a lâmina é deixada secar ao ar e posteriormente corada.

Os achados citológicos de um fígado normal revelam hepatócitos com diâmetro de aproximadamente 5 – 6 vezes o de um eritrócito e núcleo correspondente ao diâmetro de dois eritrócitos. Os hepatócitos podem estar em grandes tapetes, agregados ou individualizados. O fundo da lâmina apresenta grande número de eritrócitos provenientes do sangue, e seus elementos (Bohn e Callan, 2007).

Não há descrição dos achados citológicos de aspirados de fígado na seneciose, no entanto acredita-se que a megalocitose, e possivelmente fibrose possam ser identificadas através da CAAF. Em cães e gatos as informações citológicas provenientes da citologia aspirativa do fígado se equivalem aquelas do histopatológico (Roth, 2001), assim achados semelhantes são esperados na citologia do fígado de bovinos.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO 1

Os resultados desta Tese estão apresentados na forma de manuscrito científico, com sua formatação de acordo com as normas do periódico ao qual foi submetido:

Veterinary and Comparative Oncology
ISSN: 1476-5829

CYTOLOGIC DIFFERENTIATION OF CANINE MAMMARY TUMORS BY MATRIX AND INDIVIDUAL CELL POPULATIONS

Mauren P. Emanuelli, Rafael A. Fighera, Alfredo Q. Antoniazzi, Glaucia D. Kommers, Sonia T. A. Lopes

Abril, 2016

Title: Cytologic differentiation of canine mammary tumors by matrix and individual cell populations

Short title: Cytology differential diagnosis of canine mammary tumors

Mauren P. Emanuelli¹, Rafael A. Fighera², Alfredo Q. Antoniazzi³, Glaucia D. Kommers², Sonia T. A. Lopes¹

Department of Small Animal Clinical Sciences¹, Department of Pathology², and Department of Large Animal Clinical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence

Mauren Picada Emanuelli, Department of Small Animal Clinical Sciences, Av. Roraima 1000, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

Email: maurenemanuelli@gmail.com

Abstract

Mammary tumors are the most common neoplasm in female dogs. The aim of this study is to identify cellular elements and further classify the types of mammary gland tumors by fine-needle aspiration cytology (FNAC). We hypothesize it is possible to differentiate simple carcinoma, complex and mixed tumors by identifying myoepithelial cells and the different types of matrix. One hundred and one mammary tumors from female dogs were included in this study. We compared FNAC, using

histopathology as the gold standard. Cytologic accuracy, sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predict value (PPV) and negative predict value (NPV) for diagnosing malignant mammary gland tumor were determinated. Cytologic accuracy, Se, Sp, PPV and NPV were 99%, 100%, 83%, 99% and 100%, respectively. Cyto-histologic correlation was 92.50% for simple carcinomas, 57.89% for complex carcinomas, 57.14% for mixed carcinoma, 27.27% for carcinosarcomas and 100% for osteosarcomas. Mixoid matrix was noted in mixed tumors but not in complex tumors. Mesenchymal cells were differentiated from mioepithelial cells allowing the differentiation of simple carcinomas with schirrous reaction from complex and mixed tumors. FNAC was valid for diagnosing malignancy in canine mammary tumors.

Keywords: cytology, differential diagnosis, neoplasms, mammary gland, dog

Introduction

Mammary neoplasms are one of the most common tumors in dogs¹ and the most frequently encountered neoplasm in females, corresponding to 52% of all tumors.^{2, 3} Histopathology is considered the gold standard method for diagnosis, however it does not allow initial clinical and/or surgical decision making as most of the time, histologic examination occurs following surgical excision most of the time.⁴ On the other hand, fine-needle aspiration cytology (FNAC) is an alternative diagnostic tool as a more rapid, minimally invasive and lower cost method.⁵

FNAC is routinely used in human medicine for the pre-surgical diagnosis of breast tumors in women and is considered an alternative to incisional biopsy.^{6, 7} In veterinary medicine, FNAC is often used for the diagnosis of numerous and varied tumor types,^{8, 9} where the cytologic findings correlate well with the histopathologic

diagnosis.^{8, 10, 11} Historically, the diagnostic value of cytology has been questionable for mammary tumors in dogs⁸ due to its reported low sensitivity and specificity.^{12, 13} In more recent publications, however, cytologic analysis has demonstrated good correlation to histopathologic diagnosis.¹³⁻¹⁹ However, some reports described inadequate accuracy for mammary tumors in dogs.^{10, 12, 20} This deficiency could be explained by several factors, such as limited classification of cytologic elements associated with a limited numbers of samples due to high number of inadequate samples and/or too few cases included in the study.

In general, the majority of studies have focused on the cytologic diagnosis of malignant versus benign tumors.^{13, 15, 16, 18, 20} A few reports have attempted to differentiate simple tumors from complex and mixed neoplasms without positive results.^{12, 19} It is essential to differentiate those mammary tumors because complex and mixed tumors offer a better prognosis than simple tumors.^{4, 21, 22} Myoepithelial cells may play a role in tumor suppression and promotion. According to Pandey,²³ myoepithelial cells behave differently depending on their degree of differentiation, less differentiate cells may occur in more aggressive tumors.²⁴ Myoepithelial cells as a tumor suppressor may confer a favorable prognosis.²⁵ The role of myoepithelial cells in human breast cancer, as well as canine mammary tumors remain to be established for anticipating biological behavior and prognosis.

Therefore, the aim of this study was to determine and evaluate elements of cytology for the diagnoses of canine mammary tumors using histopathology as a gold standard. Enhancement of statistical power was a focus of the study, with a collection of high quality samples in order to increase the overall sample size. Moreover, we proposed to differentiate simple carcinomas, complex and mixed tumors by cytologic identification of myoepithelial cells and the different types of extracellular matrix.

These results allow us to provide satisfactory prognosis information on mammary tumors from dogs.

Materials and Methods

One hundred and six surgically removed mammary gland masses were sampled from 63 female dogs. Fine-needle aspiration was performed using a 22-gauge needle attached to a 10cc syringe. At least four different areas from each mass were aspirated and the contents smeared into a glass slide, immediately following surgical excision. Two slides of each area were prepared, air-dried and stained with Diff-Quik[®] (Diff-Quik[®] Differential Stain Set, American Scientific Products). All mass aspirations, slide preparations and cytologic samples were obtained by a single clinical pathologist. Two pathologists blinded to the clinical history and histopathologic results performed the evaluation and interpretation of the slides.

Cytologic interpretation was based on established individual cytomorphologic features of malignancy to characterize the masses as likely benign or malignant entities. Criteria of malignancy such as anisocytosis, pleomorphism, hypercellularity, anisokaryosis, macronucleoli, mitotic figures, coarse chromatin, anisonucleosis were scored as 0 (0%-10%), +1 (11%-30%), +2 (31%-50%) and +3 (51%-100%). Samples exhibiting three or more criteria of malignancy having score above +2 were interpreted as malignant, otherwise, they were considered benign. Samples were considered inadequate for diagnosis in some situations, such as lack of intact cells, excessive blood contamination, or high amount of cellular debris or artifacts that compromised cytologic interpretation. These samples were considered inadequate

and excluded from statistical analysis. Tumor types were classified according to tissue of origin into three general categories (epithelial, mesenchymal and mixed).²⁶

Myoepithelial cells were identified by their cytomorphologic features according to ^{27, 28}. The different types of extracellular matrix were identified by their cytologic appearance. The mixoid matrix which is abundant in benign mixed tumors, is seen as an extracellular finely granular pink material throughout the background ²⁹. The osteoid matrix, component of mixed tumors, is a variably fibrillar, bright pink intercellular material ³⁰. The chondroid matrix, noted in mixed tumors, is presented as a magenta, dense and finely granular to fibrillar material ³¹. Special stains were applied to paraffin tissue section to confirm the type of matrix: Alcian Blue for mixoid and chondroid matrix and Masson's Trichrome for osteoid matrix ³².

Following aspiration, specimens were grossly examined and fixed in 10% buffered-formalin. Subsequently, they were routinely processed and stained with H&E. Histopathologic diagnosis was based on the World Health Organization – Armed Forces Institute of Pathology (WHO-AFIP) classification for canine mammary tumors.⁴ Exceptionally, malignant mixed tumors were classified according to Benjamin, Lee ³³

Cytologic interpretation was compared to histopathologic diagnosis. The diagnostic value of cytology by FNAC was evaluated to determine accuracy, sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predict value (PPV) and negative predict value (NPV). ³⁴ A contingency 2 x 2 table was built to evaluate the cyto-histologic correlation, considering histopathology diagnosis as the 'disease' and cytology interpretation as the 'test'.

Results

A total of 101 samples, from 61 female dogs, entered in this study after excluding inadequate samples. Five (4.72%) samples from two dogs were excluded, three (2.83%) because of an inconclusive diagnosis and the other two (1.89%) referred to metastatic lymph nodes. Twenty-eight (45.9%) animals had between two and five tumors in distinct glands.

Cytologic examination classified 96 (95.56%) samples as malignant tumors and five (4.95%) as benign (Tab.1). Among all malignant tumors, the most common were simple carcinoma (54.17%), complex carcinoma (20.83%) and malignant mixed tumor (17.71%). Carcinosarcoma (4.17%), osteosarcoma (2.08%) and squamous cell carcinoma (1.04%) were infrequent. Benign tumors included two complex adenomas (40%) and three mixed tumors (60%). The histopathologic diagnosis comprised 95 (94.06%) malignant neoplasms and six (5.94%) benign. Cytologic accuracy, sensitivity and specificity for diagnosing malignancy were 99%, 100% and 83%, respectively. Positive predict value was 99% and negative predict value was 100%. Cyto-histologic agreement were 92.50% for simple carcinoma, 57.89% for complex carcinoma, 57.14% for malignant mixed tumor, 27.27% for carcinosarcoma and 100% for osteosarcoma (Tab.2).

Most of malignant tumors were characterized cytologically by atypical glandular epithelium according to hypercellularity, anisocytosis, pleomorphism, anisokaryosis and anisonucleosis. Mitotic figures were observed in one malignant mixed tumor, one osteosarcoma and in the squamous cell carcinoma. Malignant myoepithelial cells were identified in five tumors (3 complex carcinomas, 1 malignant mixed tumor and 1 carcinosarcoma). Neutrophilic inflammation was present in 27 malignant tumors (26.73%) and necrosis in 35 (34.65%). Spindle cells, often

individualized and/or surrounded by a fibrillar eosinophilic matrix (Fig.1), in the absence of myoepithelial features, were interpreted as fibroblasts (Fig.2). When in high numbers, they suggested desmoplastic reaction. This type of cell was identified in 21 malignant tumors (20.79%).

In general, simple carcinomas had high numbers of epithelial cells, arranged in large sheets and/or clusters, sometimes in an acinar-like structure with a central eosinophilic secretory product (3 cases) (Fig.3). Cellular atypia varied considerably, however most of carcinomas were well differentiated (92.31%), with a few cases being highly pleomorphic (7.69%) (Fig.4).

Complex carcinomas exhibited epithelial and myoepithelial cells in roughly equal proportion in the majority of cases (63.16%), whereas in 36.84% of cases, the epithelial cell component predominated. Interstitial motile myoepithelial cells forming nests were identified based on their morphology (Fig.5). The stellate cells constituted the nest core. They have small-condensed nuclei with scant amounts of cytoplasm with irregular and indistinct cell borders. The spindle type lined nests. Additionally, there were individualized spindle-shaped myoepithelial cells (Fig.6). Most of complex carcinomas had a bright pale-pink fibrillar or flocculent extracellular matrix, associated or not with the nests of myoepithelial cells (Fig.7).

Abundant magenta matrix interpreted as condroid/osteoid lead to the cytologic interpretation of malignant mixed tumors (Fig.8). Fibrillar pink matrix was also noted (Fig.9), and a few cases displayed abundant amount of pink matrix filling the background (Fig.10). Carcinosarcomas were identified by the presence of malignant epithelium concomitant with atypical osteoblasts and/or chondrocytes (Fig.11). Osteoblasts were the most often malignant connective tissue population seen. The presence of neoplastic osteoblasts alone, often exhibiting high criteria of malignancy

(Fig.12), was considered diagnostic for osteosarcoma. The single case of squamous cell carcinoma was markedly pleomorphic, with cells presenting variable degree of squamous differentiation (Fig.13).

Discussion

The use of fine-needle aspiration cytology (FNAC) as a diagnostic tool for canine mammary tumors is increasing, and the reported cyto-histologic agreement has improved among more recent studies.¹⁴⁻¹⁹ However, some of these studies were limited in their sample numbers,^{17, 18, 35} which may have compromised the power of statistical analysis. Our study demonstrated 99% accuracy, attributable to the higher number of samples (n=101) obtained, which satisfactorily improved cytologic accuracy. The cytologic accuracy presented herein is higher than most studies previously published (Tab.3). This contributes to FNAC as a beneficial diagnostic technique for mammary tumor analysis in dogs. Sensitivity reached 100% for the classification of malignant mammary tumors via cytologic analysis. Cassali, Gobbi¹⁶ found similar results, demonstrating the efficiency of FNAC as screening test. Specificity was 83%, the same value presented by Zuccari, Santana²⁰ but lower than what was presented by other studies.^{13, 16, 17, 19, 35} We attributed the lower specificity to one false positive case. Some degree of atypia and pleomorphism is described in benign mixed tumors³⁶ that may have compromised the diagnosis of a benign mixed tumor that was interpreted as simple carcinoma by cytology. In our opinion, information about the tumor size could have helped in distinguishing benign from malign. This referred tumor was a 0.5 cm nodule, and nodules smaller than 1.0 cm have higher chances of being benign.³⁷

In contrast to literature,^{12-14, 16-19} the number of inadequate/no diagnostic samples presented herein was only three (2.83%). We attributed the good quality slides to an experienced clinical pathologist who performed all FNAC. This aspect is considered fundamental in the slides preparation.^{12, 13, 29} It was sampled a minimum of four different sites in the same tumor. This is important for a diagnostic sample, which improves diagnostic accuracy and sensitivity.¹⁹ Some authors attributed the high number of no diagnostic samples to inexperienced person doing the FNAC.^{17, 19} To our knowledge, clinicians usually ship samples that may not be prepared by a person with enough skills or training to do a FNAC satisfactorily. It interferes on cytological slides, which are several times inconclusive or no diagnostic, frustrating both clinicians and owners. For this reason, sampling guides, specifying the need for multiples aspirations from distinct areas of the tumor, indicating the demand for new aspiration in case of no diagnostic sample, improve sample quality and give reliability to the exam.

Malignant neoplasms predominated among cytologic and histopathologic diagnoses in 19.2:1 and 15.83:1 ratio, respectively. Similar findings were previously found in other studies, including five studies from Brazil.^{16, 19, 20, 35 16, 20, 38-40} Perhaps, it reflects the delay in clinical diagnosis after tumor appearance, resulting in tumoral progression.⁴¹ Owners may not notice small nodules or simply bring the patient in for veterinary care when pain is noted.⁴² Furthermore, clinicians may wait until the nodule becomes larger for surgical intervention and/or biopsy, resulting in low identification of benign tumors.⁴³

Simple carcinoma was the most prevalent tumor in our study, same for Oliveira Filho, Kommers³⁸ in a study in the same laboratory. Other authors presented

similar results.^{13, 15, 17, 20, 44} In our study, cytology correlated with histopathology in 92.50% of simple carcinomas.

Cyto-histologic correlation was 57.89% for complex carcinomas and 57.14% for malignant mixed tumors. We attributed the low percentage to hardness in sampling and/or identify myoepithelial cells and condroid/osteoid matrix in cytologic samples. Carcinosarcomas also presented low correlation (27.27%) because of the absence or difficulty in identifying malignant mesenchymal cells. Mammary tumors, generally, are heterogeneous, comprised of different components that are unevenly distributed through the tumor. Because of this, FNAC may represent the most abundant component instead of the entire tumor. Furthermore, mesenchymal elements (condroid/osteoid) may not exfoliate properly, leading to a misinterpretation.²⁹ Difficulty in cytologic sampling has been reported by other studies on the diagnosis of complex and mixed tumors.^{12, 13, 15, 20, 45} Zuccari, Santana²⁰ described how simple is to diagnose mixed tumors using FNAC, however, their cyto-histologic agreement was 61.53%. The likelihood of using FNAC to diagnose this single type of tumor was not confirmed in our study (agreement of 57.14%) neither in others.^{16, 17, 46}

Putting in a different manner, FNAC may be more accurate when sample elements are not found on histopathology. In our series, this happened in three malignant tumors. One case was interpreted on cytology as malignant mixed tumor due to the presence of condroid/osteoid matrix around neoplastic epithelium (Fig. 14). However, the histopathologic diagnosis was complex carcinoma. The second case of malignant mixed tumor had neoplastic epithelial cells, myoepithelium and condroid/osteoid matrix on cytology, while on histopathology the presence of malignant epithelium alone led to the diagnosis of simple carcinoma (Fig. 15). Finally,

a case of complex carcinoma with abundant myoepithelium on cytology was diagnosed as simple carcinoma on histopathology (Fig. 16). Tissue sections were reviewed and histology interpretation was maintained. We conclude that the myoepithelium and condroid/osteoid matrix which led us to the cytologic diagnosis of complex carcinoma and malignant mixed tumor, respectively, were not present on the tissue blocks. The different interpretation was attributed to tissue sampling. Zuccari, Santana⁴⁷ also described one case of carcinoma interpreted histologically as benign mixed tumor. They confirmed the absence of malignant cells on the paraffin tissue blocks. These findings suggest using both cytology and histopathology techniques for a conclusive and precise diagnosis. The histopathology allows tissue architecture evaluation for assigning different degrees of infiltration and grade of malignancy, and together with other factors such as age and tumor size should offer a good prognostic information.^{4, 48} Contrarily, cytology does not provide prognostic assessment, but has advantage of being less invasive and fast, providing early diagnosis.⁴⁸⁻⁵⁰

Our group found myoepithelial cells in eleven complex carcinomas and ten malignant mixed tumors diagnosed on histopathology. Likewise, benign mixed tumors and complex adenomas had myoepithelial cells on cytologic exam, demonstrating the difficulty of differentiating complex and mixed tumors by the occurrence of myoepithelium. Allen, Prasse¹² attempted to identify myoepithelial cells in cytologic samples to differentiate complex and mixed tumors, however they were unable to distinguish those from simple carcinomas. Also, Sontas, Yuzbasioglu Ozturk¹⁹ identified spindle cells in 28% of simple carcinomas and 39.3% of complex and mixed tumors, impairing the differentiation between simple, complex and mixed tumors. Seven carcinosarcomas diagnosed on histopathology also presented

myoepithelial cells on cytologic examination, however due to absence and/or no identification of malignant mesenchymal component they were misinterpreted as complex carcinoma or malignant mixed tumor.

In the present study we proposed to distinguish spindle mesenchymal cells (probably fibroblasts) from individualized myoepithelial cells, therefore, be able to differentiate simple carcinomas with schirrous/desmoplastic reaction from complex and mixed tumors. We successfully identified mesenchymal cells in nine simple carcinomas, two complex carcinomas with marked desmoplastic proliferation, and two malignant mixed tumors containing large bands of fibrous connective tissue. Only three simple carcinomas were misdiagnosed as complex (two) and mixed (one), which is not desired, because simple carcinomas have worst prognosis than the other two. Despite this, the association was reasonable and we consider these cellular features enough to distinguish these tumors satisfactorily.

Magenta matrix was present in fourteen malignant mixed tumors (66.66%), seven carcinosarcomas (63.64%), two benign mixed tumors (50%) and one osteosarcoma (50%). Based on the appearance of this matrix and the types of tumor it was found, we interpreted it as condroid/osteoid matrix.

Abundant extracellular pink and finely granular matrix throughout the background was noted in six malignant mixed tumors (28.57%), three carcinosarcomas (27.27%) and two benign mixed tumors (50%). This matrix was not present in any complex tumor. As described by Cassali, Lavallo ³⁶ and Cassali, Bertagnolli ⁵¹ we interpreted this matrix as mixoid that is abundant in mixed cell tumors and not found in complex tumors. Consequently, the presence of this type of matrix suggests mixed cell tumor. However we call attention to some mixed tumors that do not have the presence of this type of matrix.

In carcinosarcomas we interpreted the pink background as chondroid/osteoid matrix. The fibrillar pink matrix was considered unspecific for diagnosis since it was identified in different types of tumors. It was found in mixed, complex and simple carcinomas, as well as in osteosarcomas and in carcinosarcomas. In simple carcinomas, this fibrillar eosinophilic matrix was interpreted as collagen bundles (fibrous stroma). For all other types of tumors it was examined according to cytologic elements. Cassali, Lavalle ³⁶ have previously described variable amounts of fibrous stroma in different types of carcinoma.

In conclusion, this study allows us to consider cytologic exam as a valid method for diagnosing malignant mammary tumors in female dogs (PPV=100%). For benign tumors we should consider additional factors such as age, reproductive history and macroscopic appearance of the tumor to avoid false positive (PPV=99%). Simple carcinomas were effectively diagnosed by cytology (92.5% agreement). Magenta matrix (chondroid/osteoid) and pink matrix in the background (mixoid) indicated mixed tumors, therefore useful in differentiating from complex tumors. Myoepithelium in nests was found in both, complex and mixed tumors, thus not valid for differential diagnosis. We would like to emphasize the distinction between individualized myoepithelial cells and mesenchymal cells (probably fibroblasts). This could help in differentiating simple carcinomas with fibrous stroma and/or desmoplastic reaction, from complex and mixed tumors, since the former has the worst prognosis. Taking this together, our results may improve the reliability of FNAC as a strong diagnostic test of mammary tumors in dogs by clinicians and owners, leading to an early diagnosis of these tumors and consequently presenting a higher chance of cure.

Acknowledgments

The authors thank to Veterinary Pathology and Veterinary Clinical Pathology laboratories at Federal University of Santa Maria.

References

1. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals*, 4th edn., DJ Meuten, ed., Ames, Iowa State Press, 2002: 575-606.
2. Queiroga F and Lopes C. Tumores Mamários Caninos: novas perspectivas. In: *Congresso de Ciências Veterinárias*, edn., Oeiras, Portugal, 2002: 183-90.
3. Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJ, Van Ginneken C and Van Brantegem L. Canine mammary tumours, an overview. *Reprod Domest Anim*. 2011; **46**(6): 1112-31.
4. Misdorp W, Else RW, E. H and Lipscomb TP. Histological Classification of the mammary tumors of the dog and cat. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals* edn., Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1999: 59.
5. Sangha S and Singh A. Cytopathology of Canine Mammary Gland Affections. In: *Histopathology - Reviews and Recent Advances*, edn., Intech, 2012.
6. Ogawa Y, Kato Y, Nakata B, Yoshikawa K, Kawabata S, Wakasa K, Sakurai M and Sowa M. Diagnostic potential and pitfalls of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for breast lesions. *Surg Today*. 1998; **28**(2): 167-72.
7. Choi YD, Choi YH, Lee JH, Nam JH, Juhng SW and Choi C. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. *Acta Cytol*. 2004; **48**(6): 801-6.
8. Magalhães AM, Ramadinha RR, Barros CSL and Peixoto PV. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2001; **21**: 23-32.
9. Ventura RFA, Colodel MM and Rocha NS. Exame citológico em medicina veterinária: estudo retrospectivo de 11.468 casos (1994-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012; **32**: 1169-73.
10. Griffiths GL, Lumsden JH and Valli VE. Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*. 1984; **13**(1): 13-7.
11. Simeonov R. The accuracy of fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of canine skin and subcutaneous masses. *Comparative Clinical Pathology*. 2010.
12. Allen SW, Prasse KW and Mahaffey EA. Cytologie Differentiation of Benign from Malignant Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol*. 1986; **23**(6): 649-55.
13. Hellmen E and Lindgren A. The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumours. *J Comp Pathol*. 1989; **101**(4): 443-50.
14. Rocha NS and Tostes RA. DIAGNÓSTICO COMPARATIVO ENTRE CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS. *Revistas Unoeste*. 2006.

15. Simeonov R and Stoikov D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2006; **9**(3): 211-9.
16. Cassali GD, Gobbi H, Malm C and Schmitt FC. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*. 2007; **18**(3): 191-6.
17. Simon D, Schoenrock D, Nolte I, Baumgartner W, Barron R and Mischke R. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology*. 2009; **38**(4): 521-8.
18. Hazirolu R, Yardimci B, Aslan S, Yildirim MZ, Yumusak N, Beceriklisoy H, Agaoglu R and Kucukaslan I. Cytological Evaluation of canine mammary tumours with fine needle aspiration biopsy technique. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2010; **161**(5): 212-8.
19. Sontas BH, Yuzbasioglu Ozturk G, Toydemir TF, Arun SS and Ekici H. Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. *Reprod Domest Anim*. 2012; **47**(1): 125-30.
20. Zuccari DAPdC, Santana AE and Rocha NS. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Braz J Vet Anim Sci*. 2001; **38**(1): 38-41.
21. Misdorp W and Hart AA. Prognostic factors in canine mammary cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1976; **56**(4): 779-86.
22. Yoshimura H, Nakahira R, Kishimoto TE, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K and Takahashi K. Differences in Indicators of Malignancy Between Luminal Epithelial Cell Type and Myoepithelial Cell Type of Simple Solid Carcinoma in the Canine Mammary Gland. *Vet Pathol*. 2014.
23. Pandey PR, Saidou J and Watabe K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2010; **15**: 226-36.
24. Clarke C, Sandle J and Lakhani SR. Myoepithelial cells: pathology, cell separation and markers of myoepithelial differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; **10**(3): 273-80.
25. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V and Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 2011; **48**(1): 85-97.
26. Alleman AR and Bain PJ. Diagnosing neoplasia: the cytologic criteria for malignancy. *Veterinary Medicine*. 2000; **95**(3): 204-23.
27. Gama A, Alves A, Gartner F and Schmitt F. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol*. 2003; **40**(4): 412-20.
28. Tateyama S, Uchida K, Hidaka T, Hirao M and Yamaguchi R. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Veterinary Pathology*. 2001; **38**(6): 703-9.
29. Raskin RE and Meyer DJ. *Canine and Feline Cytology - a color atlas and interpretation guide*. 2 ed, Saunders, 2010.
30. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH and DeNicola DB. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. 3rd. ed ed. St. Louis, Mosby Elsevier, 2008.
31. Kini SR. *Color Atlas of Differential Diagnosis in Exfoliative and Aspiration Cytopathology*. 2 ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
32. Ramos-Vara JA, Avery AC and Avery PR. *Advanced Diagnostic Techniques*. In: *Canine and Feline Cytology - a color atlas and interpretation guide*, 2nd ed. edn., Saunders, 2010: 395-437.

33. Benjamin SA, Lee AC and Saunders WJ. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. *Vet Pathol.* 1999; **36**(5): 423-36.
34. Baldi B and Moore DS. The practice of statistics in the life sciences. New York, Freeman, 2009.
35. Sangha S, Singh A, Sood NK and Gupta K. Specificity and Sensitivity of Cytological Techniques for Rapid Diagnosis of Neoplastic and Non-neoplastic Lesions of Canine Mammary Gland. *Brazilian Journal Of Veterinary Pathology.* 2011; **4**(1): 13-22.
36. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, Alessi AC, Daleck CR, Salgado BS, Fernandes CG, Sobral RA, Amorin RL, Gamba CO, Damasceno KA, Auler PA, Magalhães GM, Silva JO, Raposo JB, Ferreira AMR, Oliveira LO, Malm C, Zuccari DAPC, Tanaka NM, Ribeiro LR, Campos LC, Souza CM, Leite JS, Soares LMC, Cavalcanti MF, Fonteles ZGC, Schuch ID, Paniago J, Oliveira TS, Terra EM, Castanheira TLL, Felix AOC, Carvalho GD, Guim TN, Guim TN, Garrido E, Fernandes SC, Maia FCL, Dagli MLZ, Rocha NS, Fukumasu H, Grandi F, Machado JP, Silva SMMS, Bezerril JE, Frehse MS, de Almeida ECP and Campos CB. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal Of Veterinary Pathology.* 2011; **4**(2): 153-80.
37. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J and Goldschmidt MH. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009; **7**(3): 162-72.
38. Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, Marques BMFPP, Figuera RA, Irigoyen LF and Barros CSL. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2010; **30**: 177-85.
39. Martins AMCRPF, Tamaso E and Guerra JL. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2002; **39**(1): 5.
40. De Nardi AB, Rodaski S, Sousa RS, Costa TA, Macedo TR, Rodigheri SM, Rios A and Piekarcz CH. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da universidade federal do Paraná. *Arch Vet Sci.* 2002; **7**(2): 12.
41. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J and Goldschmidt MH. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology.* 2009; **7**(3): 162-72.
42. Perez Alenza MD, Tabanera E and Pena L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc.* 2001; **219**(8): 1110-4.
43. Sontas BH, Ozyogurtcu H, Gurel A and Ekici H. Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 2009; **41**(1).
44. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC and Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol.* 2005; **133**(4): 246-52.
45. Menard M, Fontaine M and Morin M. Fine needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats: a report of 102 cases. *Can Vet J.* 1986; **27**(12): 504-10.

46. Pawar Y, Kadam D, Khandekar G and Nehte R. Gross and Cytological Evaluation of Canine Spontaneous Mammary Neoplasms and Its Correlation with Histopathology and Morphometric Analysis. *Inter J Vet Sci.* 2015; **4**(3): 6.
47. Zuccari DAPC, Santana AE and Rocha NS. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Braz J Vet Anim Sci.* 2001; **38**(1): 38-41.
48. Magalhães AM, Ramadinha RR, Barros CSL and Peixoto PV. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. *Pesq Vet Bras.* 2001; **21**: 23-32.
49. Allen SW, Prasse KW and Mahaffey EA. Cytologie differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 1986; **23**(6): 649-55.
50. Teixeira LV, Lopes STA, Martins DB, França RT and Figuera RA. Punção aspirativa por agulha fina como método de coleta de material para a histopatologia no osteossarcoma canino. *Pesq Vet Bras.* 2010; **30**(2): 4.
51. Cassali GD, Bertagnolli AC, Ferreira E, Damasceno KA, Gamba CO and Campos CB. Canine mammary mixed tumours: a review. *Vet Med Int.* 2012; **2012**.

Figure legends

Fig. 1 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. Cytologic diagnosis was simple carcinoma. The fibrillar, pink matrix in the center was interpreted as collagen bundle (fibrous stroma). Histopathologic evaluation was simple carcinoma with bundles of fibrous connective tissue. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 2 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. Cytologic diagnosis was simple carcinoma. Fibroblasts, connected by a fibrillar, pink extracellular collagen matrix, are noted in the center. Cells are fusiform to stellate, have moderate amounts of blue cytoplasm with indistinct and irregular borders. Nuclei are ovoid to fusiform, have coarse chromatin and one or two small, rounded nucleoli. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 3 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. Cytologic diagnosis was simple carcinoma. At the center is a cluster of epithelial cells in an acinar-like structure with a central pink secretory product. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 4 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. Cytologic diagnosis was simple carcinoma. Pleomorphic epithelium predominates. Multiple criteria of malignancy are observed, including high N:C ratio, anisokaryosis, macrokaryosis, nuclear molding, anisonucleosis. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 5 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as complex carcinoma. Note the myoepithelial cells arranged in nests. The stellate-shaped cells constituted the nest core. They have small-condensed nuclei and scant amounts of cytoplasm. There are swirls of a fine, pale pink extracellular matrix around them. Diff-Quik[®], 20X.

Fig. 6 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as a complex carcinoma. Note isolated myoepithelial cells. There are several free nuclei, and a few intact cells. They are spindle, have ovoid to cigar-shaped nuclei with scant amounts of pale blue cytoplasm. Cytoplasmic margins are distinct and wispy. Diff-Quik[®], 20X.

Fig. 7 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as complex carcinoma. There were epithelial and myoepithelial cells. Bright pale-pink, fibrillar or flocculent extracellular matrix was seen associated or not with the nests of myoepithelial cells. In the center is a bright pale-pink flocculent matrix. This tumor was diagnosed on histology as malignant mixed tumor due to the presence of well-differentiated cartilage that was not found on cytologic preparations. Diff-Quik[®], 20X.

Fig. 8 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was diagnosed as malignant mixed tumor. Note there is abundant magenta extracellular matrix surrounded nests of myoepithelial cells, as well as large pools in the background. Diff-Quik[®], 10X.

Fig. 9 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as malignant mixed tumor. Note the fibrillar pink matrix in the

center. This tumor was diagnosed on histology as carcinosarcoma due to neoplastic chondrocytes. Chondrocytes were not found on cytologic evaluation of the specimen. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 10 Aspirate of a mammary gland tumor from a dog. Benign mixed tumor. The sample is moderately cellular and there is abundant deeply eosinophilic material filling the background (mixoid matrix). Diff-Quik[®], 10X.

Fig. 11 Aspirate of a mammary gland tumor from a dog. Carcinosarcoma. The sample is highly cellular. Neoplastic cells are epithelial and mesenchymal. One neoplastic chondrocyte is shown in the center. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 12 Aspirate of a mammary gland tumor from a dog. Osteosarcoma. Multiple criteria of malignancy are observed, including prominent and multiple nucleoli, anisonucleosis, anisocytosis, anisokaryosis. Neoplastic cells are large, ovoid to flame-shaped, have coarse chromatin clumping and prominent nucleoli. They have eccentric and rounded nucleus and moderate amounts of deeply basophilic cytoplasm. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 13 Aspirate of a mammary gland tumor from a dog. Squamous cell carcinoma. Cells are highly pleomorphic exhibiting multiples criteria of malignancy, including anisonucleosis, macronucleosis, anisocytosis, anisokaryosis, high N:C ratio, multinucleation. Many early stages of maturation have keratinized cytoplasm suggesting dysplastic development. Diff-Quik[®], 40X.

Fig. 14 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as malignant mixed tumor. Note the large lake of extracellular magenta matrix in the center (osteoid/condroid). This tumor was diagnosed on histology as complex carcinoma. Diff-Quik[®], 10X.

Fig. 15 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. This sample was interpreted as malignant mixed tumor. Nests of myoepithelial cells are noted in the upper center, and osteoid/condroid matrix is below. This tumor was diagnosed on histology as simple carcinoma were epithelial component only was present. Diff-Quik[®], 10X.

Fig. 16 Fine needle aspirate specimen of a mammary gland tumor from a dog. Cytologic diagnosis was complex carcinoma. In the center is a large agglomerate of myoepithelial cells surrounded by pale pink extracellular matrix. In the upper left is neoplastic epithelium. This sample was diagnosed as simple carcinoma on histopathology. Diff-Quik[®], 20X.

Table legends

Tab. 1 Comparison of cytologic and histopathologic diagnosis for the differentiation of benign and malignant in canine mammary tumors (n=101).

Tab. 2 Comparison of cytologic and histopathologic results for 101 canine mammary tumors.

Tab. 3 Summary of the published studies on cytologic evaluation of mammary tumors in dogs.

Figures

Figure 1.

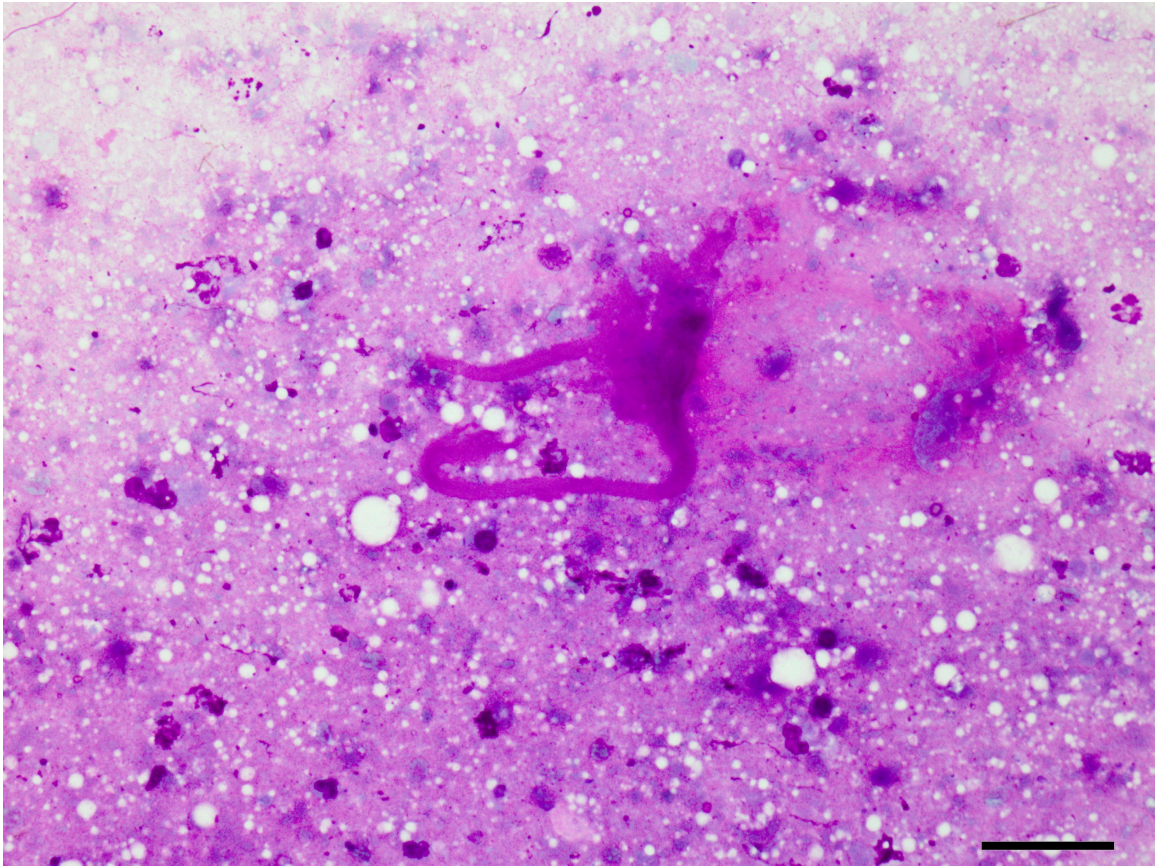


Figure 2.

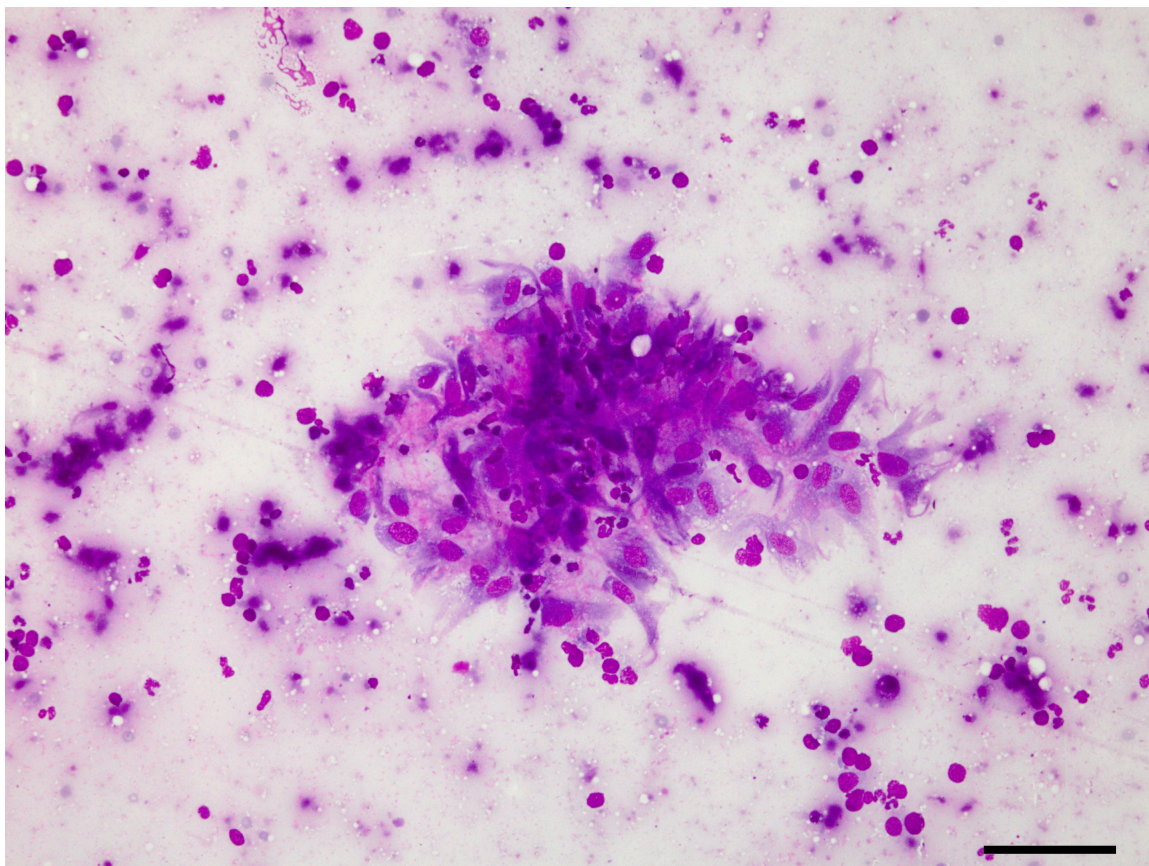


Figure 3.

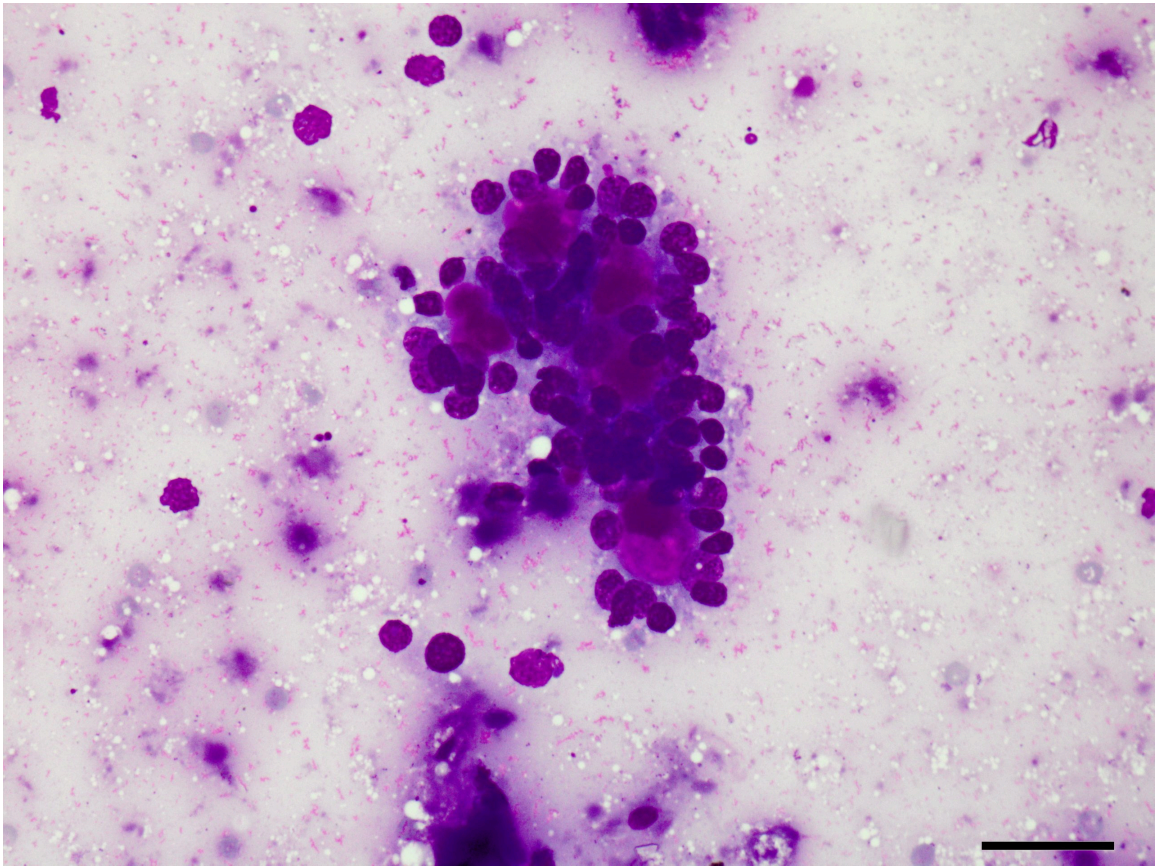


Figure 4.

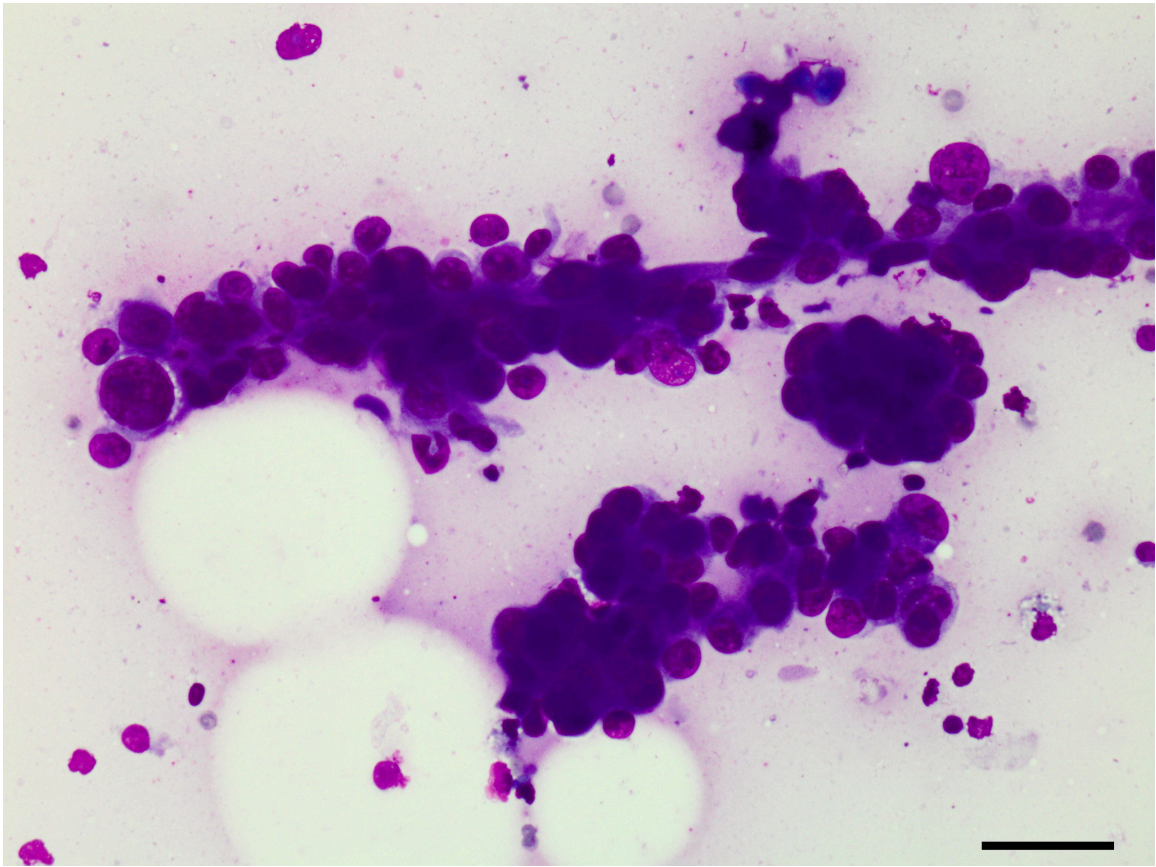


Figure 5.

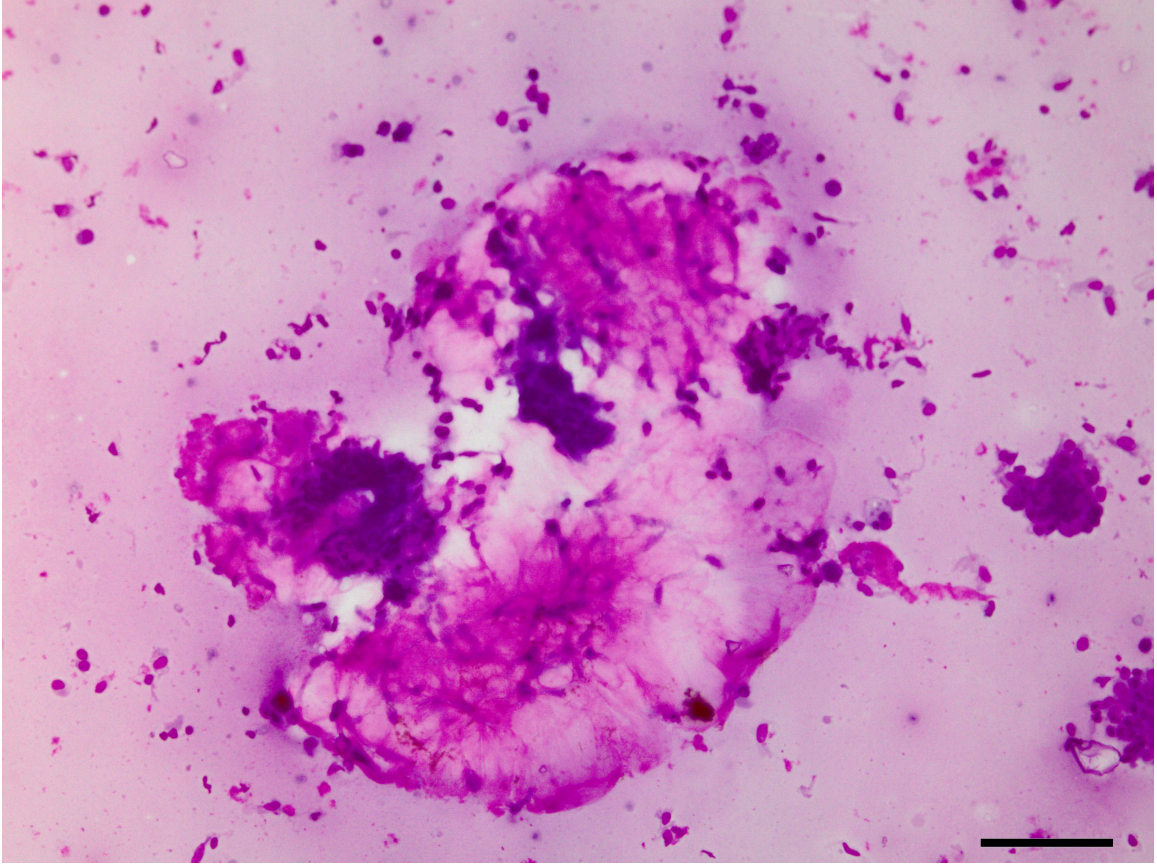


Figure 6.

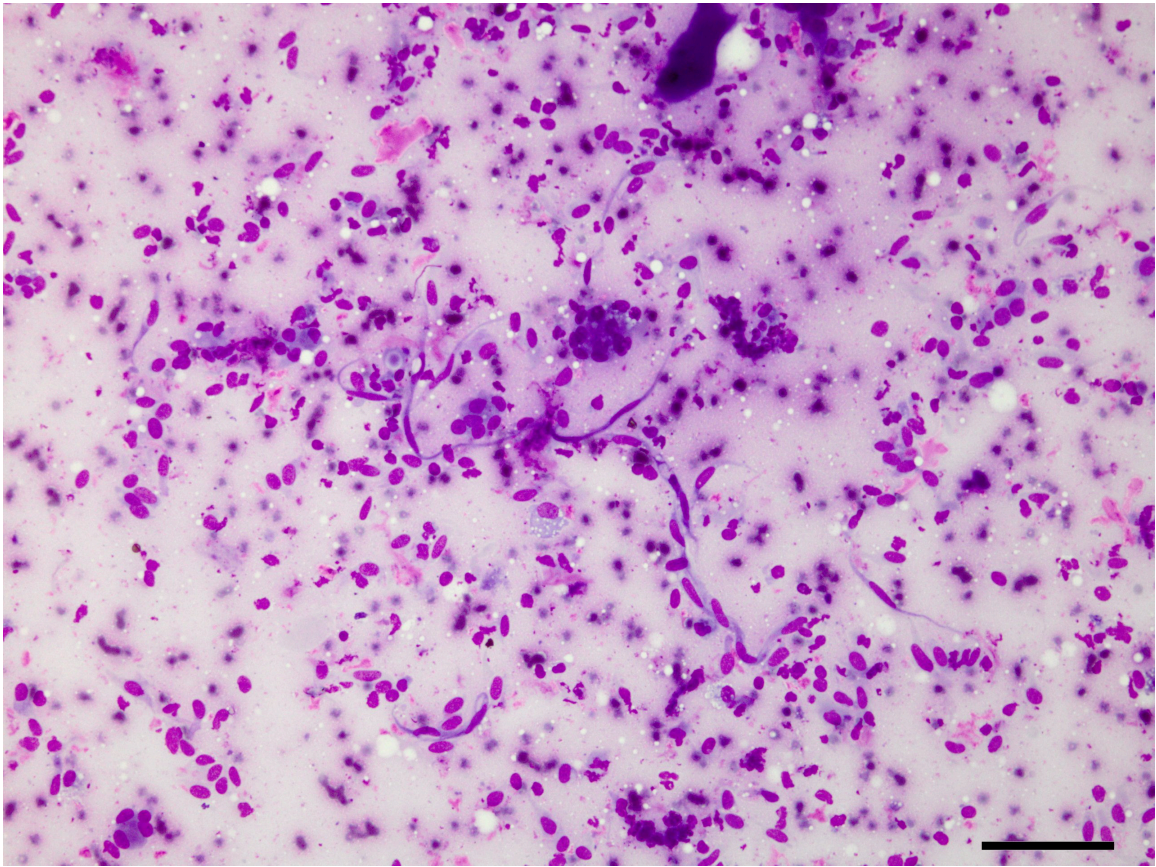


Figure 7.

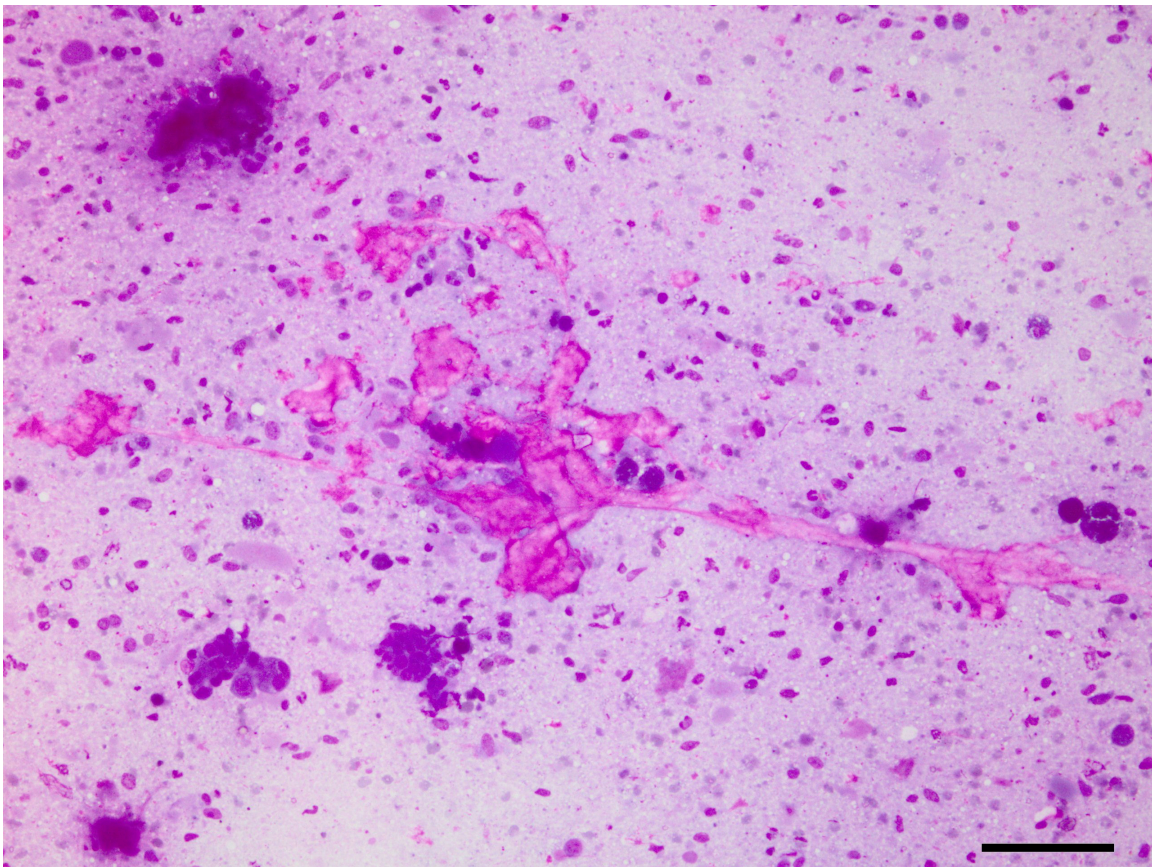


Figure 8.

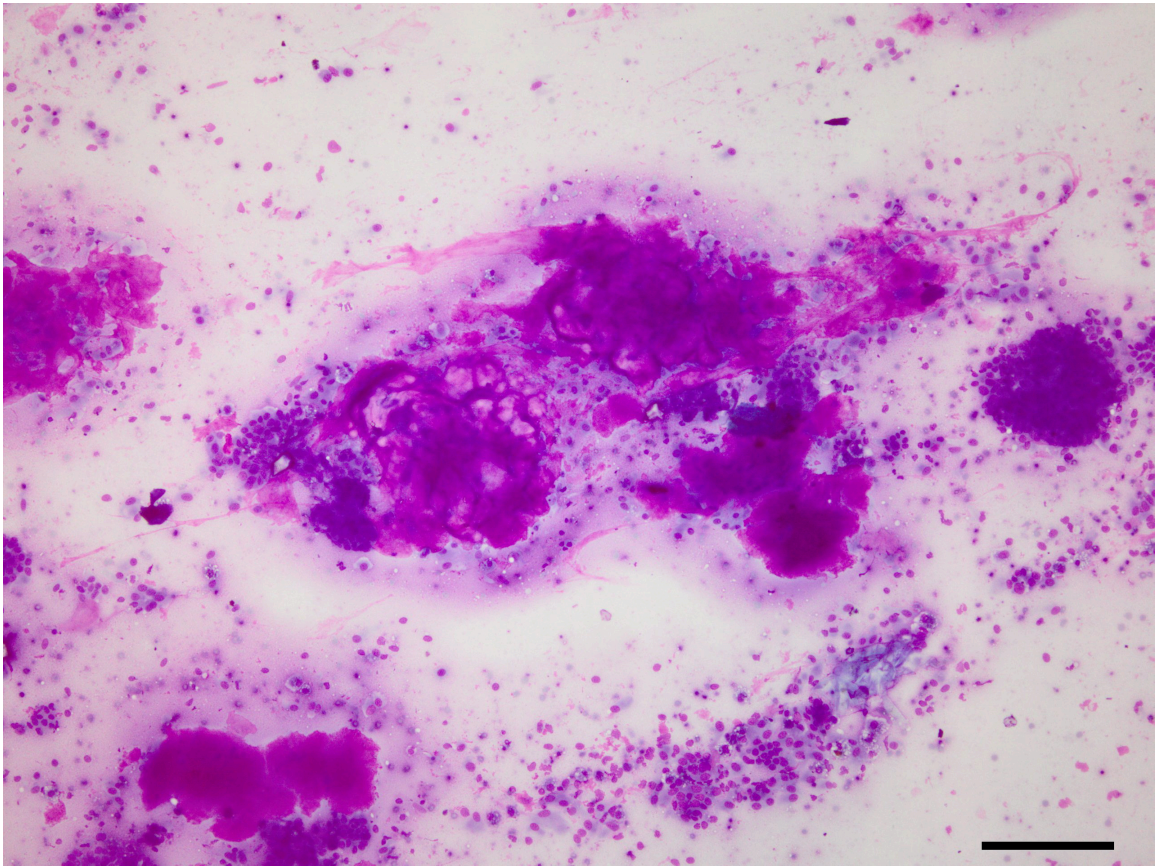


Figure 9.

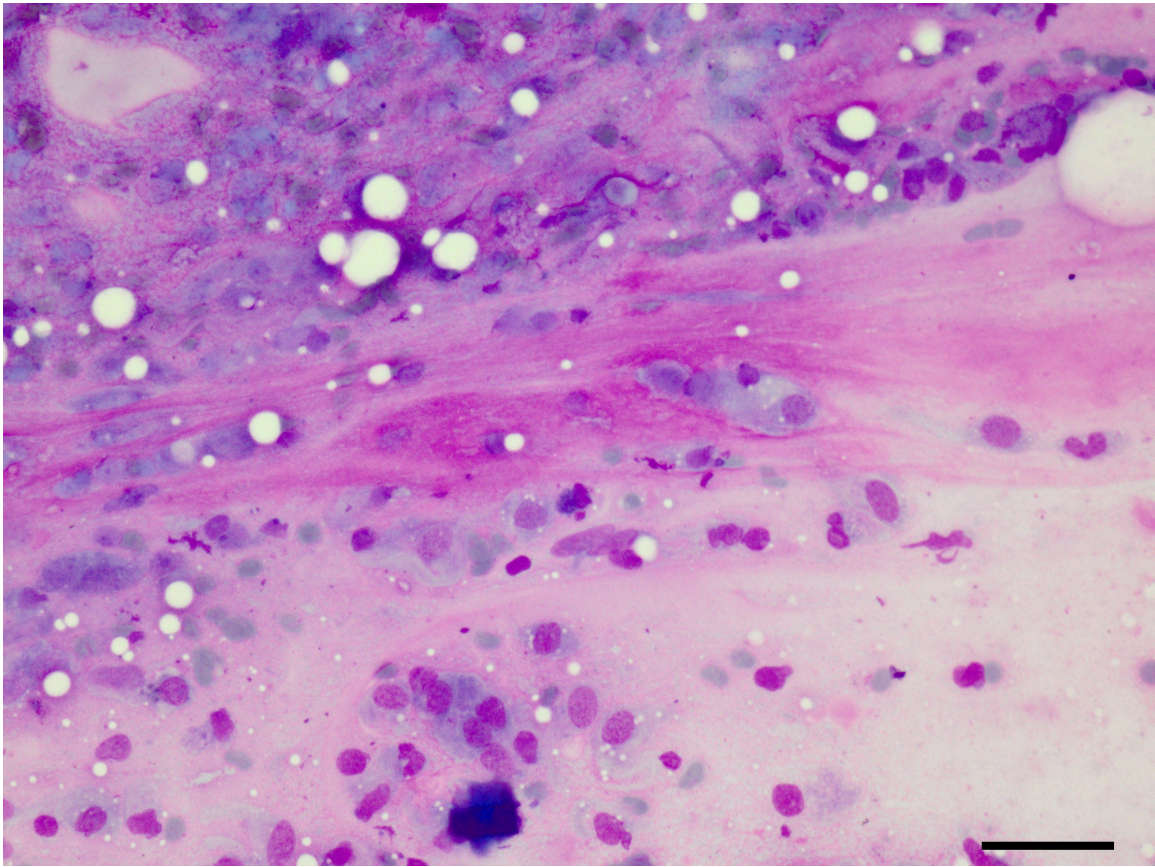


Figure 10.

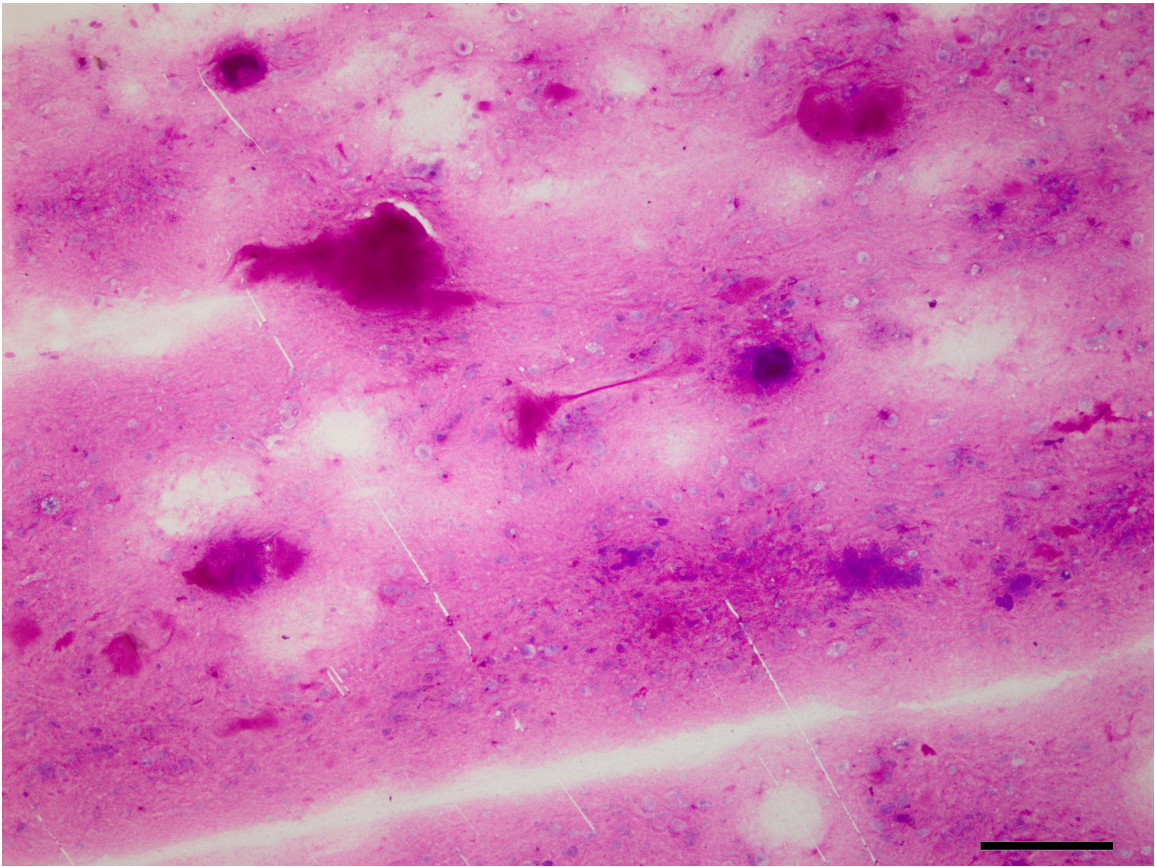


Figure 11.

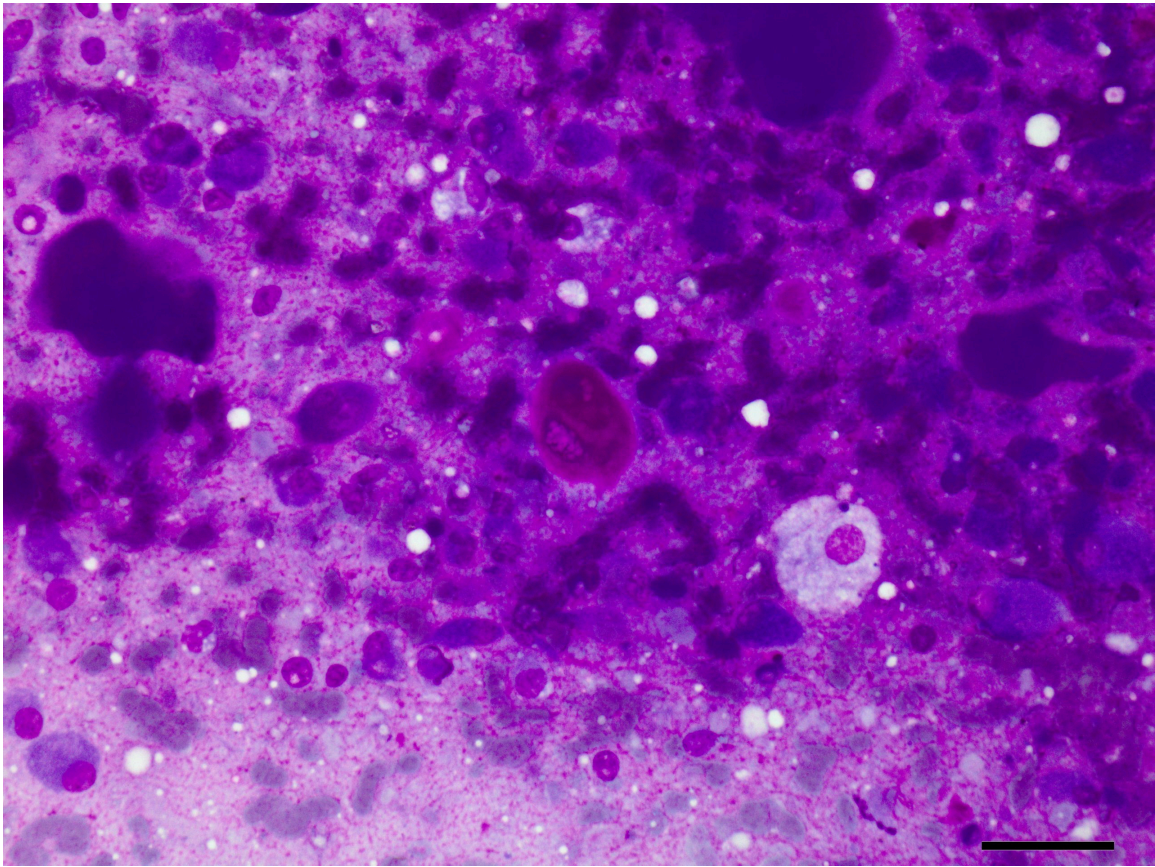


Figure 12.

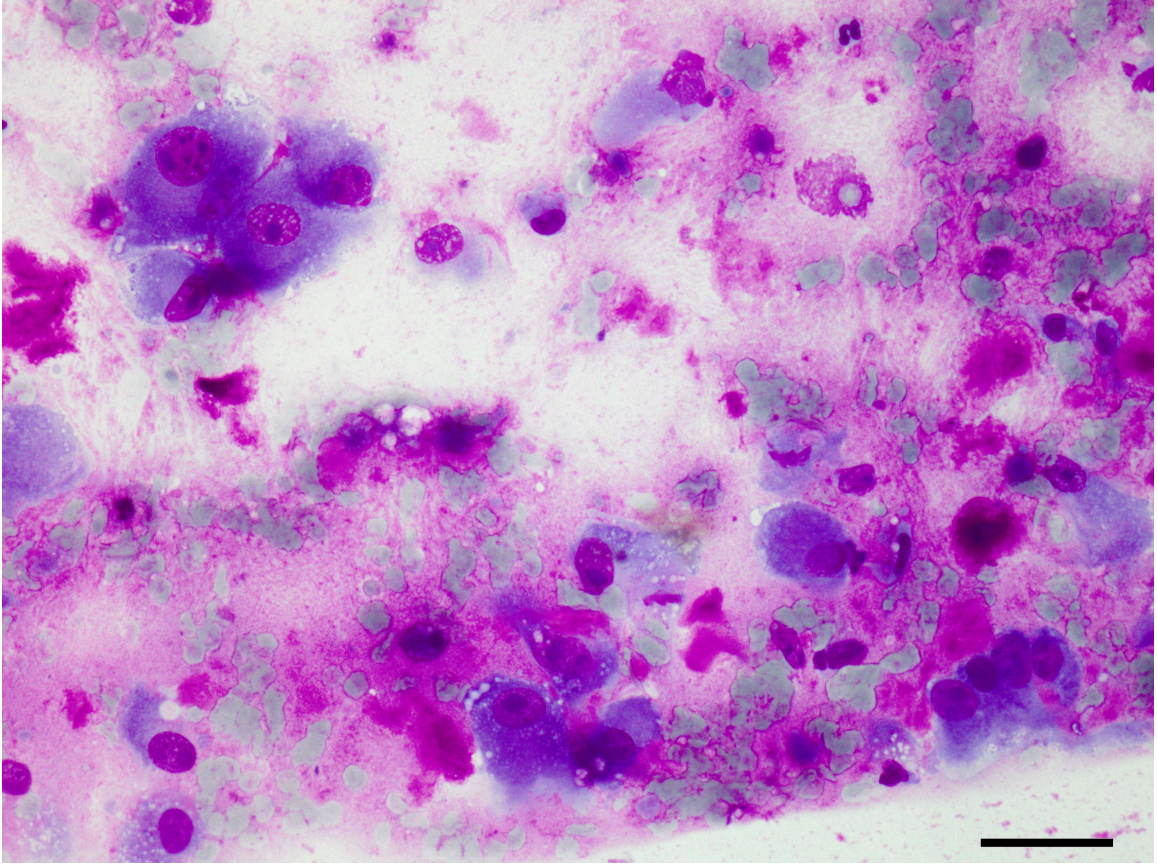


Figure 13

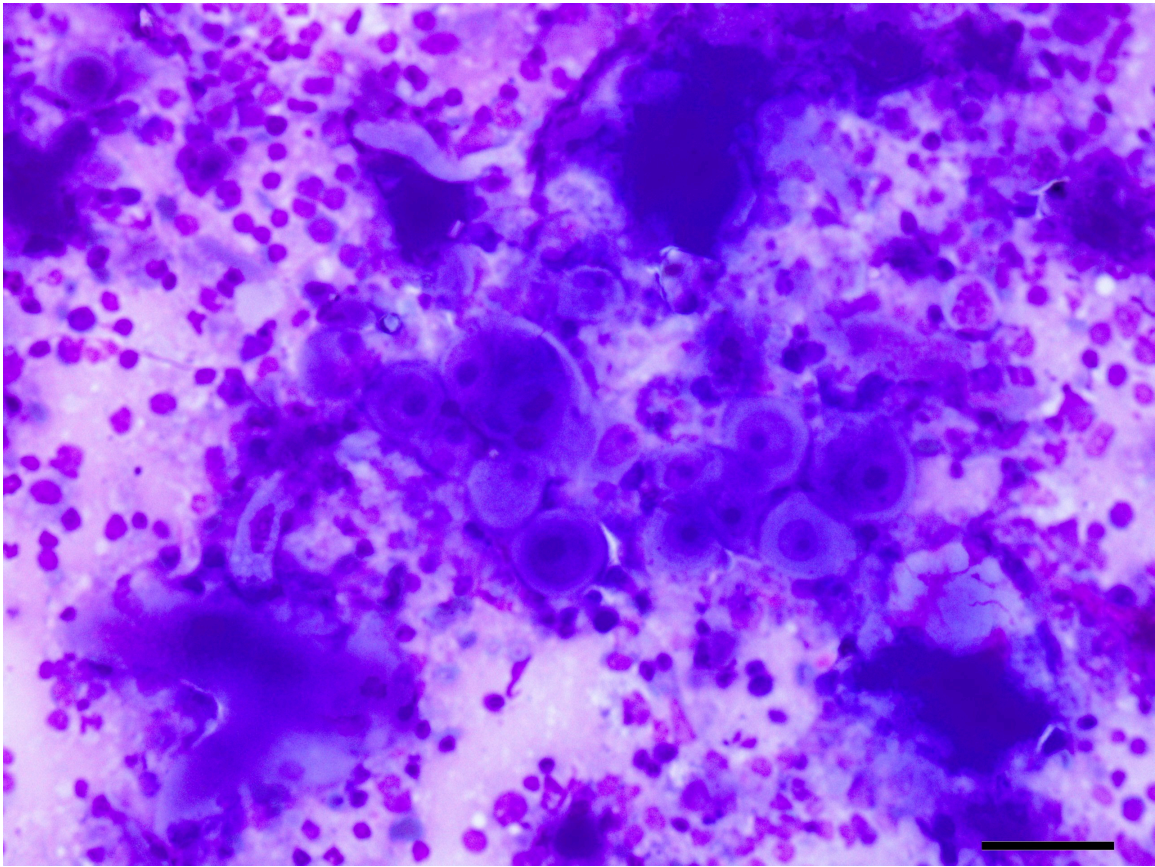


Figure 14.

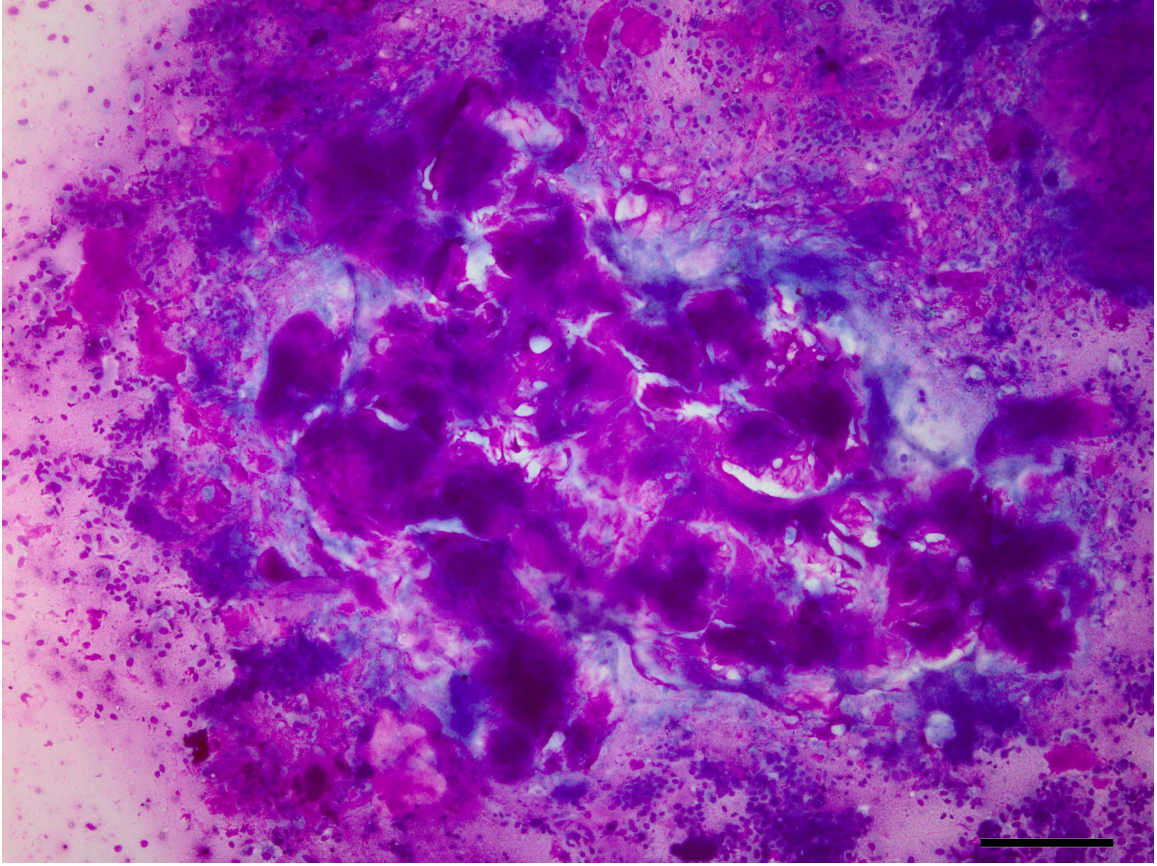


Figure 15.

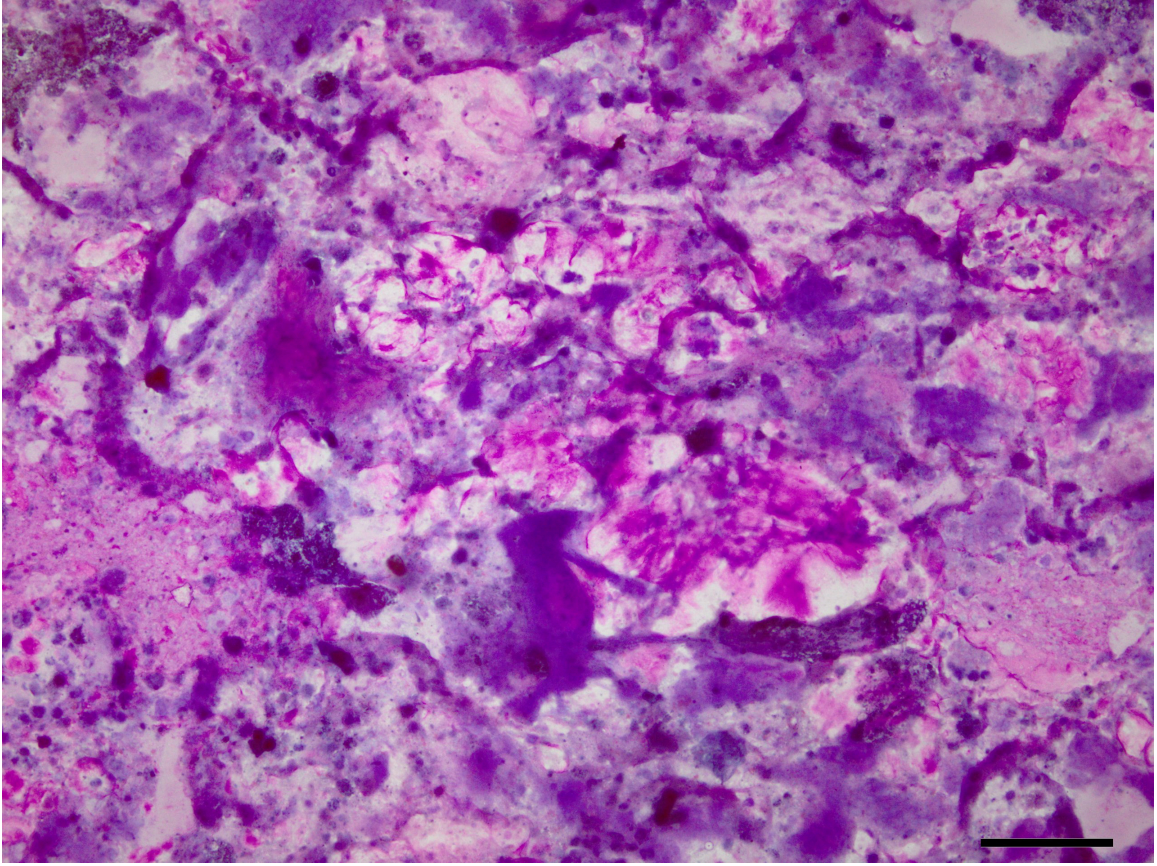
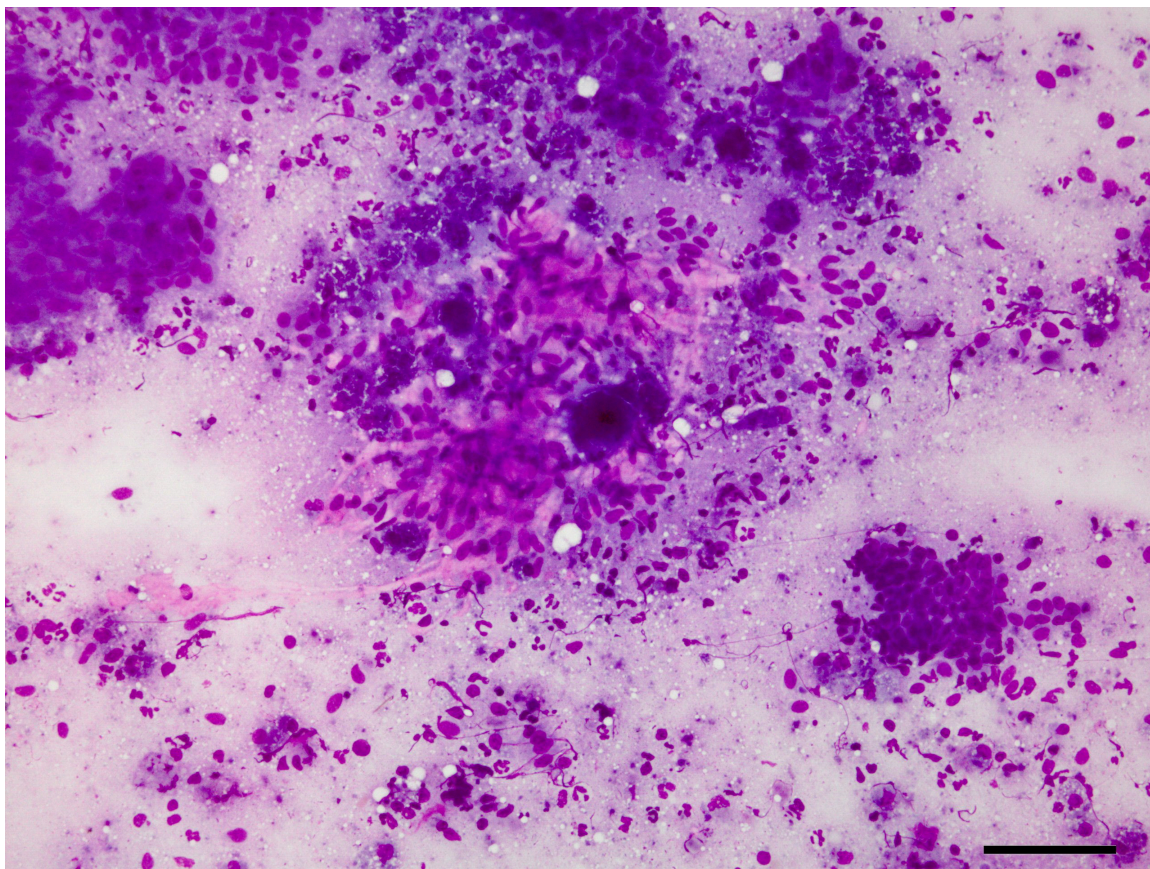


Figure 16.



Tables

Table 1.

Cytologic diagnosis	Histopathologic diagnosis		
	Benign	Malignant	Total
Benign	5	0	5
Malignant	1	95	96
Total	6	95	101

Table 2.

Cytologic diagnosis	n	Histopathologic diagnosis
Simple carcinoma	52	37 Simple carcinoma
		8 Complex carcinoma
		5 Malignant mixed tumor
		1 Carcinosarcoma
		1 Benign mixed tumor
Complex carcinoma	20	11 Complex carcinoma
		2 Simple carcinoma
		3 Malignant mixed tumor
		3 Carcinosarcoma
		1 Fibrosarcoma
Malignant mixed tumor	17	12 Malignant mixed tumor
		1 Simple carcinoma
		4 Carcinosarcoma
Carcinosarcoma	4	3 Carcinosarcoma
		1 Malignant mixed tumor
Complex adenoma	2	2 Complex adenoma
Benign mixed tumor	3	3 Benign mixed tumor
Osteosarcoma	2	2 Osteosarcoma
Squamous cell carcinoma	1	1 Squamous cell carcinoma

Table 3.

Reference	No of tumors	Inadequate samples %	Sensitivity %	Specificity %	Diagnostic accuracy %
Griffiths <i>et al.</i> (1984)	19	-	-	-	42
Allen <i>et al.</i> (1986)	75	17.6	21	55.5	25
Hellmen e Lindgren (1989)	84	11	65	94	79
Zuccari <i>et al.</i> (2001)	35	-	73	83	63
Simeonov e Stoikov (2006)	70	-	-	-	81.4
Rocha e Tostes (2006)	71	9.86	-	-	80
Cassali <i>et al.</i> (2007)	77	24.7	100	88.6	92.2
Simon <i>et al.</i> (2009)	50	14	88	96	93
Haziroglu <i>et al.</i> (2010)	31	10.4	-	-	88.5
Sangha <i>et al.</i> (2011)	23	-	87.5	85.7	70
Sontas <i>et al.</i> (2012)	90	27.7	96.2	100	96.5

CAPÍTULO 4 – ARTIGO CIENTÍFICO 2

Os resultados desta Tese estão apresentados na forma de manuscrito científico, com sua formatação de acordo com as normas do periódico ao qual foi aceito:

Veterinary Clinical Pathology
ISSN: 1939-165X

WHAT IS YOUR DIAGNOSIS: LIVER FROM A COW

Mauren P. Emanuelli, Alfredo Q. Antoniazzi, Marcelo S. Cecim, Rafael A. Fighera.

Data de aceite: 17 de outubro de 2015

What is your diagnosis? Liver from a cow

Mauren P. Emanuelli¹, Alfredo Q. Antoniazzi², Marcelo S. Cecim², Rafael A. Fighera³

Department of ¹Small Animal Clinical Sciences, ²Large Animal Clinical Sciences and ³Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence

Dr. Alfredo Q. Antoniazzi, Department of Large Animal Clinical Sciences Av. Roraima 1000, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

E-mail: alfredo.antoniazzi@ufsm.br

Case Presentation

A 10-year-old Aberdeen Angus cow was presented to the Large Animal Medicine Service at Federal University of Santa Maria Veterinary Hospital with a history of weight loss for the past 6 months, watery diarrhea for the last 30 days, tenesmus and fever. The owner reported the presence of *Senecio brasiliensis* and described ten cattle deaths on his property during the past four years with the cattle demonstrating similar antemortem clinical signs. On physical exam, the cow was dehydrated and mildly febrile (101.7°F) with pale mucosae. A moderate mature neutrophilia was noted on the CBC (17,300 cells/ μ L, reference interval (RI) 4,000 – 12,000). The biochemical serum panel revealed hypoalbuminemia (2.79 g/dL, RI 3.30 – 3.55), decreased AST activity (36 IU/L, RI 78 – 132),

increased GGT activity (39.98 IU/L, RI 6.10 – 17.40), and decreased urea concentration (35.33 mg/dL, RI 42.80 – 64.20). An aspirate of the liver was submitted for cytologic evaluation (Figure 1), and liver biopsy was collected and routinely processed for histopathology.

Cytologic Interpretation: Hepatic megalocytosis.

The cytologic sample was of low cellularity and contained hepatocytes arranged individually and in small cohesive clusters. Hepatocytes were round to polygonal with a centrally placed, round to slightly oval nucleus with coarse chromatin and inconspicuous nucleoli. Cytoplasm was moderate to abundant, and intensely eosinophilic with a finely granular bluish appearance. Markedly enlarged hepatocytes (megalocytes) were noted admixed with normal sized hepatocytes (Figure 1). Anisokariosis was marked with megalocytes presenting larger nuclei (36 μ m in diameter) than normal hepatocytes (18 μ m in diameter). The background contained abundant blood. A presumptive diagnosis of seneciosis was made based on history, clinical signs, increased serum activity of GGT, hypoalbuminemia and the presence of megalocytosis on liver cytology.

Liver biopsy evaluation was performed concurrently and confirmed the diagnosis. On histologic examination, there was disruption of hepatic architecture, with abundant connective tissue and fibroblasts replacing cords and lobules. There was biliary hyperplasia, characterized by marked bile duct proliferation, diffuse fibrosis and numerous megalocytes mainly in periportal areas (Figure 2). The morphologic diagnosis was biliary hyperplasia, fibrosis and megalocytosis, consistent with pyrrolizidine alkaloid (PA) toxicosis.

Discussion

Seneciosis is caused by the ingestion of *Senecio* spp. plants, which contain PA. These alkaloids have antimetabolic effects on hepatocytes that prevent cell division but not DNA synthesis, so the nucleus enlarges while cytoplasm increases in volume, resulting in megalocytes, the main histologic lesion (Cullen, 2007). On the anatomopathologic diagnosis of bovine chronic liver disease, megalocytosis is a typical finding on PA toxicosis⁵. Some plants in Brazil have PA, such as *Senecio*, *Echium* and *Crotalaria*. For this reason, the diagnosis is based on epidemiological findings. In southern Brazil, the only plant presenting PA which causes enzootic toxicosis is *Senecio* (Rissi *et al.*, 2007). Aflatoxicosis differential diagnosis must be done if animals consume concentrate. However, this toxicosis is rare in bovine, because they are resistant to aflatoxins (Pierezan *et al.*, 2010). *Senecio brasilienses* poisoning is the main cause of death in adult cattle in the southern Brazil (Rissi *et al.*, 2007). Liver biopsy evaluation is considered the optimal test for diagnosis of seneciosis (Craig *et al.*, 1991; Barros *et al.*, 2007). In most cases, it is simple and safe, however tissue processing is time consuming, thus impairing a rapid clinical decision. The cytologic findings of fine needle aspiration (FNA) from the liver have not yet been reported for the diagnosis of seneciosis. Here, we demonstrate correlation between the cytologic and histologic findings and indicate a possible use of FNA for the rapid diagnosis of seneciosis.

Key Words: seneciosis, liver cytology, cattle disease, plant poisoning

References

- 1 Barros CSL, Castilhos LML, Rissi DR, Kommers GD, Rech RR: Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. [Liver biopsy for the diagnosis of *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in cattle.] *Pesq Vet Bras* 2007;27:53-60.
- 2 Craig AM, Pearson EG, Meyer C, Schmitz JA: Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. *Am J Vet Res* 1991;52(12):1969-1978.
- 3 Cullen JM: Liver, Biliary System, and Exocrine Pancreas. In: McGavin MD, Zachary JF, eds. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2007: 393-461.
- 4 Pierezan F, Oliveira JC, Carmo PM, Lucena RB, Rissi DR, Togni M, et al.: Outbreak of aflatoxicosis in calves in southern Brazil. *Pesq Vet Bras* 2010;30(5):418-422.
- 5 Rissi DR, Rech RR, Pierezan F, Gabriel AL, Trost ME, Brum JS, et al.: Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. [Plant and plant-associated mycotoxins poisoning in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil: 461 cases.]. *Pesq Vet Bras* 2007;27:261-268.

Figure legends

Figure 1. Fine needle aspirate (FNA) of liver from a cow. Diff-Quik[®], x40 objective.

Figure 2. Histologic section of liver from a cow. Areas of biliary hyperplasia, fibrous connective tissue and a megalocyte (arrow). H&E, x40 objective.

Figure 1.

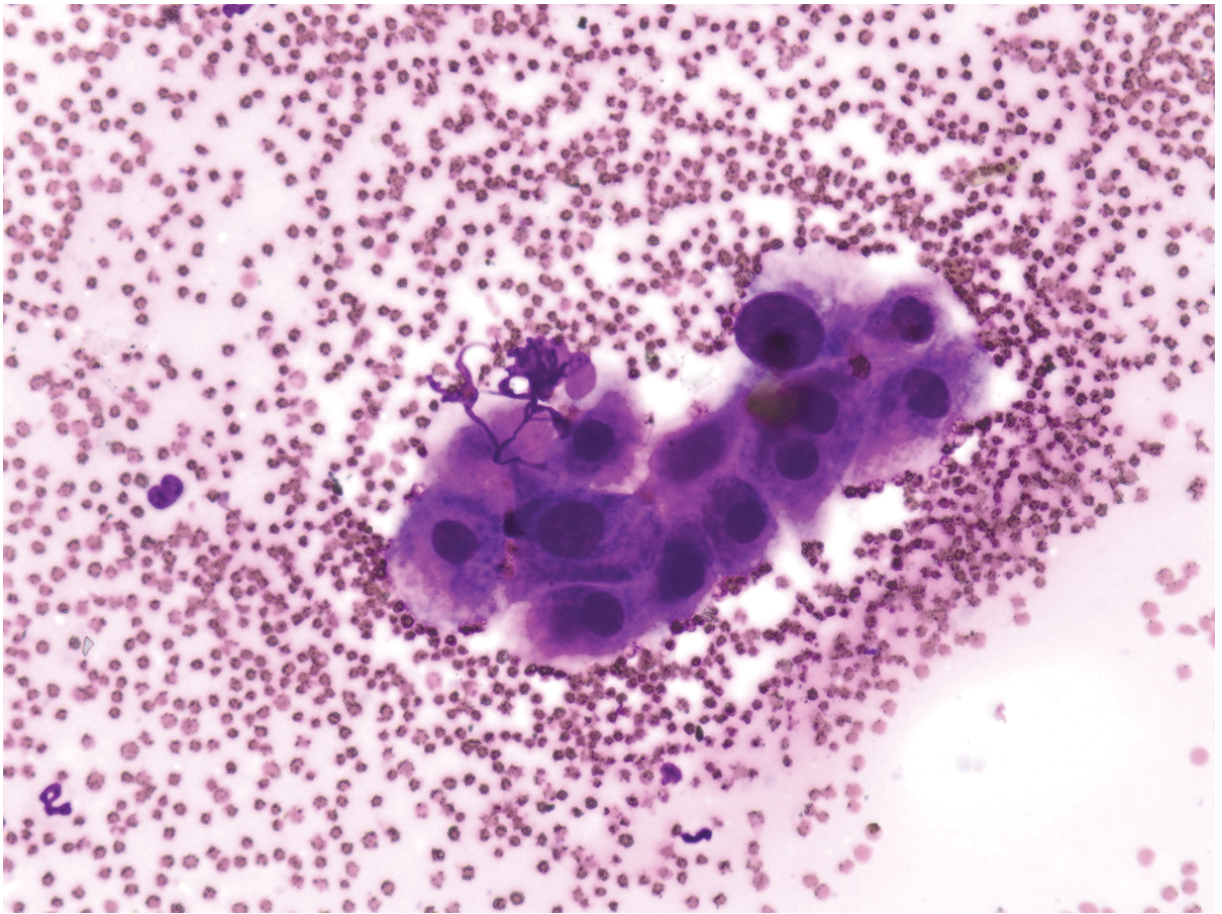
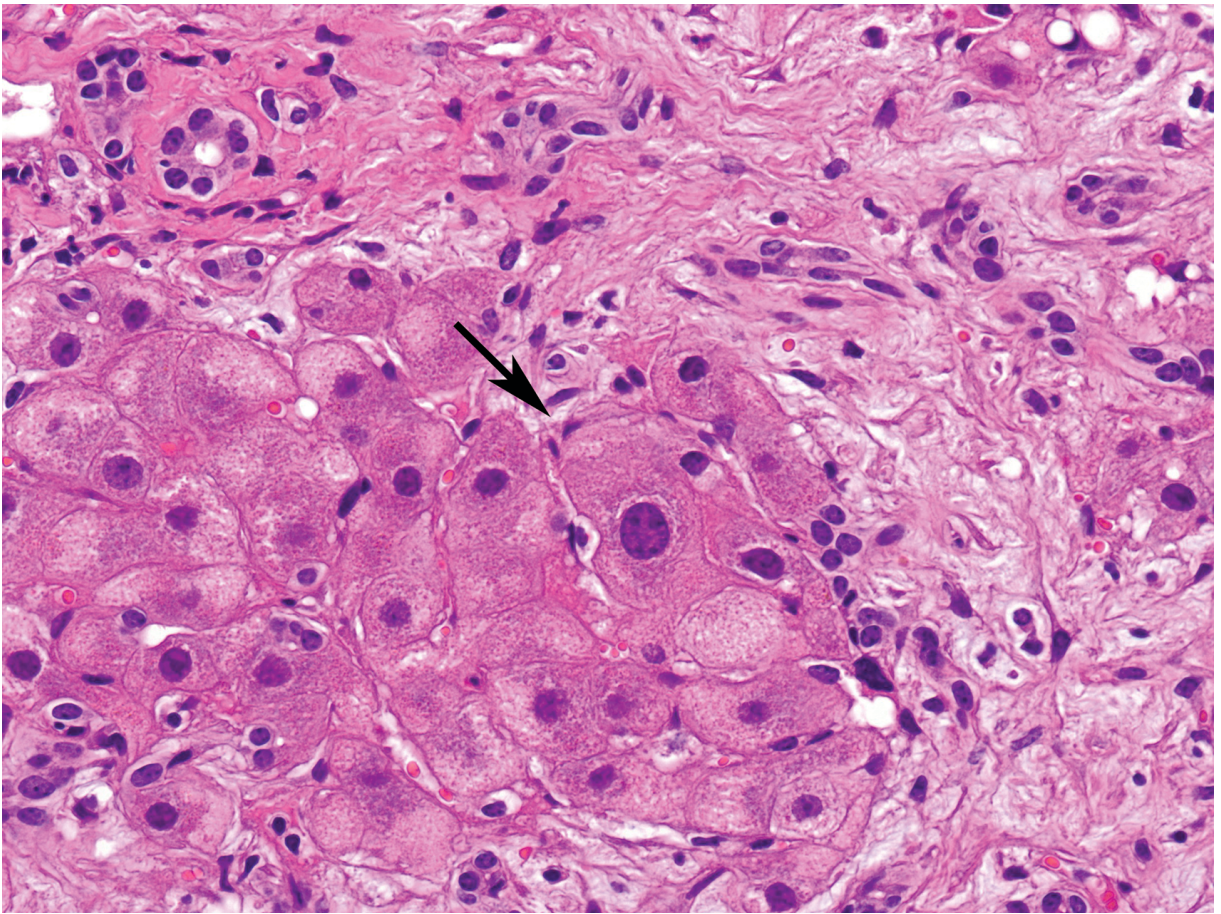


Figure 2.



CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

Em medicina veterinária, assim como em medicina humana, a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é amplamente aceita como opção no diagnóstico inicial de várias doenças (Sharkey e Wellman, 2011). Por ser um método rápido, minimamente invasivo e com baixo custo permite ao clínico o diagnóstico precoce para a rápida decisão acerca da conduta terapêutica (Ventura *et al.*, 2012).

No caso de tumores mamários em cadelas ainda há certa resistência com relação ao valor diagnóstico da CAAF, e o clínico, muitas vezes, opta pela avaliação histopatológica (Magalhães *et al.*, 2001). A identificação de elementos citológicos que permitam maior acurácia diagnóstica pode propiciar maior confiabilidade aos clínicos na utilização deste teste diagnóstico, e a carência na literatura de tais informações motivou a realização do primeiro artigo. Nosso estudo apresentou sensibilidade de 100% para o diagnóstico de neoplasias mamárias malignas em cadelas, dados semelhantes foram apresentados por Cassali *et al.* (2007) demonstrando a eficiência da CAAF como teste de triagem. Como descrito por Cassali *et al.* (2011) e Cassali *et al.* (2012) a presença de uma matriz mixoide sugeriu neoplasia mista, já que nenhum tumor complexo apresentou este tipo de matriz. A diferenciação entre células mesenquimais e células mioepiteliais permitiu diferenciar carcinoma simples com reação desmoplásica de tumores complexos e mistos.

O segundo artigo surgiu do grande interesse em aplicar a CAAF na clínica médica de grandes animais, e mais ainda no diagnóstico precoce de seneciose. A ausência total de achados citológicos nesta doença descritos na literatura motivou o estudo. Os achados citopatológicos tiveram boa correlação com a histopatologia, considerada padrão-ouro para o diagnóstico desta enfermidade (Craig *et al.*, 1991; Barros *et al.*, 2007), sendo assim a utilização da CAAF pode ser considerada um método válido e promissor para o diagnóstico de seneciose.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

- A citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) é um método válido para o diagnóstico de tumores mamários malignos em cadelas;
- Nos tumores mamários benignos informações sobre idade do paciente, histórico reprodutivo e aparência macroscópica podem auxiliar na interpretação da amostra citológica e assim evitar falso positivo;
- Carcinomas simples são eficientemente diagnosticados pela CAAF;
- A identificação de matriz condroide/osteóide e mixóide auxilia na diferenciação de tumores mistos de complexos;
- Células mioepiteliais foram encontradas em tumores complexos e mistos, portanto a presença delas não auxilia na diferenciação destes dois tumores;
- A distinção entre células mesenquimais (prováveis fibroblastos) e células mioepiteliais permite diferenciar carcinomas simples com reação desmoplásica de tumores complexos e mistos;
- A CAAF mostrou-se eficiente no diagnóstico de seneciose em bovinos;
- Os achados citopatológicos do fígado bovino na seneciose foram compatíveis com os encontrados na histopatologia.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMAN, A. R.; BAIN, P. J. Diagnosing neoplasia: the cytologic criteria for malignancy. **Veterinary Medicine**, v. 95, n. 3, p. 204-223, 2000.

ALLEN, A. C. So-called mixed tumors of the mammary gland of dog and man with special reference to the general problem of cartilage and bone formation. **Archives of Pathology**, v. 29, n. 5, p. 589-624, 1940.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologie Differentiation of Benign from Malignant Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 6, p. 649-655, 1986. Disponível em: < <http://vet.sagepub.com/content/23/6/649.abstract> >.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Color Atlas of Veterinary Histology**. 2nd ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 318 p.

BANKS, W. J. **Applied Veterinary Histology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

BARROS, C. L. S.; METZDORF, L. L.; PEIXOTO, P. V. Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* spp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 101-107, 1987.

BARROS, C. S. L. et al. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em bovinos. [Liver biopsy for the diagnosis of *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) poisoning in cattle.] **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 53-60, 2007. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007000100010&nrm=iso >.

BEHA, G. et al. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase. **The Scientific World Journal**, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919300> <http://downloads.hindawi.com/journals/tswj/2012/252034.pdf> >.

BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 5, p. 423-36, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490210> >.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Immunohistochemical expression of p63 and deltaNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 3, p. 407-15, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176510> <http://vet.sagepub.com/content/46/3/407.full.pdf> >.

BOHN, A. A.; CALLAN, R. J. Cytology in food animal practice. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 23, n. 3, p. 36, 2007.

BORGE, K. S.; BORRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 9, n. 4, p. 241-50, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077404> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2010.00250.x/abstract> >.

BRAGA, M. M.; CASTILHOS, L. M. L.; SANTOS, M. N. Biopsia hepática em bovinos: Proposta de nova técnica. **Ciência Rural**, v. 15, n. 1, p. 79-88, 1985.

BRAUN, U.; PUSTERIA, N.; WILD, K. Ultrasonographic findings in 11 cows with a hepatic abscess. **Vet Rec**, v. 137, n. 12, p. 6, 1995.

BULL, L. B.; CULVENOR, C. C. J.; DICK, A. T. **The pirrolizidine alkaloids. Their chemistry, pathogenicity and other biological properties.** Amsterdam: North-Holland, 1968.

CARVALHO, G. S. T.; MAUGE, G. C. Ação tóxica do *Senecio brasiliensis* Lessing Fam. Compositae. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da USP**, v. 3, n. 3, p. 131-136, 1946.

CASSALI, G. D. Patologia da Glândula Mamária. In: NASCIMENTO, E. F. e LIMA, R. S. (Ed.). **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.131-133.

CASSALI, G. D. et al. Canine mammary mixed tumours: a review. **Veterinary Medicine International**, v. 2012, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193497> <http://downloads.hindawi.com/journals/vmi/2012/274608.pdf> >.

CASSALI, G. D. et al. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs., 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009, São Paulo. WSAVA.

CASSALI, G. D. et al. Protocol for the examination of cytologic specimens obtained by fine needle aspiration biopsy (FNAB) of canine breast tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 4, p. 475-478, 1998.

CASSALI, G. D. et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v. 18, n. 3, p. 191-6, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573766> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x/abstract> >.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal Of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CHOI, Y. D. et al. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. **Acta Cytologica**, v. 48, n. 6,

p. 801-6, 2004. ISSN). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581165> >.

CHRISTOPHER, M. M. et al. 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**, v. 232, n. 5, p. 8, 2008.

CLARKE, C.; SANDLE, J.; LAKHANI, S. R. Myoepithelial Cells: Pathology, Cell Separation and Markers of Myoepithelial Differentiation. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 10, n. 3, p. 7, 2005.

CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 202-13, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124008> <http://vet.sagepub.com/content/47/2/202.full.pdf> >.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse**. 2 ed. St. Louis, Missouri: Mosby, 2002.

COWELL, R. L. et al. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 3rd. ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2008. 475.

CRAIG, A. M. et al. Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. **Am J Vet Res**, v. 52, n. 12, p. 1969-78, Dec 1991. ISSN 0002-9645 (Print) 0002-9645 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1686378> >.

CULLEN, J. M. Liver, Biliary System, and Exocrine Pancreas. In: MCGAVIN, M. D. e ZACHARY, J. F. (Ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007. cap. 8, p.393-461.

DESTEXHE, E. et al. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 30, n. 2, p. 146-54, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682367> >.

DEWAR, R. et al. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 422-9, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466356> >.

DONNAY, I. et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-94, 1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7486397> >.

DRIEMEIER, D.; BARROS, C. S. L.; PILATTI, C. Seneciose em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 10, n. 59, p. 23-30, 1991.

FOSTER, R. A. Female Reproductive Tract. In: MCGAVIN, M. D. Z., J.F. (Ed.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2007. cap. 18, p.1263-1315.

FU, P. P. et al. Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal plants and herbal dietary supplements. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, p. 400-415, 2007.

GAMA, A. et al. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 4, p. 412-20, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824513> <http://vet.sagepub.com/content/40/4/412.full.pdf> >.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 1, p. 45-51, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264518> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023309000355> >.

GARTNER, F. et al. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. **Veterinary Journal**, v. 158, n. 1, p. 39-47, 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10409415> <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023398903331> >.

GHISLENI, G. et al. Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 1, p. 24-30, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511787> >.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-31, 2011. ISSN). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266722> <http://vet.sagepub.com/content/48/1/117.full.pdf> >.

GRANDI, F. et al. Sebaceous metaplasia in a canine mammary gland non-infiltrative carcinoma with myoepithelial component. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1230-3, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362808> <http://vdi.sagepub.com/content/23/6/1230.full.pdf> >.

GRECCO, F. B. et al. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por Senecio spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 389-397, 2010.

GRIFFITHS, G. L.; LUMSDEN, J. H.; VALLI, V. E. Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 13, n. 1, p. 13-7, 1984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311390> >.

HAZIROGLU, R. et al. Cytological Evaluation of canine mammary tumours with fine needle aspiration biopsy technique. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 161, n. 5, p. 212-218, 2010.

HELLMEN, E.; LINDGREN, A. The accuracy of cytology in diagnosis and DNA analysis of canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, n. 4, p. 443-50, 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2607016> >.

HOFF, B.; COTE, J.; STEEN, A. Fine Needle Aspiration and Liver Cytology - A Simple Method for Diagnosis and Prognosis of Fatty Liver in Cattle. **Bov Practitioner**, v. 30, p. 2, 1996.

ITOH, T. et al. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 345-7, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805744> >.

KARAM, F. C.; SCHILD, A. L.; MELLO, J. R. B. D. Intoxicação por Senecio spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 603-609, 2011. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000700010&nrm=iso >.

KARAM, F. S. C. et al. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 191-198, 2004. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2004000400004&nrm=iso >.

KINI, S. R. **Color Atlas of Differential Diagnosis in Exfoliative and Aspiration Cytopathology**. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

LI, N. et al. Hepatotoxicity and tumorigenicity induced by metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids in herbs. **Curr Drug Metab**, v. 12, n. 9, p. 823-34, Nov 2011. ISSN 1875-5453 (Electronic) 1389-2002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619520> >.

LUCENA, R. B. et al. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 428-434, 2010. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000500010&nrm=iso >.

MAGALHÃES, A. M. et al. Estudo comparativo entre citopatologia e histopatologia no diagnóstico de neoplasias caninas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 23-32, 2001. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2001000100006&nrm=iso >.

MEINKOTH, J. H.; COWELL, R. L. Recognition of basic cell types and criteria of malignancy. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 32, n. 6, p. 1209-35, v, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469493> >.

MENDEZ, M. C. Intoxicação por Senecio spp. In: RIET-CORREA, F.; MENDEZ, M. C., *et al* (Ed.). **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Pelotas: Hemisfério Sul do Brasil, 1993. p.340.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Intoxicação por Senecio Spp. (compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 51-56, 1987.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 4th. Ames: Iowa State Press, 2002. p.575-606.

MISDORP, W. *et al*. Histological Classification of the mammary tumors of the dog and cat. In: (Ed.). **World Health Organization. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals** Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, v.7, 1999. p.59.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility. Suppl**, v. 57, p. 439-43, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11787188> >.

MOLYNEUX, R. J. *et al*. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids from Riddell groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle. **Am J Vet Res**, v. 52, n. 1, p. 146-51, Jan 1991. ISSN 0002-9645 (Print) 0002-9645 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021243> >.

MONLUX, A. W. *et al*. Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. **Veterinary Pathology**, v. 14, n. 3, p. 194-217, 1977. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/196383> >.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J. E. (Ed.). **Tumors in Domestic Animals**. 3rd ed. London: University of California Press, 1990. p.518-552.

MOUMEN, M. *et al*. The mammary myoepithelial cell. **Int J Dev Biol**, v. 55, n. 7-9, p. 763-71, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948739> >.

MOURIQUAND, J. *et al*. Value of cytoprognostic classification in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 39, n. 5, p. 489-96, May 1986. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3722403> >.

OGAWA, Y. *et al*. Diagnostic potential and pitfalls of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for breast lesions. **Surgery Today**, v. 28, n. 2, p. 167-72, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525006> >.

OLIVEIRA FILHO, J. C. *et al*. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185, 2010. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000200014&nrm=iso >.

OWEN, L. N. **The TNM Classification of tumors in domestic animals**. 1. Geneva: World Health Organization, 1980.

PANDEY, P. R.; SAIDOU, J.; WATABE, K. Role of myoepithelial cells in breast tumor progression. **Front Biosci**, v. 1, n. 15, p. 10, 2010.

PEREZ ALENZA, D. et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 3, p. 132-9, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9595373> >.

PIEREZAN, F. et al. Outbreak of aflatoxicosis in calves in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 418-422, May 2010. ISSN 0100-736X. Disponível em: < <Go to ISI>://000280706800008 >.

PRACTICE, P. S. O. C. T. F. O. S. O. Guidelines of the Papanicolaou Society of Cytopathology for fine-needle aspiration procedure and reporting. **Diagn Cytopathol**, v. 17, n. 4, p. 239-47, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9316777>
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0339\(199710\)17:4%3C239::AID-DC1%3E3.0.CO;2-7/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0339(199710)17:4%3C239::AID-DC1%3E3.0.CO;2-7/abstract) >.

PULLEY, L. T. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 12, p. 1513-22, 1973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4357706> >.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. **Tumores Mamários Caninos: novas perspectivas**. Congresso de Ciências Veterinárias. Oeiras, Portugal: 183-190 p. 2002.

QUEIROGA, F. L. et al. Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumours. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 110, n. 1-2, p. 76-82, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367392>
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076008000356> >.

RAMOS-VARA, J. A.; AVERY, A. C.; AVERY, P. R. Advanced Diagnostic Techniques. In: (Ed.). **Canine and Feline Cytology - a color atlas and interpretation guide**. 2nd ed.: Saunders, 2010. cap. 17, p.395-437.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Canine and Feline Cytology - a color atlas and interpretation guide**. 2. Saunders, 2010. ISBN 978-1-4160-4985-2.

RIBAS, C. R. et al. Alterações Clínicas, Epidemiológicas, Citológicas, Histológicas e Estadiamento de Cães com Neoplasias Mamárias. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, 2012. ISSN 1517-784X. Disponível em: < <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/veterinary/article/view/24107> >.

RISSI, D. R. et al. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. [Plant and plant-associated mycotoxins poisoning in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil: 461 cases.]. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 261-268, 2007. ISSN 0100-736X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007000700002&nrm=iso >.

ROCHA, N. S.; TOSTES, R. A. DIAGNÓSTICO COMPARATIVO ENTRE CITOLOGIA ASPIRATIVA POR AGULHA FINA E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS. **Revistas Unoeste**, 2006. Disponível em: < <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/view/104/537> >.

ROTH, L. Comparison of liver cytology and biopsy diagnoses in dogs and cats: 56 cases. **Vet Clin Pathol**, v. 30, n. 1, p. 3, 2001.

SANGHA, S.; SINGH, A. **Cytopathology of Canine Mammary Gland Affections**. *Histopathology - Reviews and Recent Advances*: Intech 2012.

SANGHA, S. et al. Specificity and Sensitivity of Cytological Techniques for Rapid Diagnosis of Neoplastic and Non-neoplastic Lesions of Canine Mammary Gland. **Brazilian Journal Of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 1, p. 13-22, 2011.

SHARKEY, L. C.; WELLMAN, M. L. Diagnostic cytology in veterinary medicine: a comparative and evidence-based approach. **Clin Lab Med**, v. 31, n. 1, p. 18, 2011.

SIMEONOV, R. The accuracy of fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of canine skin and subcutaneous masses. **Comparative Clinical Pathology**, 2010.

SIMEONOV, R.; STOIKOV, D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 9, n. 3, p. 211-219, 2006.

SIMON, D. et al. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 521-8, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392751> <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1939-165X.2009.00150.x/asset/j.1939-165X.2009.00150.x.pdf?v=1&t=hykdagny&s=06d2fc8178bbc9df21ea7dc6954820db30d2f638> >.

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112-31, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645126> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x/abstract> >.

SONNENSCHNEIN, E. G. et al. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, n. 7, p. 694-703, 1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018024> >.

SONTAS, B. H. et al. Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 41, n. 1, 2009.

SONTAS, B. H. et al. Fine-needle aspiration biopsy of canine mammary gland tumours: a comparison between cytology and histopathology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. 125-30, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615802> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01810.x/abstract> >.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 3, p. 573-96, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12852237> >.

SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162-72, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691645> >.

TATEYAMA, S.; COTCHIN, E. Alkaline phosphatase reaction of canine mammary mixed tumours: a light and electron microscopic study. **Research in Veterinary Science**, v. 23, n. 3, p. 356-64, 1977. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/605302> >.

TATEYAMA, S. et al. Expression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 6, p. 703-9, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732805> >.

VENTURA, R. F. A.; COLODEL, M. M.; ROCHA, N. S. Exame citológico em medicina veterinária: estudo retrospectivo de 11.468 casos (1994-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1169-1173, 2012. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012001100016&nrm=iso >.

VOS, J. H. et al. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: benign mammary tumours and duct ectasias. **The Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 3, p. 89-95, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505510> <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1993.9694381> >.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Fifth. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013.

YAMAGAMI, T. et al. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 11, p. 1079-83, 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8959655> >.

YOSHIMURA, H. et al. Differences in Indicators of Malignancy Between Luminal Epithelial Cell Type and Myoepithelial Cell Type of Simple Solid Carcinoma in the Canine Mammary Gland. **Vet Pathol**, Jan 21 2014. ISSN 1544-2217 (Electronic) 0300-9858 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24448671> <http://vet.sagepub.com/content/early/2014/01/21/0300985813516637> >.

ZUCCARI, D. A. P. D. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001. Disponível em: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5917> >.