



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1- Resumen	2
2- Introducción	3
2.1- Indicaciones	3
2.2- Utilidades y limitaciones del diagnóstico citológico	4
2.3- Obtención de muestras citológicas	5
2.3.1- Consideraciones a tener en cuenta	8
2.4- Métodos de fijación, tinción y conservación de preparaciones citológicas	9
2.5- Problemas en la tinción	11
2.6- La citología en el diagnóstico del cáncer en pequeños animales	12
2.6.1- Tipos de lesiones tisulares	13
2.6.2- Consideraciones en la interpretación de una extensión citológica	19
3- Justificación y objetivos	20
4- Metodología	21
5- Resultados y discusión	22
6- Conclusiones	27
7- Valoración personal	28
8- Agradecimientos	28
9- Bibliografía	29

Anexo

Citopatología en el diagnóstico oncológico de pequeños animales

1- Resumen

Este trabajo trata sobre la técnica de la citología en veterinaria (indicaciones, toma de muestras, manejo de las muestras y diagnóstico) y se hace más hincapié en sus usos en la clínica de pequeños animales y, específicamente, en su utilidad para el diagnóstico de tumores.

Se ha llevado a cabo una revisión de informes citológicos y muestras que se han tomado en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza durante un año, del mes de Mayo de 2014 a Mayo de 2015. Se han observado al microscopio y se ha realizado un estudio de prevalencia sobre las diferentes lesiones encontradas (neoplasias, quistes, hiperplasias e inflamaciones).

Abstract: "Cytopathology in oncology diagnosis of small animals"

This work deals with the technique of cytology in veterinary (indication, sampling, sample handling and diagnostics) and focus more on their applications in small animal practice and, specifically, on its utility for the diagnosis of tumors.

Has conducted a review of cytological reports and samples that have been taken in the Veterinary Hospital of the University of Zaragoza for one year, from May of 2014 to May of 2015. They were observed under the microscope and has conducted a prevalence study of the different lesions found (tumor, cysts, hyperplasia and inflammation).

2- Introducción

La citología diagnóstica o citopatología se define como el estudio o evaluación morfológica de células aisladas o en grupos celulares que son extraídas de su contexto tisular con el fin de obtener una aproximación al diagnóstico o, el diagnóstico definitivo, de una lesión mediante diferentes técnicas de recolección.

El examen citológico es una herramienta de gran ayuda para el clínico ya que la mayoría de los tejidos pueden ser evaluados por citología e incluso permite planear el procedimiento quirúrgico en ciertas ocasiones si es necesario. La toma de muestras es rápida, sencilla, económica y, generalmente, sin riesgo para el paciente.

2.1- Indicaciones

Hay múltiples circunstancias en las que la citología puede ser útil (*Cigüenza del Ojo et. al., 2013*). Se debería realizar:

- Siempre que observemos la presencia de una masa en nuestro paciente, sea externa o accesible mediante punción ecoguiada.
- Ante anemias no regenerativas o cualquier citopenia o cambio morfológico que afecte a una o más de una serie celular está indicada la realización de un estudio de médula ósea.
- En cualquier paciente con linfadenomegalia, para obtener información sobre la causa de la misma.
- En caso de neoplasia en un linfonodo regional para evaluar presencia de metástasis incluso si no hay cambios en su tamaño.
- Ante alteraciones hepáticas o esplénicas sin causa conocida, tales como aumento de las enzimas hepáticas, hepatomegalia o esplenomegalia, alteraciones en la ecogenicidad de los órganos...
- Si se observa una masa abdominal de origen desconocido o alteraciones en algunos órganos como masas renales o renomegalia, alteraciones prostáticas como aumento de tamaño o alteraciones de ecogenicidad, ante alteraciones en la mucosa vesical, etc.
- En lesiones cutáneas, otitis y conjuntivitis, para determinar la presencia de agentes infecciosos y realizar un posterior seguimiento del tratamiento.
- Ante la presencia de derrames o cualquier otro líquido orgánico para poder determinar cambios patológicos en su composición que permitan orientar las sospechas diagnósticas.

2.2- Utilidades y limitaciones del diagnóstico citológico

Como se ha comentado anteriormente, se pueden obtener muestras para estudio citológico de áreas muy variadas: masas o lesiones externas (cutáneas, intradérmicas, subcutáneas...), órganos internos (bazo, hígado, ganglios, riñón, vejiga urinaria, próstata, páncreas, digestivo...), sangre y médula ósea, lesiones osteolíticas, líquidos orgánicos (LCR, orina, exudados...), líquidos patológicos (derrames pleurales y pericárdicos, ascitis), lavados broncoalveolares, diferentes zonas de la superficie corporal: vagina, conjuntiva, oídos...

El objetivo básico que debe cubrir el estudio citológico es diferenciar la naturaleza neoplásica o inflamatoria de la lesión estudiada y/o determinar el procedimiento diagnóstico que debemos utilizar como paso siguiente en la búsqueda del diagnóstico definitivo.

En general se considera que, en aproximadamente un 65% de los casos, esta técnica nos permitirá saber si estamos ante un tejido normal, inflamatorio, hiperplásico o neoplásico y determinar su malignidad. Con toda esta información se descartarán muchos diferenciales y, en ocasiones, conseguiremos llegar a un diagnóstico definitivo (por ejemplo ante linfomas, mastocitomas, melanomas...).

A las grandes ventajas que presenta esta técnica (rapidez, sencillez, poco coste económico), hay que añadirle unas ciertas limitaciones por tratarse de un examen de células “descamadas” o aspiradas de forma individual, perdiéndose la estructura arquitectónica general del tejido de origen y, a veces, el material celular es limitado. Por tanto, el éxito de una citología depende fundamentalmente de que la toma de muestras, fijación, extensión y tinción se realicen correctamente (*Masserdotti, 2006*).

Este hecho supone una limitación sobretodo a la hora de evaluar procesos de naturaleza neoplásica, ya que no obtendremos información respecto ciertos hallazgos de alto valor pronóstico como son el patrón de crecimiento, el tipo de crecimiento respecto a los tejidos adyacentes (expansivo/infiltrativo) y a la presencia o no de imágenes de embolización tumoral vascular. Por esos motivos, la citología aporta una información suficiente y valiosa pero debe ser un complemento a la biopsia e histología y nunca sustituirlo.

2.3- Obtención de muestras citológicas

Existen varias técnicas para la obtención de muestras de líquidos corporales, masas y lesiones internas. La elección de una u otra técnica dependerá de la localización anatómica de la lesión, del líquido que vayamos a analizar, de las características del tejido y del paciente.

Las técnicas posibles a emplear son las siguientes:

- Extensión o frotis de líquidos corporales: Estos fluidos pueden ser: líquido peritoneal, pleural, orina, sangre, líquido prostático... y deben examinarse inmediatamente después de su recolección.

En el caso de líquidos densos y/o viscosos, las extensiones pueden realizarse directamente a partir del líquido fresco, deslizando la gota del fluido sobre un portaobjetos con ayuda de otro (**figura 1**).

En caso de líquidos poco densos es preferible realizar una concentración celular previa mediante centrifugación. El sobrenadante se separa del sedimento pudiendo determinarse su concentración total de proteínas y el conteo celular total para la clasificación (trasudado, exudado, etc.). Las extensiones se realizan a partir del sedimento resuspendido en unas pocas gotas de sobrenadante mediante el método del frotis sanguíneo, el de concentración lineal si el líquido no puede ser previamente centrifugado (se extiende rápidamente en el portaobjetos, dejando un borde encharcado donde muchas células tienden a congregarse) o bien mediante gota pendiente.

- Impronta: Esta técnica se suele usar en animales vivos que tienen masas y lesiones que drenan, lesiones externas o tejidos obtenidos por escisión. También se puede realizar a partir de tejidos y órganos extraídos durante la necropsia del animal muerto. Es una técnica fácil, aunque se obtienen muchas menos células que con un raspado y el material suele estar mucho más contaminado que con otra técnica. Sólo se puede realizar si la zona está limpia, sin costras ni exudados. Está poco indicada para el diagnóstico de neoplasias en el animal vivo, ya que muchas veces sólo refleja una infección o inflamación superficial.

Procedimiento:

- Secar la superficie de la lesión, previamente cortada (**figura 2**), con una gasa para eliminar el exceso de sangre que podría inundar la preparación (**figura 3**).
- Aplicar con pequeños toques un portaobjetos limpio sobre la superficie de corte si la masa es *in situ* o aplicar con toques la cara de corte de una muestra sobre un portaobjetos y dejar secar al aire (**figura 4**).

- Raspado: Se realiza en lesiones externas, a partir de tejidos u órganos obtenidos por escisión, durante la realización de la necropsia o sobre superficies mucosas. Su principal desventaja es que las muestras son superficiales y en ocasiones sólo reflejan una infección o inflamación por lo que su uso está desaconsejado en el diagnóstico de neoplasias, igual que la impronta.

El procedimiento consiste en limpiar la superficie en la cual se va a llevar a cabo esta técnica y raspar varias veces con el borde de un portaobjetos o con una hoja de bisturí (**figura 5**). El material recolectado se deposita en mitad de un portaobjetos para extenderlo posteriormente.

- Hisopo o escobillón: Se utiliza cuando es difícil acceder a la lesión mediante otro tipo de técnicas, como en el caso de trayectos fistulosos y en zonas delicadas como vagina, oídos, tráquea... Cuando se obtenga la muestra, haremos rodar suavemente el bastoncillo por toda la superficie del portaobjetos (**figura 6**).

- Punción-aspiración con aguja fina (PAAF): Se utiliza en casos de derrames, quistes y para la obtención de líquido sinovial, de ascitis, líquido cefalorraquídeo o prostático. También para el estudio citológico de lesiones nodulares, ganglios linfáticos y órganos internos. La gran ventaja de esta técnica en cuanto a las lesiones cutáneas es que evita las posibles contaminaciones superficiales, aunque por el contrario, tiene una desventaja y es que suele recolectar menos células que mediante la técnica de raspado.

Se utilizan agujas de 22-23 G (largas para llegar a las cavidades que queramos) y jeringuillas de 10-20 ml. Si se va a realizar un análisis microbiológico de parte del material aspirado o se tiene que atravesar alguna cavidad corporal, se requiere una preparación aséptica previa del área similar a la que se llevaría a cabo para una intervención quirúrgica.

Es la técnica de elección para aquellas situaciones en las que se requiere un diagnóstico provisional antes de la biopsia, generalmente en tejidos poco exfoliativos para aumentar las opciones de obtener muestra suficiente para el estudio. La muestra se puede obtener guiada mediante técnicas de imagen o puncionando la lesión directamente si está a la vista.

Procedimiento (**figura 7**):

- Preparar la piel. En la mayoría de casos no es necesario rasurar la piel, sólo humedecer el pelo con alcohol. En aquellos casos en los que la muestra

obtenida se deba someter a cultivo, resulta una buena práctica rasurar y preparar la piel como si se fuera a realizar una biopsia quirúrgica, con objeto de reducir la posibilidad de contaminación de la muestra con microorganismos cutáneos. En algunos casos, cuando se aspira una masa fluctuante, es igualmente prudente preparar la piel cuidadosamente para reducir la posibilidad de contaminación del líquido contenido en la masa.

Esto puede resultar particularmente importante en los casos en los que la estructura rellena de líquido esté situada próxima a una articulación o cavidad corporal (por ejemplo, aspirado de una masa perineal que puede representar una hernia perineal), donde existe una posibilidad de comunicación entre la masa y una cavidad corporal.

- Preparar la aguja y la jeringa. Insertar la aguja en la masa y modificar su dirección punzando de tres a cinco veces. Se aplica presión negativa tirando hacia atrás el émbolo de la jeringa. En algunos casos, una excesiva presión negativa sobre las células aspiradas puede dañarlas y con ello reducir la utilidad de la prueba para el diagnóstico.
- Relajar cualquier presión sobre el émbolo de la jeringa y retirar la aguja y jeringa fijada a ella del paciente. Separar la jeringa de la base de la aguja y todas las células aspiradas quedarán en el émbolo de la aguja. Se introduce aire en la jeringa. Reajustar la jeringa a la base de la aguja.
- Disponer de un porta limpio sobre una superficie rígida y horizontal y presionar el émbolo con firmeza para expeler el contenido de la aguja sobre el porta. Una única punción puede ser suficiente para preparar dos o tres preparaciones sobre porta.
- Si no extendemos adecuadamente la muestra, no podremos estudiar las células, porque quedarán formando agregados gruesos. Es preciso lograr una extensión uniforme en monocapa. La técnica que logra los mejores resultados es la de *Squash* (**figura 8**):
 - Se deposita el material en el portaobjetos.
 - Se coloca otro portaobjetos sobre el primero, perpendicularmente y con suavidad.
 - En cuanto se realiza el contacto, se desliza el portaobjetos superior sobre el inferior en un movimiento rápido y procurando no apretar.

Una presión excesiva provocará una extensa rotura de las células aspiradas e imposibilitará que la preparación pueda ser interpretada.

- Se separan y ambos pueden teñirse. Sin embargo, antes de teñirse se dejan secar al aire.

- Punción con aguja fina (PAF): es la misma técnica que PAAF pero sin aspiración (**figura 9**), así se conserva mejor la estructura celular (se rompen menos las células al no someterlas a presión). La punción con aguja fina es la técnica de elección ante tejidos frágiles (un ganglio linfático) o muy vascularizados (por ejemplo sospecha de neoplasia tiroidea), ya que arrastra menos sangre al interior de la aguja y se logran muestras de mejor calidad en este tipo de tejidos.

2.3.1- Consideraciones a tener en cuenta:

- En general, intentar coger muestras del centro de la masa o dirigirse hacia ella. Así aumentan las posibilidades de obtener una muestra representativa, ya que si intentáramos coger de la periferia, muchas veces nos quedaríamos fuera de la lesión. La excepción son grandes masas, en las que el centro suele presentar necrosis. En estos casos se dirigirá la punción hacia la periferia (*Cigüenza del Ojo et. al., 2013*).
- En masas de gran tamaño o ante punciones de órganos con lesiones difusas, se recomienda realizar más de una punción en diferentes zonas. De esta forma aumenta la posibilidad de que la prueba refleje la realidad de la lesión.
- Si la lesión está ulcerada, es más probable obtener una muestra representativa puncionando bajo la zona ulcerada, no sobre ella, de manera que se evite toda la zona necrótica e infectada.
- Si al realizar la punción se observa que el cono de la aguja se llena de líquido o sangre se aconseja extraer la aguja y realizar la extensión en ese momento, porque la muestra se está contaminando. En estos casos puede ser útil repetir la punción en otro punto.
- Evitar expulsar la muestra sobre el portaobjetos desde mucha altura o con mucha presión. Eso aumenta la ruptura de células y disminuye la calidad de la citología. Las gotas pequeñas que se depositan de forma similar a un aerosol se secan muy rápido, antes de que se puedan extender adecuadamente. Es preferible que la gota sea de tamaño mediano y se expulse suavemente.
- Realizar la extensión inmediatamente, esto evitará que la muestra se coagule y no se pueda extender adecuadamente.

2.4- Métodos de fijación, tinción y conservación de preparaciones citológicas

Fijación

Una vez extendida la muestra se fija al aire o con alcohol etílico de 95º hasta que esté seca y ya se puede proceder a la tinción.

Tinción

Los dos tipos generales de tinción que se usan en citología son las tinciones tipo Romanowsky (tinción de Wright, Giemsa o Diff-Quick) y la tinción de Papanicolau.

Las tinciones tipo Romanowsky, concretamente la Diff-Quick, son las más utilizadas en la clínica veterinaria y se explicarán a continuación con un poco más de detalle. En general, son baratas, fáciles de preparar, mantener y utilizar. Tiñen de forma excelente el citoplasma de las células y el núcleo en menor medida (a diferencia de la Papanicolau, que tiñe de forma más definida el núcleo), pero de forma suficiente para poder diferenciar neoplasia de inflamación y para evaluar el potencial maligno en células neoplásicas mediante los criterios de malignidad.

- Diff-Quick: esta técnica es la más utilizada en la clínica veterinaria por su rapidez y sencillez, ya que únicamente hay que sumergir el portaobjetos con la extensión por orden en los tres frascos del kit comercial (fijador, colorante eosinófilo y colorante basófilo) y seguir las recomendaciones de cada fabricante.

El problema que tiene esta tinción es que no experimenta la reacción metacromática. Por ello, los gránulos de algunos mastocitos no se tiñen. Cuando esto ocurre, se pueden clasificar erróneamente estas células como macrófagos, con la consiguiente confusión en el examen de algunos mastocitomas.

- Giemsa: la técnica radica en la disociación controlada de las sales de eosinato que ocurre al insolubilizar la mezcla del giemsa por disolución en H₂O destilada; la eosina así liberada colorea el componente extracelular y determinadas estructuras acidófilas y, los derivados de azul, las estructuras de carácter basófilo. La cromatina nuclear adopta una tinción azul violeta.

- Wright: compuesta por azul de metileno y eosina. Las estructuras con carácter ácido tales como los ácidos nucleicos o las proteínas ácidas son afines por compuestos básicos como el azul de metileno contenido en la tinción. Por el contrario, las estructuras de carácter básico como la hemoglobina y otras proteínas básicas son afines a compuestos ácidos como la eosina contenida en la tinción. Estas estructuras tendrán un color rojo-rosado al microscopio.
- Papanicolau: es un método de tinción policrómico que consta de una tinción nuclear y un contraste citoplasmático. Aunque se usa poco en veterinaria debido a la gran cantidad de pasos a seguir y a sus limitaciones, tiene como ventaja una buena definición del detalle nuclear, evidenciando el patrón de cromatina; un aspecto transparente del citoplasma, que permite apreciar los grados de diferenciación celular y actividad metabólica (*Valenciano, 2014*). Esta tinción utiliza tres colorantes: la Hematoxilina que tiñe selectivamente los núcleos y el Orange G y la Eosina Alcohol 50 que tiñen los citoplasmas.

Conservación

Para conservar de forma indefinida una extensión citológica:

- La extensión ya teñida y secada se deshidrata con alcohol durante unos 30 segundos.
- Se escurre el alcohol y se cubre de xilol durante 15-30 segundos.
- Se escurre el xilol y se monta la preparación para observarla al microscopio colocando sobre ella un cubreobjetos al que previamente hemos colocado una gota de medio de montaje para histopatología.
- Dejar asentar la preparación durante 2 minutos.

2.5- Problemas en la tinción

Una correcta tinción es muy importante para la interpretación y diagnóstico citológico. Algunos de los problemas más comunes que se pueden presentar y sus posibles soluciones figuran a continuación:

Tinción excesivamente azul	
Problema	Solución
Contacto prolongado con el colorante Lavado inadecuado Muestra demasiado gruesa Colorante, diluyente, tampón o agua de lavado demasiado alcalina Exposición a vapores de formalina Fijación húmeda con etanol o formalina Demora en la fijación Superficie del portaobjetos alcalina	Disminuir el tiempo de tinción Prolongar el lavado Hacer extensiones más delgadas si es posible Comprobar con papel indicador y corregir el pH Almacenar y enviar las preparaciones citológicas lejos de contenedores de formalina Secar las preparaciones al aire antes de fijarlas Fijarla antes Usar portaobjetos nuevos
Tinción excesivamente rosa	
Problema	Solución
Tiempo insuficiente de tinción Lavado prolongado Colorante o diluyente demasiado ácidos Excesivo tiempo en el colorante rojo Poco tiempo en el colorante azul Colocación de un cubreobjetos antes de secar la preparación	Incrementar el tiempo de tinción Disminuir el tiempo de lavado Comprobar con papel indicador y corregir el pH Disminuir el tiempo en el colorante rojo Disminuir el tiempo en el colorante azul Dejar secar la preparación completamente antes de colocar el cubreobjetos
Coloración pálida	
Problema	Solución
Contacto insuficiente con uno o más de los colorantes Colorantes agotados (viejos) Otro portaobjetos cubría la muestra durante la tinción	Incrementar el tiempo de tinción Cambiar los colorantes Mantener los portaobjetos separados
Tinción no homogénea	
Problema	Solución
Variación del pH en diferentes áreas de la superficie del portaobjetos Ha quedado agua en algunas áreas del portaobjetos después de teñir y lavar Mezcla inadecuada de colorante y tampón	Usar portaobjetos nuevos y evitar tocar su superficie antes y después de su preparación Mantener los portaobjetos casi verticales para eliminar el agua de la superficie o secar con un secador Mezclar el colorante con el tampón concienzudamente
Precipitados en la preparación	
Problema	Solución
Filtración inadecuada de los colorantes Lavado inadecuado tras tinción Uso de portaobjetos sucios La solución colorante se seca durante la tinción	Filtrar o cambiar los colorantes Aclarar bien los portaobjetos después de teñirlos Usar portaobjetos nuevos y limpios Usar suficiente colorante y no dejar el portaobjetos en él tanto tiempo
Miscelánea	
Problema	Solución
Preparaciones con exceso de tinción Artefactos refráctiles en los eritrocitos con Diff-Quick por humedad en el fijador	Desteñir con metanol al 95% y teñir de nuevo. Cambiar el fijador

2.6- La citología en el diagnóstico del cáncer en pequeños animales

El cáncer es un importante problema, cada vez más frecuente, en la salud de gatos y perros. La mayoría de los cánceres de origen natural se originan a partir de la transformación de un único precursor o célula madre. Aunque los acontecimientos que conducen a esta transformación neoplásica no se conocen completamente, se sabe que el cambio principal está relacionado con el desorden de los mecanismos genéticos normales que controlan el crecimiento o división celular y la diferenciación celular. El cáncer es, por lo tanto, una enfermedad genética de células somáticas, caracterizado básicamente por:

- La proliferación de células cancerígenas es descontrolada y tiene lugar de forma independiente a la necesidad de nuevas células.
- El proceso de la diferenciación celular está dañado en células cancerígenas; con frecuencia son “inmaduras”.

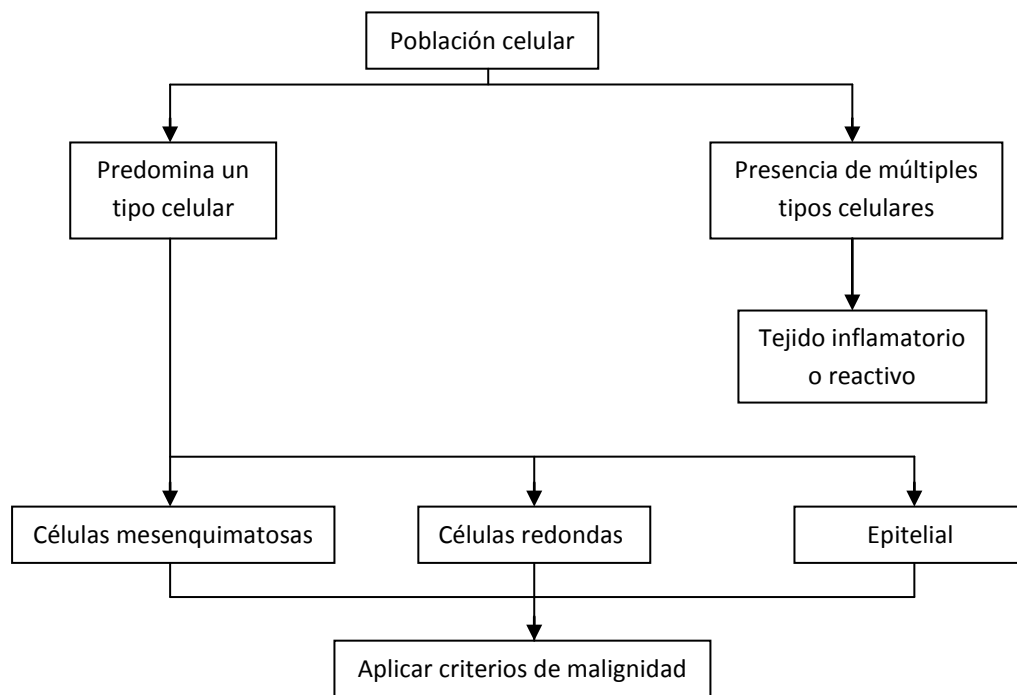
La citología es la técnica más empleada para su diagnóstico inicial. El examen citológico de muestras de tejido es una técnica rápida y sencilla que requiere un equipamiento mínimo, fácil de llevar a cabo en el escenario de la práctica general, aunque casi siempre se tendrá que recurrir a la histopatología para confirmar 100% un diagnóstico.

A menudo no es necesario un diagnóstico definitivo para el tratamiento. Cuando se requiera un diagnóstico definitivo y no pueda obtenerse por citología, ésta suele resultar útil para seleccionar el próximo paso a seguir (cultivo, biopsia, radiografía...). Una preparación donde solo se observen células inflamatorias, por ejemplo, contenga microorganismos o no, indica la utilidad de un cultivo posterior, mientras que la observación exclusiva de células tisulares implica una biopsia y no un cultivo.

Los aspirados con aguja fina o frotis de impresión de tumores sólidos, así como el examen citológico del contenido celular de los líquidos recogidos de órganos o cavidades corporales pueden proporcionar una gran cantidad de información sobre la lesión y, en la mayor parte de los casos posibilitan poder diferenciar entre procesos inflamatorios y neoplásicos. En las manos de un experimentado citopatólogo puede ser una técnica altamente provechosa que puede ser de gran ayuda para tomar la decisión del procedimiento diagnóstico posterior y del tratamiento más apropiado, ya que la morfología de células neoplásicas proporciona frecuentemente una indicación de la naturaleza más probable de un tumor y su grado de malignidad. En manos inexpertas, sin embargo, o si la muestra se ha recogido mediante una técnica deficiente o ha sido manipulada de forma inadecuada, la citología puede ser

infructuosa o, lo que es peor, engañosa y conducir a una decisión diagnóstica o terapéutica equivocada.

Teniendo siempre en cuenta la historia clínica del paciente y el aspecto macroscópico de la lesión, cuando evaluamos una extensión citológica, podemos seguir este procedimiento:



M. DOBSON, R. et. al. Diagrama de decisión para el diagnóstico citológico. *Manual de oncología en pequeños animales (3ª edición)*.

2.6.1- Tipos de lesiones tisulares

Los tres grandes grupos de lesiones tisulares son: **inflamación, hiperplasia y neoplasia** y, la principal distinción que hay que hacer al interpretar una muestra citológica, es la que existe entre inflamación y neoplasia.

Citología de las lesiones inflamatorias (figura 10): se caracterizan por la presencia de un gran número de neutrófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos o células plasmáticas, que en diferentes proporciones caracterizan los diferentes tipos de inflamación desde el punto de vista citológico.

- Inflamación purulenta: más del 85% de las células inflamatorias son neutrófilos.
- Inflamación aguda: más del 70% de las células inflamatorias son neutrófilos.

- Inflamación subaguda: un 30-50% de las células inflamatorias son monocitos, macrófagos y linfocitos.
- Inflamación crónica: más del 50% de las células inflamatorias son monocitos y macrófagos.
- Inflamación granulomatosa: presencia de abundantes células epitelioides y células gigantes.
- Inflamación piogranulomatosa: inflamación purulenta con un componente de células epitelioides y gigantes.
- Inflamación eosinofílica: los eosinófilos superan el 10% de las células inflamatorias.

Citología de las hiperplasias (figura 11): las células hiperplásicas son prácticamente idénticas a las normales, por tanto, su diagnóstico resulta complicado.

Citología de las neoplasias: es útil proceder en tres etapas respondiendo a tres preguntas:

1. *¿La lesión es realmente una neoplasia?*

Para determinar si la lesión es una neoplasia o si se trata de otro tipo de lesión, existen unos indicadores generales como la escasez o ausencia de células inflamatorias, la hiper celularidad o el pleomorfismo celular. No obstante, la respuesta a esta primera cuestión no siempre es fácil sobre todo en aquellas muestras que contengan células inflamatorias y a la vez células tisulares modificadas ya que esto puede ser indicativo de neoplasia con inflamación secundaria o bien puede sugerir inflamación acompañada de displasia celular.

2. *Si es una neoplasia ¿es maligna?*

Se ha establecido que se deben encontrar al menos tres criterios de malignidad. Sin embargo a veces no es tan sencillo pues procesos reactivos secundarios a fuertes reacciones inflamatorias pueden aparecer con importantes anomalías o atipias celulares, y por otro lado, tumores malignos bien diferenciados pueden presentarse con escasas atipias y menos de tres criterios de malignidad. Hay que diferenciar un tumor de cambios displásicos o hiperplásicos no neoplásicos, teniendo en cuenta que la benignidad es un diagnóstico histológico, no citológico.

En ausencia de inflamación, un tejido con características citológicas de malignidad puede ser considerado maligno pero una muestra con escasas modificaciones no debe asumirse como benigna.

Criterios de malignidad

- Genéricos

- Hipercelularidad (**figura 11**): incremento en la exfoliación celular como consecuencia de la disminución de la adherencia de las células.
- Anisocitosis y macrocitosis (**figura 12**): variación en el tamaño de las células, pudiendo llegar a observarse células con un tamaño superior al normal.
- Pleomorfismo (**figura 13**): variación en el tamaño y forma de células del mismo tipo (criterio no válido para los tejidos linfoides en los que el pleomorfismo es fisiológico).

- Nucleares

- Anisocariosis (**figura 14**): variación en el tamaño nuclear. Este dato es también importante cuando la variación ocurre entre los diferentes núcleos de una célula multinucleada.
- Macrocariosis: incremento del tamaño nuclear que lleva normalmente asociado un incremento del cociente núcleo:citoplasma (**figura 15**). En células normales no linfoides este cociente varía de 1:3 a 1:8. Cocientes iguales o superiores a 1:2 sugieren malignidad así como núcleos de diámetro superior a 10 μm .
- Multinucleación (**figura 16**): múltiples núcleos en una célula, especialmente si hay diferencia en sus tamaños.
- Patrón grosero o heterogéneo de la cromatina nuclear (**figura 15**).
- Presencia de uno o más nucléolos destacados, así como variaciones en el tamaño y forma de los mismos, especialmente si se trata de nucléolos dentro de un mismo núcleo. El hallazgo de nucléolos de diámetro superior a 5 μm sugiere malignidad (**figura 17**).
- Incremento en el número de figuras de mitosis (**figura 18**), especialmente si se trata de mitosis atípicas.

- Citoplasmáticos
 - Vacuolización citoplasmática (**figura 17**): presencia de vacuolas claras de contorno normalmente bien definido y pequeño tamaño en el citoplasma, incluso de distribución anómala en el mismo.
 - Incremento o variabilidad en la intensidad de tinción del citoplasma.
 - Variación en la cantidad de citoplasma que conlleva alteraciones en el cociente núcleo:citoplasma (**figura 15**).
- Indirectos: contexto evocador de malignidad (hemorragia, necrosis, fagocitosis de material celular...)

Los criterios de malignidad nucleares son más fiables a la hora de determinar la malignidad de una población celular tisular, ya que muchos de los criterios de malignidad citoplasmáticos también pueden apreciarse en casos de neoplasias benignas o alteraciones fisiológicas de las células asociadas a procesos de naturaleza hiperplásica y/o displásica.

Una vez evaluada la citología, teniendo en cuenta los criterios de malignidad y la naturaleza de las células observadas, nos podemos encontrar con:

- Estudio citológico no compatible con una lesión neoplásica inicialmente, aunque no se descarta definitivamente la posibilidad de tumor: sólo se observan células inflamatorias. Hablamos de una citología **negativa**.
- Estudio citológico compatible con una lesión neoplásica: solamente observamos una población de células tisulares (no inflamatorias). Hablaremos de citología **positiva** cuando se encuentran **más de tres criterios de malignidad**. En este caso se plantea un objetivo nuevo que se describe en la tercera pregunta.
- Estudio citológico compatible con proceso inflamatorio con cambios displásicos tisulares. Hablaremos de citología **sospechosa** cuando se encuentren **menos de tres criterios de malignidad**.

3. *¿Cuál es el origen de la neoplasia?*

En citología diagnóstica se pueden distinguir básicamente tres orígenes celulares: epitelial, conjuntivo (mesenquimatoso) o de células redondas. En este punto se trata de intentar identificar el tipo exacto de tumor (**figura 20**).

- Neoplasia epitelial (**figura 15**): las características básicas que identifican citológicamente una neoplasia epitelial son: la elevada celularidad, la morfología redondeada u ovalada de las células, la formación de *clusters* (nidos celulares) y la tinción azurófila más o menos intensa del citoplasma. Las células suelen ser de gran tamaño, con moderado a abundante citoplasma y núcleos de morfología redondeada de localización central o ligeramente excéntricos. El patrón cromático varía desde homogéneo hasta granular, pudiendo observarse la presencia de uno o más nucléolos destacados que pueden llegar a ser grandes y de tamaños diferentes conforme el potencial de malignidad aumenta. Mediante técnicas de tinción rutinarias, el citoplasma suele presentar una tinción azurófila más o menos intensa y, dado el origen glandular de las células en muchas ocasiones, su apariencia puede ser granular y/o globular como reflejo del cúmulo de material de secreción. Aunque podemos observar células sueltas en la extensión, las neoplasias epiteliales tienden a exfoliar células en *clusters*. En estos nidos es donde mejor podemos apreciar las variaciones respecto al tamaño y forma de las células, núcleos y nucléolos para así evaluar la malignidad del tumor. Estos grupos celulares pueden adoptar formaciones acinares cuando las células son de origen glandular o aparecer más aisladas o en disposición a modo de pavimento cuando son de origen epidermoide.

- Neoplasia mesenquimatosa (**figuras 13, 14 y 18**): las características citológicas básicas que sugieren un origen mesenquimatoso para una población celular son la morfología ovalada o fusiforme de las células y de sus núcleos, junto al hecho de que no suelen dar lugar a la formación de *clusters* celulares (las células casi siempre son aisladas). Las muestras de estas neoplasias suelen ser escasamente celulares. Asimismo, el citoplasma está poco delimitado y suele teñirse de coloración débilmente rosácea sin presentar la apariencia granular/globular típica de las células epiteliales.

Para evaluar la malignidad del tumor nos debemos fijar en los criterios generales de malignidad descritos anteriormente. En todo caso, hay que tener en cuenta que citológicamente es muy difícil identificar el tipo concreto de sarcoma de que se trate.

Igualmente, en muchas ocasiones también resulta difícil diferenciar mediante citología la naturaleza verdaderamente neoplásica de una población de células fusiformes, de una población fibroblástica correspondiente a un tejido inflamatorio de granulación, siendo necesaria la realización de un estudio histopatológico que determine definitivamente el diagnóstico de neoplasia mesenquimatosa.

- Tumor de células redondas: se denomina así ya que, la morfología redondeada de las células, es el principal rasgo identificativo de las mismas. Estos tumores tienden a exfoliar muchas células, de pequeño o mediano tamaño y, normalmente, de forma aislada, sin formar *clusters* celulares. Éstas presentan el núcleo redondo o arriñonado y bordes citoplasmáticos nítidos. Se debe distinguir entre aquellos tumores de células redondas pequeñas con núcleos redondos u ovales con cromatina densa y escaso citoplasma (10-15 μm) y los tumores de células grandes con la misma estructura pero de mayor volumen (>20 μm) y más citoplasma (claro, vacuolado, pigmentado) (Llombart, 2003).

Esta clasificación es un término descriptivo que agrupa un elevado número de distintas neoplasias con un variado comportamiento clínico. Se incluyen el mastocitoma (**figura 16**), el histiocitoma (**figura 19**) y el tumor venéreo transmisible (**figura 18**). Ocasionalmente, algún tipo de melanoma maligno, plasmocitoma y tumores de células basales también pueden incluirse en este grupo de tumores.

Para identificar especialmente el tipo concreto de tumor, o al menos restringir la lista de posibles diagnósticos diferenciales y acercarnos más al definitivo, deberemos tener en cuenta, junto a los hallazgos citológicos de las células, el historial clínico del paciente, ya que, la edad del enfermo y la localización anatómica de la lesión establecen criterios diferenciales importantes (Llombart, 2003).

De todas las neoplasias que pueden clasificarse dentro de este grupo, la que es más fácilmente reconocible es el mastocitoma, ya que los mastocitos se caracterizan por la presencia de gránulos azurófilos intracitoplasmáticos que, en caso de realizar una tinción con la técnica de Giemsa, muestran metacromasia ya que estos gránulos se tiñen de color rojizo. Este tumor, además, suele presentar como hallazgo identificativo una infiltración de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos.

Finalmente, podemos incluir otra categoría de neoplasia por sus características morfológicas:

- Tumores neuroendocrinos: Son los tumores de las glándulas endocrinas (tiroides, paratiroides, páncreas, adrenales) o de los quimiorreceptores (cuerpos carotídeos y aórticos). Estos tumores tienen rasgos citológicos característicos ya que suelen aparecer como núcleos libres sobre un trasfondo de citoplasma, apenas se pueden observar bordes citoplasmáticos diferenciados y es frecuente que carezcan de criterios evidentes de malignidad, a pesar de ser tumores de comportamiento maligno.

2.6.2- Consideraciones en la interpretación de una extensión citológica

Para que la interpretación de una citología aporte la mayor cantidad de información posible, siempre debe ir acompañada de un historial clínico completo del paciente y una descripción detallada de la lesión indicando:

- Fecha de aparición
- Localización
- Ritmo de crecimiento
- Tamaño
- Consistencia, adherencia, encapsulación
- Color
- Carácter recidivante de la misma
- Presencia o ausencia de adenopatías regionales.

Por otro lado es muy importante una correcta toma de muestras y/o extensión de la misma. En este sentido la experiencia y práctica del clínico es fundamental a la hora de que las extensiones citológicas y las muestras sean lo suficientemente representativas para que el estudio sea útil y aporte el mayor grado de información posible.

En el caso de las masas o lesiones de apariencia neoplásica tenemos que tener en cuenta varios puntos:

- Pueden haber áreas diferentes en un mismo tumor, ya sea respecto a la complejidad en la arquitectura o referente al grado de malignidad/benignidad, por ejemplo el tumor de mama en perras.
- Muchos tumores, sobretodo los de crecimiento rápido, presentan focos de necrosis de los cuales no vamos a obtener células intactas y tampoco información.
- Muchas neoplasias llevan asociados procesos inflamatorios por lo que, la ausencia de células tisulares con signos de malignidad, no implica descartar esta posibilidad si la

historia clínica del paciente y la apariencia macroscópica de la lesión puedan sugerir que sea una neoplasia.

- Existe la posibilidad de una presentación multicéntrica de tumores. Muchas veces corresponderán a un mismo tipo de tumor aunque también puede darse el caso de que dichas masas correspondan a neoplasias de diferente naturaleza y grado de malignidad.
- La citología, frecuentemente, no nos dará un diagnóstico definitivo de tumor. Por ejemplo, en algunos tumores sólidos, las células neoplásicas pueden no ser exfoliadas suficientemente como para proveer bastantes células para el diagnóstico. Esto puede ocurrir con cualquier tumor que produce cantidades considerables de componentes estromales, como un fibroma o un osteoma.
- La citología no se puede utilizar para la gradación de la mayoría de los tumores ya que, ésta es altamente dependiente de la consideración de la relación de las células neoplásicas con los tejidos normales que las rodean, así como otros factores como el índice mitótico, el grado de inflamación y necrosis; todo ello puede ser difícil o imposible de evaluar solamente con el examen citológico.

3- Justificación y objetivos

Decidí realizar el trabajo de fin de grado sobre el diagnóstico citológico en pequeños animales y centrarme en su uso en el área de oncología ya que es una técnica que encuentro muy útil, que aporta mucha información y la cual se usa mucho en la práctica habitual de la clínica de pequeños animales. Ya que durante el Grado lo vemos de una forma un poco superficial, quería profundizar en cómo se obtienen este tipo de muestras, sus indicaciones y su aplicación práctica en esta área de la Patología Animal.

Los objetivos que pretendía alcanzar al realizar este trabajo son:

- Conocer la prevalencia de las lesiones estudiadas mediante citología en el HVUZ.
- Diferenciar los procesos neoplásicos de otros de diferente origen (inflamación, hiperplasia, quiste...) y establecer su prevalencia.
- Dentro de las diferentes neoplasias, diferenciar sus tipos e identificarlos.

4- Metodología

Este trabajo se ha basado en el estudio de muestras citológicas obtenidas en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ) durante un año, de Mayo del 2014 a Mayo del 2015.

En Febrero del 2015 empecé a observar las diferentes citologías al microscopio, en el laboratorio del departamento de Patología Animal, que previamente había teñido y analizado la Doctora y Directora de este trabajo, M^a Carmen Aceña Fabián. La mayoría de las muestras fueron recogidas mediante punción con aguja fina (PAF). Como referencian algunos autores (*Bowl et. al., 2014*), es la técnica de elección antes que la biopsia u otras técnicas (PAAF, impronta...) por sus grandes ventajas y, en el HVUZ, la gran mayoría de muestras son recogidas mediante esta técnica, ya que es poco invasiva, más segura en el caso de los órganos más vascularizados y frágiles y se recogen muestras de mayor calidad (con menos contaminación por hematíes u otro tipo de células que nos puedan interferir en el diagnóstico). Incluso, depende de la localización de la lesión a puncionar, se puede hacer con ausencia de sedación sin peligro para el animal.

Los datos de las muestras observadas y de los informes los he reunido en diferentes tablas para poder realizar, seguidamente, el estudio que explico en el siguiente apartado.

Cada tabla consta de:

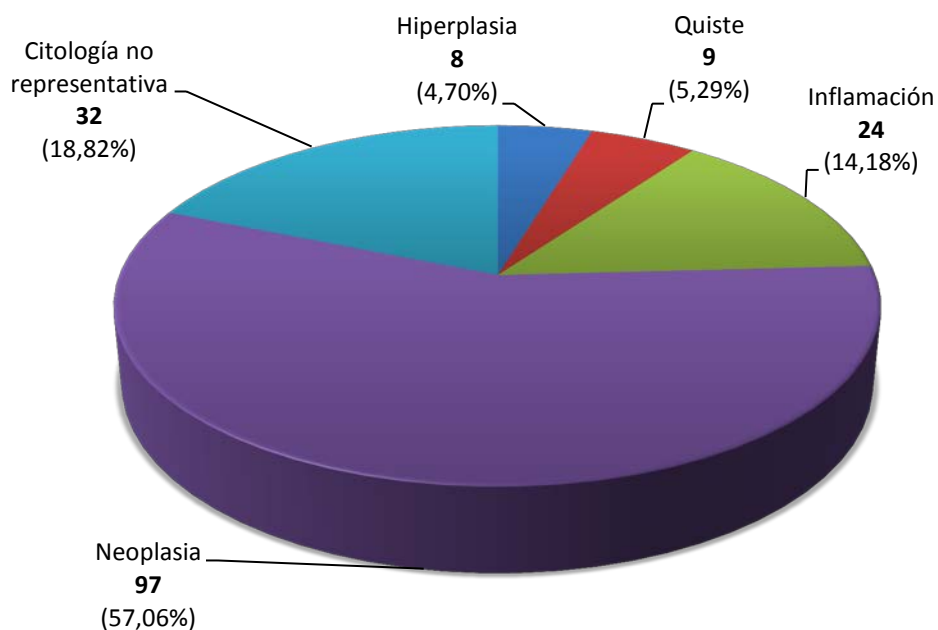
- Nº de la citología
- Especie a la cual se le realizó la punción, raza, edad y sexo
- Referido a la lesión: localización, tiempo de crecimiento, tamaño y descripción
- Descripción citológica de la muestra observada al microscopio
- Diagnóstico citológico, que no significa que sea el definitivo ya que, como he mencionado anteriormente, esta técnica no puede ser definitiva en muchos casos y se tiene que verificar con histología. Cabe destacar que no se incluye el diagnóstico definitivo porque no se dispone de él en todos los casos.

Nº CITOLOGÍA	
Especie	
Raza	
Edad	
Sexo	
LESIÓN	
Localización	
Tiempo de crecimiento	
Tamaño	
Descripción de la lesión	
Descripción citológica	
Diagnóstico citológico	

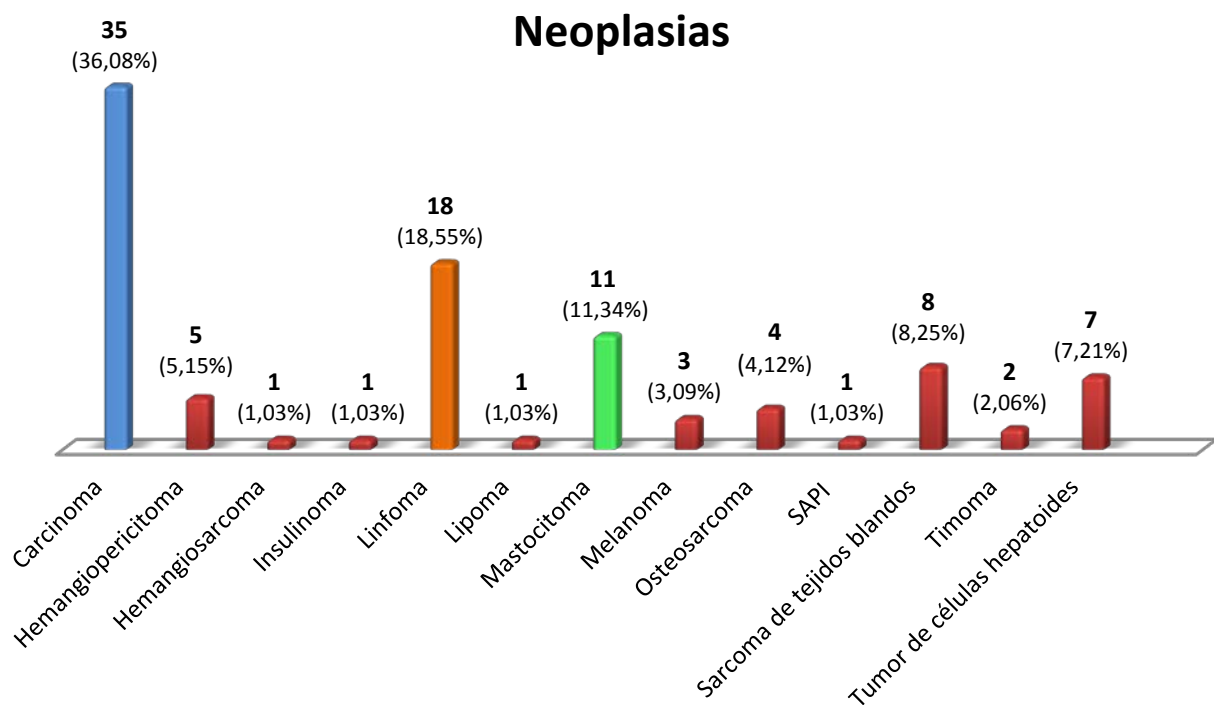
5- Resultados y discusión

Se estudiaron un total de 170 muestras, de las cuales:

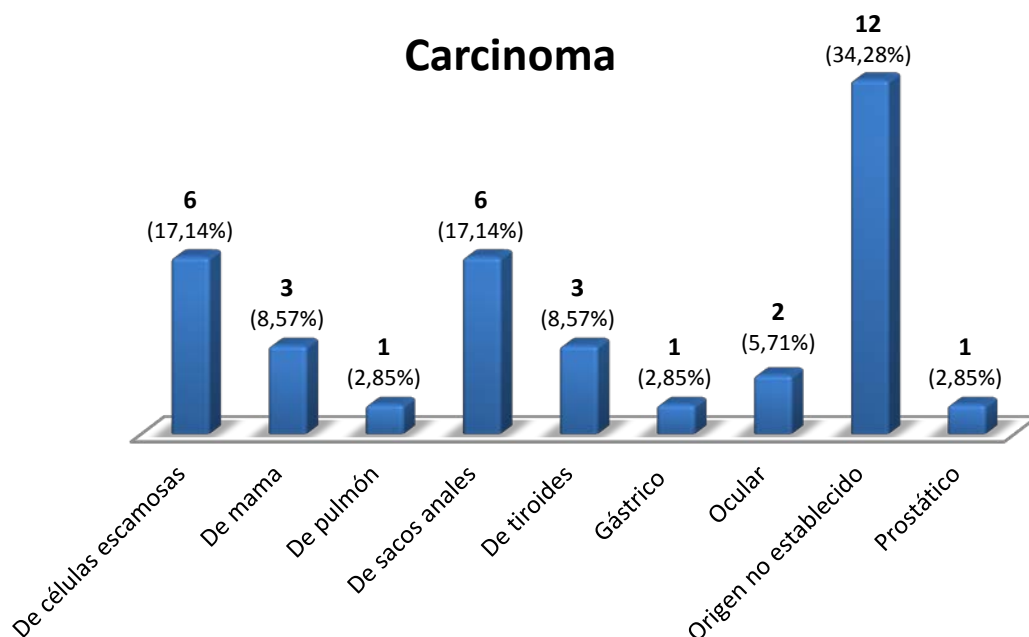
- 97 de las 170 muestras (57,06%), la imagen citológica ha resultado ser compatible con neoplasias, de diferente índole.
- Otra parte de citologías no se ha podido valorar, ya que han resultado no representativas. Un total de 32 (el 18,82%).
- 24 han sido inflamaciones, de diferente origen y tipo (14,18%).
- 9 han resultado ser lesiones quísticas (5,29%).
- 8 hiperplasias (4,70%).



Según estudios de la Universidad de los Llanos, Colombia (*Bravo, D. et. al., 2010*) junto con otras facultades, las neoplasias son las lesiones que con más frecuencia aparecen en pequeños animales y la especie que resulta más afectada es la canina, atendiendo así a un mayor número de pacientes de esta especie en el hospital que no de otras.

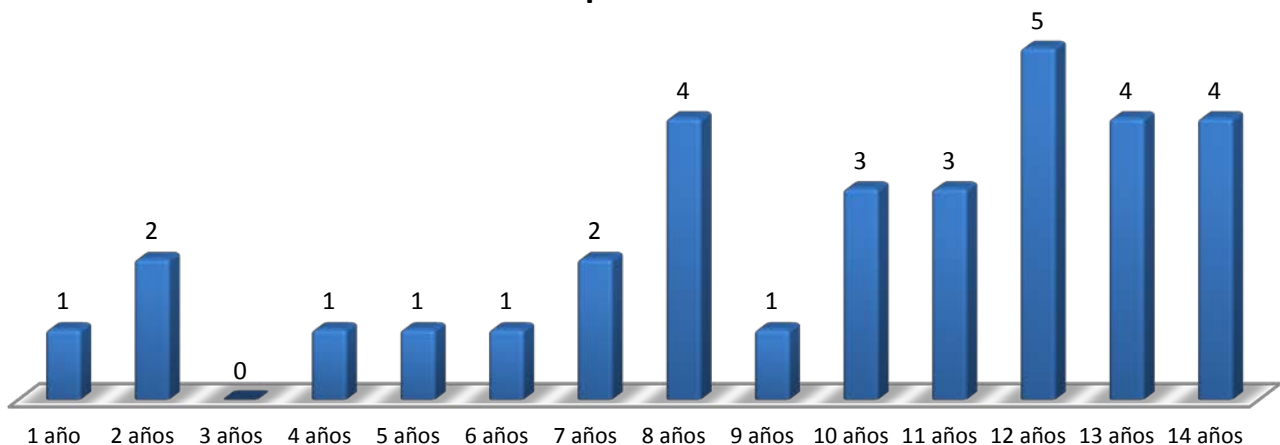


Dentro de las 97 neoplasias, las más representativas han resultado ser carcinomas de diferente origen (36,08%), linfomas (18,55%) y mastocitomas (11,34%).

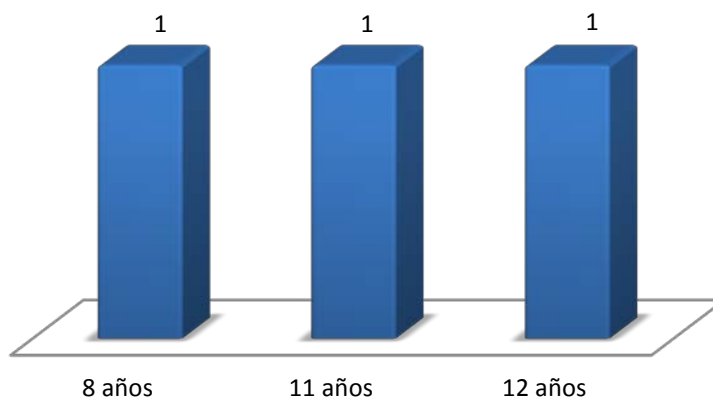


En cuanto a los carcinomas, de las 170 muestras observadas, 35 han sido compatibles con este tipo de neoplasia. Como se puede observar en el gráfico, hay diversidad de tipos y origen, aunque destacan los que no se les ha podido establecer un origen (34,28%). Esto puede ser debido a que en nuestro estudio, muchos de los carcinomas diagnosticados citológicamente se han obtenido mediante PAF ecoguiada de masas localizadas en la cavidad abdominal/torácica. De cualquier manera, sin tener los resultados de histopatología, no se puede establecer un diagnóstico definitivo.

Prevalencia de carcinomas por edad - Perro

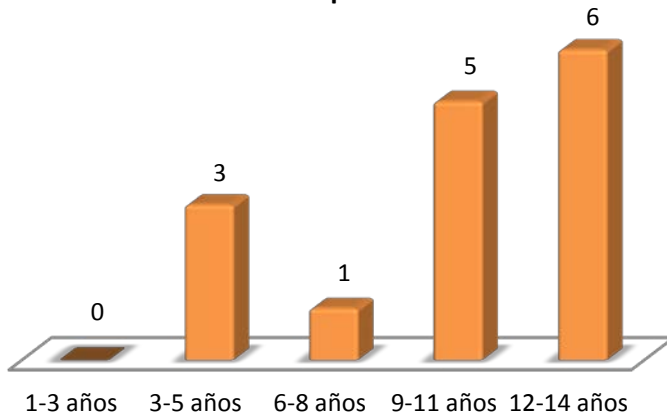


Prevalencia de carcinomas por edad - Gato

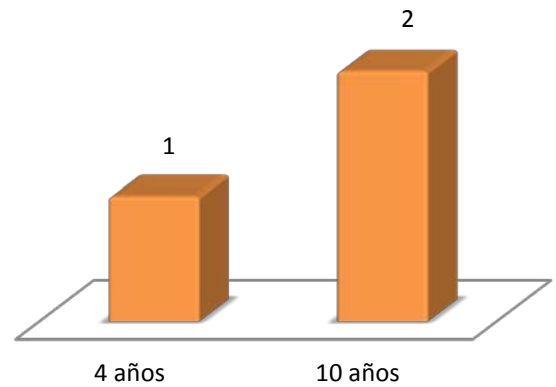


La mayoría de los 35 casos de carcinomas observados han sido vistos en perro, en gato solo 3 casos. En los gatos se han dado en edades tardías, a partir de los 8 años. En cambio, en perros, hay más diversidad en cuanto a la edad de presentación y también de localizaciones y se ha visto algún caso en animales más jóvenes, aunque sigue habiendo más prevalencia a partir de los 8 años.

Prevalencia de linfomas por edad - Perro



Prevalencia de linfomas por edad- Gato

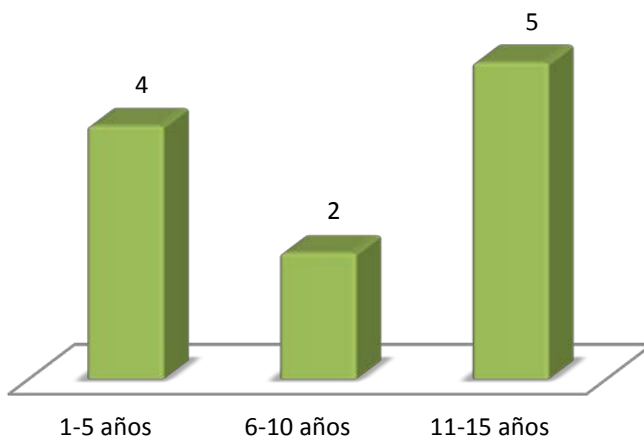


El 18,75% de todas las neoplasias diagnosticadas citológicamente son linfomas. En total se han observado 18 linfomas de los cuales 15 se localizaban en perro y sólo 3 en gatos.

He realizado el estudio conforme la prevalencia por edad, como en el caso anterior y, lógicamente y como está descrito en la bibliografía (*Whitrow, 2013*), se dan más casos de linfoma en edades más tardías, a partir de unos 9-10 años. Este dato es totalmente esperado ya que los tumores, tanto en humana como en veterinaria, surgen más frecuentemente en animales mayores y geriátricos.

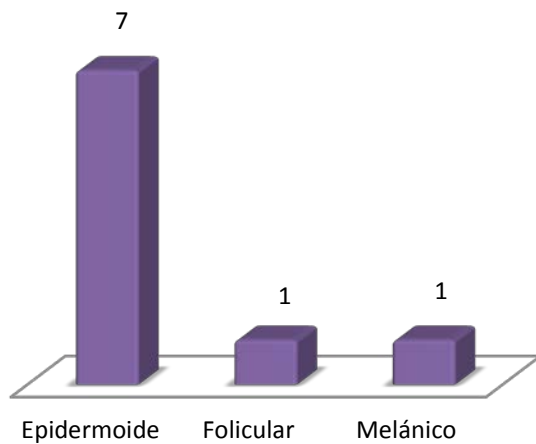
Aun así, en el caso de los perros, se han dado algunos casos en animales más jóvenes, entre 3 y 5 años, aunque no es representativo frente a los 11 casos dados en edades más avanzadas. El linfoma es una neoplasia que puede darse en edades un poco más tempranas que el resto de tumores malignos (a partir de 5-6 años) y no está relacionado con el sexo (*Martineau, 2002*).

Prevalencia de mastocitomas por edad - Perro



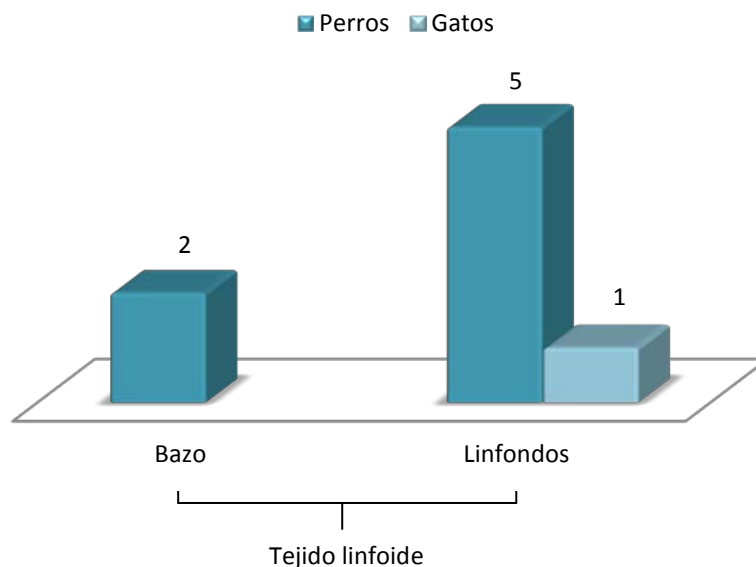
En el caso del mastocitoma, en gatos no se ha diagnosticado ningún caso desde Mayo del 2014. Todos han sido en perros, tanto en edades avanzadas (a partir de los 11 años) como en jóvenes, sorprendentemente, entre 1 y 5 años. Es un tumor muy poco frecuente en gatos y así lo confirman algunos estudios (*A. Miller, M. et. al. 1991*).

Quistes



Otras lesiones encontradas durante la revisión de muestras han sido los quistes, 9 en total. Como se ve en la gráfica, el tipo de quiste más observado ha sido el cutáneo epidermoide.

Hiperplasias

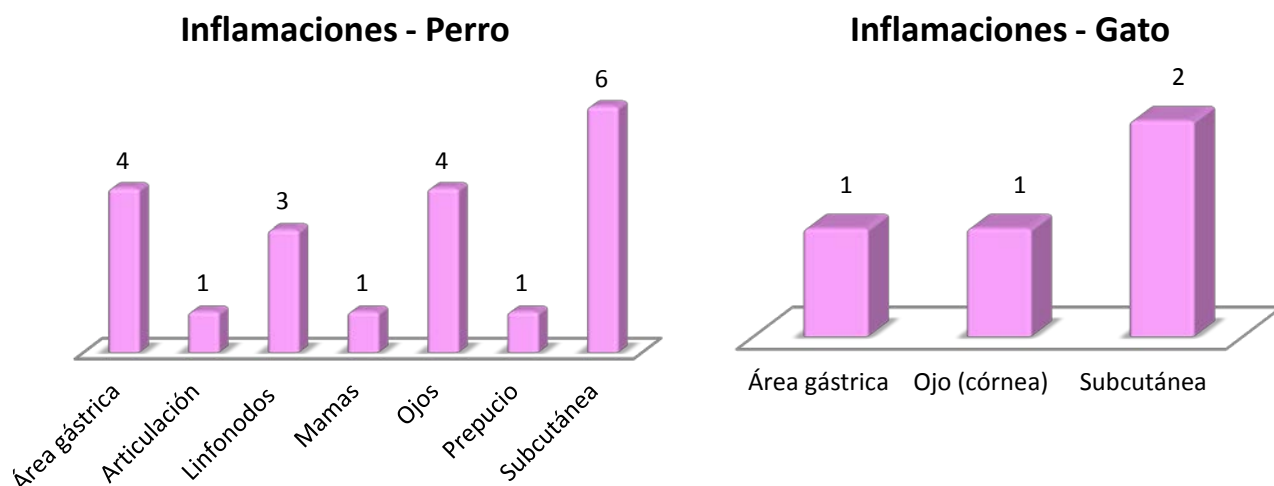


De las 170 lesiones analizadas, 8 han sido diagnosticadas citológicamente como hiperplasias, descartando la posibilidad de neoplasia por las células observadas.

De las 8 lesiones, sólo una se ha dado en gato, las demás en perro. Todas las hiperplasias han correspondido a tejido linfoide, la mayoría en ganglios linfáticos superficiales y el resto en bazo. Esto es debido a que el fin de la obtención de estas muestras fue precisamente distinguir entre lesión hiperplásica o neoplásica en estas localizaciones.

Finalmente, en el caso de las lesiones inflamatorias, la gran mayoría se han hallado en perros, un total de 20 inflamaciones de las 24 que se han diagnosticado citológicamente. Las otras 4 en gato.

Se localizan en diferentes zonas, como muestran los siguientes gráficos:



6- Conclusiones

- En nuestro estudio, la práctica más habitual para la obtención de muestras de diferentes lesiones para citología es la técnica de punción con aguja fina (PAF).
- Dentro de todas las lesiones observadas durante un año, la mayoría han sido diagnosticadas citológicamente como neoplasias (a falta del diagnóstico histológico definitivo que no está disponible) y sobretodo en perros.
- En el caso de las neoplasias, el 36,08% han sido identificadas como carcinomas. Por tanto, se podría establecer que es una de las neoplasias más frecuentes diagnosticadas en el HVUZ.
- Los tres tumores con más prevalencia del estudio han sido: carcinoma, linfoma y mastocitoma y más en animales de edad avanzada que no en jóvenes.

Conclusions

- In our study, the most common method for obtaining samples of different injuries to practice cytology is the technique of fine needle aspiration (FNA).

- Among all the lesions seen for a year, most were diagnosed cytologically as neoplasms (in the absence of definitive histologic diagnosis that is not available) and especially in dogs.
- In the case of neoplasia, 36.08% have been identified as carcinomas. Therefore, it could be established that is one of the most common cancers diagnosed in the HVUZ.
- The three most prevalent tumors of the study have been: carcinoma, lymphoma and mast cell tumor and more in animals aged advanced than young animals.

7- Valoración personal

Con este trabajo pretendía acabar el Grado sabiendo un poco más sobre la técnica de la citología en la oncología de pequeños animales y creo que así ha sido. Partía de un conocimiento citológico general bastante básico y creo que con este trabajo he aprendido sobretodo a reconocer los tipos celulares y diferentes lesiones al microscopio.

El estudio lo he realizado de muestras de un año. Al tener un periodo de tiempo tan limitado para realizarlo y pocos recursos, los resultados obtenidos no son del todo significativos para establecer unas conclusiones de peso y definitivas. Con más tiempo se podría haber hecho un estudio comparativo de los informes citológicos con los histológicos definitivos que podría haber sido muy interesante.

Aun así, creo que es un trabajo que me ha aportado muchos conocimientos sobre la interpretación de citologías al microscopio, que al fin y al cabo es lo que pretendía, y que me va a ser útil para encarar el no tan lejano mundo laboral.

8- Agradecimientos

Quiero dar las gracias a la directora de este trabajo, Dra. M^a Carmen Aceña Fabián, por ayudarme en su realización, la paciencia, horas extra de trabajo invertidas en el asesoramiento y corrección y por dejarme acceder a todas las muestras e informes propios para realizar el estudio.

9- Bibliografía

- Apuntes “Integración en Pequeños Animales”. 4º de Grado en Veterinaria. 2013.
- Apuntes de Máster AEVA en Oncología Clínica Veterinaria.

Libros

- CARTAGENA ALBERTUS, J. C. *Oncología veterinaria*. Ed. Servet, 2011. Zaragoza.
- M. DOBSON, J., DUNCAN X. LASCELLES, B. *Manual BSAVA de oncología en pequeños animales*, 3ª edición. Ediciones S., 2014. Barcelona.
- VALENCIANO, A. C., COWELL, R. L. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*, 4th edition. Ed. Elsevier, 2014.
- L. COWELL, R., D. TYLER, R., H. MEINKOTH, J. *Citología y hematología diagnóstica en el perro y el gato*, 2ª edición. 1999, Barcelona.
- J. WITHROW, S., M. VAIL, D., L. PAGE, R. *Small animal clinical oncology*, 5th edition. Ed. Elsevier, 2013.
- BAKER, R., H. LUMSDEN, J. *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*. Ed. Mosby, 2000, Missouri.
- E. RASKIN, R., J. MEYER, D. *Citología canina y felina (atlas en color y guía de interpretación)*, 2ª edición. Multimédica Ediciones Veterinarias, 2010, Missouri.
- M. MARTÍNEZ DE MERLO, E. *Atlas de citología clínica del perro y el gato*. Ed. Servet, 2008, Zaragoza.
- R. LÓPEZ, J., G. VALDEVIRA, A., P. PUENTE, P., B. MAYANZ, V., R. FAUSTINO, A. M. *Manual de dermatología de animales de compañía*. 2010.

Revistas y artículos

- Nº 1 Revista CITOS (Enero 2013). Revista de Citología Veterinaria.
- Nº 2 Revista CITOS (Abril 2013). Revista de Citología Veterinaria.
- Escalona Veloz, R. “Punción aspirativa con aguja fina para el diagnóstico de tumores en anatomía patológica”. Revistas de la biblioteca virtual en salud de Cuba. [23 de Mayo del 2011].
- Fernández, C., Jiménez de la Puerta, J. C., Aguilar, A. “Citología cutánea Veterinaria”. Rev. AVEPA vol. 23 nº 2, 2003.
- Llombart Bosch, A. “Tumores malignos de células redondas” (curso sobre tumores de partes blandas). XXI Congreso de la SEAP, 2003.

- Gordillo Cabrera, E. *"Manual práctico de toma y manejo de muestras en perros y gatos"*. Universidad Veracruzana, 2010. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx>
- Masserdotti, C. *"Architectural patterns in cytology: correlation with histology"*. Veterinary Clinical Pathology, vol. 35 nº 4. 2006.
- Bowlt, K. L., Newton, R., Murphy, S., Blackwood, L., Starkey, M. *"Prospective study to investigate the use of fine needle aspiration techniques in UK veterinary practice"*. Journal of Small Animal Practice (BSAVA). 2014.
- Bravo, D., Cruz-Casallas, P., Ochoa, J. *"Prevalencia de neoplasias en caninos en la universidad de los Llanos durante 2004 a 2007"*. Rev. MVZ Córdoba, vol. 15 nº 1, 2010.
- M. C. Martineau, M. *"Multicentric canine lymphoma in a 12-year-old keeshond: chemotherapy options"*. Can Vet J, Septiembre de 2002.
- A. Miller, M. et. al. *"Cutaneous Neoplasia in 340 cats"*. Veterinary Pathology, Septiembre de 1991.

Páginas web

- <https://uam.es> Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Patología Animal.
- <http://ocw.um.es/> Universidad de Murcia. Portal OpenCourseWare.

Blogs

- Borrás Múrcia, Daniel. *Blog de Citología y Anatomía Patológica* [blog]. [Consulta: 12 de mayo del 2015]. Disponible en: <https://patolvet.wordpress.com>
- Histovet. *Servicio de Diagnóstico Histopatológico Veterinario* [blog]. [Consulta: 14 de mayo del 2015]. Disponible en: <https://histovetblog.com>
- Clínica veterinaria Betúlia. *Historias veterinarias* [blog]. [Consulta: 11 de junio del 2015]. Disponible en: <https://historiasveterinarias.wordpress.com>



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria
