

La electroretinografía como método de diagnóstico en las especies canina y felinas.

Revisión bibliográfica

De León Vera M; Morales Fariña I.

Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. C/ Trasmontaña s/n. CP: 35416 - Arucas.

Electroretinography as a diagnostic method in dogs and cats

Palabras clave: Electroretinografía, ERG, visión, retina, perro, gato.

RESUMEN: La electroretinografía es un método de diagnóstico que estudia los problemas de funcionalidad en la retina porque registra la actividad eléctrica de ésta a través de estímulos luminosos. Mediante esta técnica se obtiene un gráfico llamado electroretinograma (ERG). Se trata de un procedimiento objetivo que se usa para valorar la actividad de la retina con el fin de diagnosticar enfermedades retinianas, además de para formular un pronóstico y para establecer un protocolo terapéutico adecuado.

SUMMARY: Electroretinography is a diagnostic method that studies functioning problems of the retina, since it registers the electric activity of the retina through light stimuli. A graph known as electroretinogram (ERG) is obtained with this technique. This is an objective procedure used to assess the activity of the retina for the diagnosis of retinal diseases, and the prognosis and establishment of an appropriate therapeutic protocol for a complete and precise attention of the patient.

La electroretinografía es un método de diagnóstico que registra la actividad eléctrica de la retina tras un estímulo luminoso. Es un procedimiento objetivo que se usa para valorar la funcionalidad de la retina con el fin de diagnosticar enfermedades retinianas, incluso aquellas que por ser muy incipientes no se detectan mediante oftalmoscopia y seguir su progresión^(9, 10, 17, 20, 21). La electroretinografía puede detectar alteraciones retinianas de meses a años antes de la aparición de signos oftalmoscópicos o de la aparición de signos clínicos. Las indicaciones más comunes para una electroretinografía son, la evaluación prequirúrgica en pacientes con cataratas, la evaluación de alteraciones que producen ceguera y la identificación de los daños retinianos producidos en pacientes con glaucoma^(7, 15). Además se puede usar como ayuda inicial en el diagnóstico de enfermedades retinianas congénitas^(15, 19).

Se trata de un examen complementario que está a disposición del clínico oftalmólogo o neurólogo y que no necesita la participación voluntaria del paciente.

Antecedentes históricos de la electroretinografía

Los fundamentos de la electroretinografía nacieron en 1849 cuando Du Bois Reymond evidenció la existencia de una diferencia de potencial de 6mV entre la córnea y el polo posterior del globo ocular, indicando que el fondo ocular tiene un potencial de reposo negativo y la córnea positivo. Doce años después, en 1861, Frithiof Holmgren demostró las variaciones de potencial eléctrico que sufría la retina tras la estimulación por la luz. Más tarde, en 1865, este electrofisiólogo, fue la primera persona en medir el poten-

cial de acción retiniano completo tras una estimulación luminosa, en una experiencia con ranas, realizando el primer Electroretinograma (ERG) en este animal. Además, en este estudio eliminó el segmento anterior del ojo y colocó un electrodo corneal directamente en la retina, descubriendo que la respuesta tenía origen en la propia retina. Por la misma época, Dewar demostró que los potenciales eléctricos descubiertos, podían grabarse en un ojo intacto de un animal, colocando el electrodo de referencia en la piel. El primer ERG en un hombre también lo realizó Dewar en 1877, en el cual los electrodos activo y de referencia, fueron conectados a un galvanómetro. Más de 30 años después, en 1908, Einthoven y Jolly describieron las tres ondas (a, b y c) de un electroretinograma, y Granit en 1933 explicó el origen de las distintas ondas.

En 1945 Adrian demostró la dualidad funcional de la retina. En el mismo año, Karpe introdujo la lente de contacto corneal. Estudios posteriores realizados por este autor, describen la aparición de distintos artefactos en el electroretinograma cuando esta lente es utilizada.

La electroretinografía clínica comenzó en 1950, cuando Karpe introdujo la electroretinografía como un test de diagnóstico rutinario para su uso en la oftalmología clínica y fue uno de los primeros en enfatizar la importancia del ERG como un método objetivo para analizar la función de la retina. Parry fue el primero en analizar perros adultos y cachorros me-



▲ Alteración de la transparencia de la córnea: queratitis pigmentaria que afecta a toda la córnea en un perro.



▲ Hemorragia vítrea en un gato.

dianete la electroretinografía. Rubin y Aguirre, veinte años más tarde, en 1970, desarrollaron un sistema para la electroretinografía mediante instrumentos de grabación más sensibles, para investigar anomalías retinianas en el ojo canino ^(7,18,21).

Fundamentos de la electroretinografía

La valoración de los procedimientos electrodiagnósticos está basada en análisis objetivos de cambios en los potenciales eléctricos entre distintas partes del sistema visual ^(17, 21).

El examen electroretinográfico se caracteriza por un trazado llamado electroretinograma, que es el registro de la respuesta eléctrica de la retina cuando ésta es estimulada por una fuente de luz ⁽²²⁾. El ERG no es una medida de la visión, es una medida de la integridad funcional de la retina, ya que tiene la finalidad de analizar la función de las dos primeras capas de la retina (el epitelio pigmentado de la retina y la capa de fotorreceptores) a través de su potencial eléctrico, que varía tras la actuación de estímulos luminosos ^(4, 17, 19, 21). En función al número de fotorreceptores puestos en actividad y a la su-

perficie retiniana funcional, obtenemos distintas respuestas. Toda alteración de la transparencia de los medios anteriores del globo ocular (córnea, cámara anterior, cámara posterior, cristalino, membrana hialoidea, vítreo), puede modificar el resultado del ERG ⁽¹⁷⁾.

El ojo es un dipolo en reposo con carga negativa en la retina y con carga positiva en la córnea. El valor de la diferencia entre el potencial de la retina y el de la córnea (tomada como referencia) se llama potencial córneo-retiniano. El principio de la electroretinografía es registrar este potencial, el cual se produce tras una estimulación luminosa ^(12, 17).

La respuesta de los conos y de los bastones depende del espectro de la luz utilizada (blanca, azul o roja), el nivel de luz (la respuesta será mayor en presencia de luz que en la oscuridad), el ambiente de luminosidad en el que se realice el examen (fotópico = en presencia de luz, o escotópico = a la oscuridad), y del estado de adaptación de la retina a la luz o a la oscuridad ^(17, 21).

El electroretinógrafo

El equipo necesario para la ejecución del examen electroretinográfico está constituido principalmente por los electrodos, por una fuente luminosa flash o fotoestimulador y por un aparato de amplificación y registro de la señal ⁽⁵⁾.

El sistema de estimulación electroretinográfica generalmente consiste en un flash de luz blanca que estimula la retina ⁽³⁾. Para producir una estimulación máxima se debe usar una luz de campo completo (Ganzfeld). Con flashes focales el área iluminada de la retina no es uniforme ^(11, 13, 14). El estimulador se debe colocar a 20-30 cm del ojo a examinar ⁽⁵⁾.

La captación del potencial eléctrico de la retina que se refleja a nivel corneal se efectúa por un sistema de electrodos. Los electrodos son conductores metálicos por medio de los cuales es posible transferir la señal bioeléctrica al amplificador ⁽⁵⁾.

Hay tres tipos de electrodos ^(11, 14, 19):

1. El electrodo activo o positivo, el cual se coloca intencionadamente cerca de donde se genera el potencial de acción. Los electrodos más utilizados son los electrodos de contacto corneal (llevan asociada una lente de contacto corneal) y los electrodos de aguja subcutánea.
2. El electrodo negativo o de referencia: Es un electrodo de voltaje cero que sirve como punto de referencia para los amplificadores. Se puede colocar en distintas posiciones, pero siempre en un área de silencio eléctrico, generalmente se coloca en el canto lateral del ojo. Pueden ser incorporados a la lente de contacto para hacer contacto con la conjuntiva (electrodos bipolares), aunque los más utilizados son los electrodos de aguja.
3. El electrodo de masa o de tierra, es un electrodo de aguja el cual se puede colocar en cualquier sitio del cuerpo del animal y va conectado a tierra. Las localizaciones típicas son en la frente o en la oreja del animal.

Estudio del electroretinograma

Tras la estimulación con el flash, la retina va a emitir una serie de potenciales eléctricos, que se generan por el cambio producido en el potencial de membrana de todas las células de la retina. Estos potenciales eléctricos son registrados por el electroretinógrafo, el cual refleja la diferencia entre el valor del potencial de la retina y el de la córnea (tomada como referencia) por medio de un gráfico ⁽¹⁰⁾.



▲ Catarata madura completa en un perro.

Gráfico 1. Ondas a, b, c, d y potenciales oscilatorios del ERG.

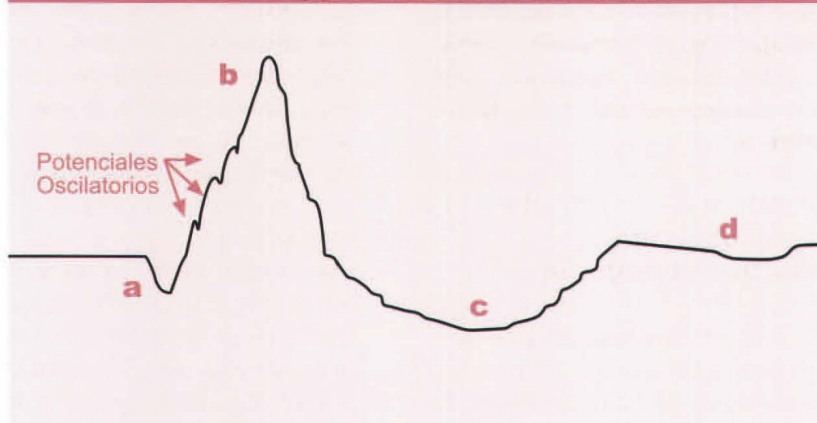
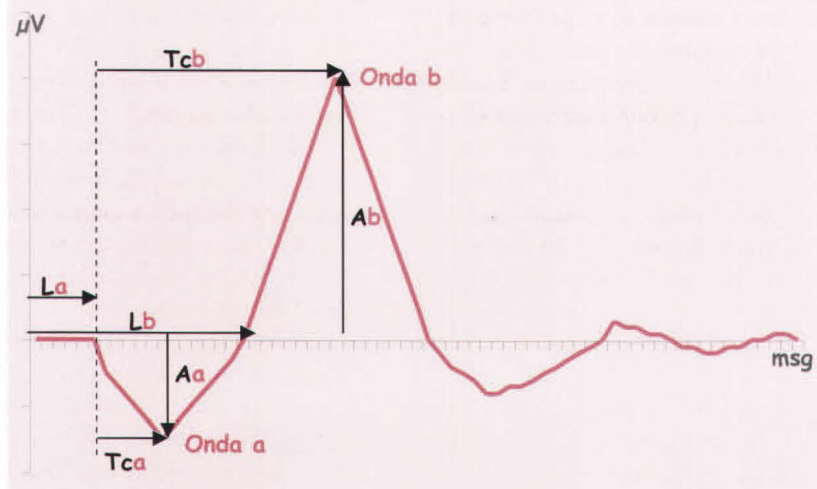


Gráfico 2. Gráfico del análisis del electroretinograma (ondas a y b), en el que se detallan: La (Latencia de la onda a), Lb (Latencia de la onda b), Tca (Tiempo de culminación de la onda a), Tcb (Tiempo de culminación de la onda b), Aa (Amplitud de la onda a), Ab (Amplitud de la onda b).



1. Tipos de electroretinogramas

A. ERG FLASH: Consiste en una estimulación, realizada con un flash de luz, breve y repetida en el tiempo, de las células visuales, realizada a baja frecuencia, de 0,02 a 5 Hz (=Hertz) (los Hz son los ciclos por segundo -cps-, 1Hz = 1 cps), que permite al sistema visual evolucionar libremente (5,6,7,10,17,18,21)

Los componentes del trazado son (Gráfico 1):

a. **Onda a:** Primera onda del trazado. Es una onda negativa que se genera en la capa externa de los fotorreceptores. Se divide en una onda a1 (actividad de los conos), que es una onda fotópica, por lo que se mide en presencia de luz, y una onda a2 (actividad de los bastones), que se trata de una

onda escotópica, que se mide tras la adaptación a la oscuridad.

b. **Onda b:** Sigue a la onda a. Se trata de una onda positiva que se origina en la capa nuclear interna, células bipolares y células de Müller. Se divide en una onda b1 (actividad de las células bipolares, de las células de Müller y de los conos), que se mide en ambiente fotópico y con luz blanca, y también en ambiente escotópico con luz roja (obtenemos una onda b1 alta), y una onda b2 (actividad de las células bipolares, de las células de Müller y de los bastones), que se mide en ambiente escotópico y con luz azul (obtenemos una onda b2 amplia). Como los bastones son más numerosos que los conos, la amplitud de la onda b2

será mayor que la amplitud de la onda b1.

c. **Potenciales oscilatorios:** Se localizan entre la onda a y la onda b, en la parte ascendente de la onda b. Son el reflejo de la actividad de las células de las capas internas de la retina, principalmente de las células amacrin.

d. **Onda c:** Sigue a la onda b, a menudo continúa aunque haya terminado el estímulo luminoso. Es una onda negativa en perros y positiva en otros mamíferos, que indica la depolarización del epitelio pigmentado (16). Es una onda difícilmente mesurable que carece de significación clínica.

e. **Onda d:** Es una pequeña ondulación cerca del final de la onda c, que se inicia cuando cesa el estímulo luminoso. Deriva de la caída del potencial de recepción de las células.

Las ondas a y b tienen un gran significado clínico, representando la actividad de los conos (fotópica) y de los bastones (escotópica).

B. ERG Flicker: Consiste en la estimulación de la retina de forma rápida (parpadeo de luz) (11). No permite al sistema visual evolucionar libremente (17). Las respuestas de los conos se aíslan mejor con estímulos de más alta intensidad o frecuencia (≥ 30 Hz), mientras que los bastones se aíslan por debajo del umbral de los conos, a estímulos de menor intensidad o frecuencia (< 20 Hz) (1,4,5,12).

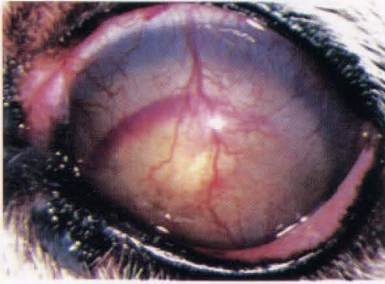
2. Análisis del electroretinograma

Para poder interpretar un electroretinograma (ERG) tenemos que tener en cuenta los siguientes factores (6,21) (Gráfico 2):

• **Morfología de las ondas:** El tamaño y la forma de las ondas del ERG dependen de la especie, la raza y la edad del animal testado, así como del tipo e intensidad del estímulo luminoso, del equipo de grabación y del estado fisiológico o patológico de la retina (1). Es un dato muy importante puesto que si no se aprecian las ondas a y b, se trata de un



▲ Gato con midriasis bilateral por ceguera.



▲ Glaucoma agudo en un perro. Se observan edema endotelial y vascularización corneal superficial y profunda y midriasis.

ERG plano, lo cual indica que los fotorreceptores no responden al estímulo luminoso.

- **Amplitud (mv):** Tamaño de las ondas. Indica si hay daños en el sistema fotópico o escotópico.
- **Tiempo de latencia (mseg):** Tiempo transcurrido entre el inicio de la estimulación y el inicio de la respuesta. Con esta medida se aprecia la vitalidad de la retina.
- **Tiempo de culminación (implicit time) (mseg):** Tiempo transcurrido entre el inicio de la respuesta y la respuesta máxima (pico de la onda). Da información sobre la calidad de la respuesta.

3. Patrón de Normalidad

Para poder interpretar un ERG, hay que establecer un patrón de normalidad, ya que cada aparato tiene unos valores propios, el cual es necesario para poder utilizar el examen con toda fiabilidad. Por esto se recomienda que cada laboratorio establezca sus valores normales para su propio equipo y sus pacientes ^(11,14).

La sucesión normal de las ondas consiste en una onda inicial negativa (onda a), seguida por una onda positiva más lenta (onda b), finalizando con una onda negativa, en algunos

casos positiva, llamada onda c. Bajo las condiciones usadas normalmente en oftalmología veterinaria, la onda c generalmente no es aparente y no se considera esencial en los ERGs clínicos ⁽¹⁾.

Parámetros a controlar al realizar una electroretinografía

Las características del ERG dependen de una serie de factores, los cuales hay que monitorizar y minimizar, de manera que se pueda establecer un protocolo para evaluar el ERG ^(7,10,17):

- El ambiente en el que se realiza el examen:** El nivel luminoso del ambiente en el que se efectúa el examen, fotópico (presencia de luz) o escotópico (en la oscuridad), permite seleccionar el tipo de fotorreceptor que se desea estudiar ^(11,14). La sensibilidad de los bastones es mucho mayor que la de los conos. La respuesta de los bastones requiere la adaptación a la oscuridad y un estímulo relativamente débil, mientras que la respuesta de los conos requiere un estímulo brillante que altere el estado de adaptación a la oscuridad ^(1,7).
- Las características de la estimulación:** La estimulación se caracteriza por su composición espectral (coloreada o no), su nivel energético (fotópico o escotópico) y la frecuencia a la que es emitida. Para poder registrar un ERG es necesario poner en actividad la retina, mediante una variación breve de la estimulación. La estimulación breve, repetida en el tiempo a baja frecuencia (0,02 a 5 Hz) permite registrar los ERGs flash. Mientras que la estimulación breve, repetida en el tiempo a una frecuencia más elevada (20 a 30 Hz) permite registrar los ERGs flicker. El conocimiento de las curvas de sensibilidad espectral de los fotorreceptores de cada especie testada y de las curvas de absorción espectral de los filtros colorimé-

tricos utilizados, es un requisito indispensable para la utilización de estimulaciones cromáticas. Un buen conocimiento de todos estos factores permite separar la actividad de los diferentes tipos de fotorreceptores (conos y bastones) así como separar la actividad de los diferentes tipos de conos.

- Adaptación de la retina a la luz:** El ERG traduce la diferencia entre el valor del potencial de la retina y de la córnea, éste último tomado como referencia. Por lo tanto conviene efectuar esta medida cuando la adaptación de la retina a la luz o a la oscuridad es estable. Para ello son necesarias al menos dos horas para que la retina se adapte de manera estable a la luz y al menos 30 minutos para que se adapte de manera estable a la oscuridad ⁽¹¹⁾. El cambio de fotópico a escotópico en el ERG durante la adaptación a la oscuridad depende de la intensidad y duración del estado de adaptación así como de la intensidad del estímulo.
- Posición y tipo de electrodos:** La posición y el tipo de electrodos afectan el nivel de ruido de fondo y la amplitud del ERG.
- Las características del paciente:** El conocimiento de la anatomía y de la fisiología específicas de los sistemas visuales de cada especie testada, es un requisito indispensable para el establecimiento de un protocolo y para la interpretación de los resultados. En el perro, los conos son menos numerosos que los bastones y su densidad crece a medida que se sitúan en la zona central. Además, en el perro, existe una gran variabilidad morfológica del tamaño de los globos y de la distancia interpupilar. Esta variabilidad igualmente se aplica a la presencia o no de un tapetum lucidum en el que la superficie es variable de un individuo a otro. La raza también influye ya que hay patologías oculares específicas de la raza. Por lo tanto, debemos tener en cuenta todos estos parámetros en la in-

interpretación de los resultados, puesto que la calidad de la señal recogida depende de la iluminación retiniana.

- f. **Edad del paciente:** El ERG en los neonatos es, generalmente más bajo en amplitud que en el animal adulto. En cachorros de 1 ó 2 semanas de edad no obtenemos lectura al realizar la electroretinografía, sin embargo, a las 8 semanas de edad, la lectura que obtenemos ya se asemeja a la de un animal adulto. A medida que el animal crece, las amplitudes disminuyen y los tiempos de culminación aumentan. Además, hay alteraciones retinianas específicas de la edad. Por lo tanto se deben establecer valores normales de electroretinogramas por grupos de edades.
- g. **Transparencia de los medios oculares e integridad retiniana:** Las opacidades oculares tales como edema corneal, hemorragia intraocular y cataratas, pueden alterar las amplitudes del ERG. Así mismo, las distintas alteraciones retinianas son capaces de producir distintos tipos de alteraciones en el ERG.
- h. **Reducción de la circulación retiniana:** Se van a ver afectados los distintos componentes y las amplitudes del ERG. Los pequeños cambios en la circulación ocular afectan a la onda b, pudiendo alterar de forma leve a la onda a. Una mayor reducción de la circulación produce una gran disminución o extinción de la onda b, quedando la onda a bien definida. Embolias en la vena y arteria retiniana central en humanos, resultan en respuestas negativas del ERG.
- i. **Profundidad y tipo de anestesia:** En la práctica, el perro debe estar anestesiado. La anestesia debe cumplir varios criterios: poder realizar un protocolo de aproximadamente 30 minutos, no modificar las características de los ERGs o modificarlos poco y permitir una buena miorelajación con el fin de evitar el registro de electromiogramas parásitos.

- j. **Tóxicos:** La electroretinografía puede ser una herramienta útil para evaluar la toxicidad ocular de ciertas sustancias químicas o fármacos asociados a la actividad de la colinesterasa, como por ejemplo la fisostigmina.
- k. **Hipoxia:** La electroretinografía es extremadamente sensible a la hipoxia. Cuando los niveles de oxígeno descienden en la sangre, la forma de las ondas en el ERG disminuyen notablemente, incluso un minuto después del comienzo de la hipoxia.
- l. **Movimientos oculares:** En oftalmología veterinaria los movimientos oculares no son un problema, ya que el análisis electroretinográfico se realiza generalmente con el animal anestesiado.
- m. **Tamaño pupilar:** Para que la iluminación retiniana sea máxima y constante, conviene dilatar las pupilas. En el perro la máxima dilatación pupilar se consigue generalmente tras la aplicación tópica de tropicamida al 1%, aunque también se pueden usar tropicamida al 0,5% o atropina al 1%. Además hay que fijar el globo ocular, para evitar que éste bascule y se produzca un prolapso de la membrana nictitante, ligados a la anestesia, y mantener los párpados abiertos durante todo el examen, lo cual se consigue con la ayuda de un blefarostato.
- n. **Tipo de solución de continuidad en la lente de contacto:** las soluciones de continuidad deben tener iones. Se utilizan para favorecer el contacto de la lente con la córnea.
- o. **El tratamiento de la señal:** El tratamiento de la señal registrada es indispensable para que el ERG sea discriminatorio del ruido de fondo electromiográfico. La señal recogida debe estar amplificada, filtrada por unos filtros electrónicos, y digitalizada. En general la suma de cinco respuestas provocadas por la repetición de una estimulación cinco veces seguidas es suficiente para obtener una señal discernible del ruido de fondo.



▲ Alteración de la transparencia corneal: edema y vascularización superficial en un perro.

Examen electroretinográfico: Protocolo

La realización práctica de la electroretinografía debe tener en cuenta una serie de factores ligados al animal (anestesia, fijación de los globos, dilatación pupilar y mantenimiento de los párpados abiertos) y otras ligadas al examen (ambiente, estado de adaptación retiniano, nivel luminoso de la estimulación y la frecuencia temporal de la estimulación) ^(10,17,21).

En la valoración oftalmológica del paciente, se debe analizar la capacidad visual mediante la realización del test de la amenaza y del algodón, y de la valoración de los reflejos pupilares. Hay que evaluar también el segmento anterior del globo ocular mediante el uso de la lámpara de hendidura y el segmento posterior mediante oftalmoscopia directa e indirecta ⁽⁴⁾.

El procedimiento del examen electroretinográfico se estandarizó inicialmente en Medicina Humana, por la International Society for Visual Electrophysiology of Vision (ISCEV), en 1989 ⁽¹¹⁾. En el año 2000, se aprobó el primer estándar en Medicina Veterinaria, para la especie canina, por el European College of Veterinary Ophthalmology (ECVO) ⁽¹⁴⁾.

1. Estándar aprobado para Medicina Veterinaria (Especie Canina)⁽¹⁴⁾:

Los párpados tienen que permanecer abiertos y las pupilas completamente dilatadas y centradas con respecto al estímulo luminoso, durante todo el examen.



▲ Hifema en cámara anterior producido como complicación de una cirugía de cataratas en un perro.

Se recomienda el uso de un electrodo activo con lente de contacto corneal, aunque se pueden usar otro tipo de electrodos, colocar el electrodo de referencia a la mitad entre el canto lateral del ojo y la oreja y, finalmente, posicionar el electrodo de tierra en una localización indiferente, como en la oreja. La impedancia de los electrodos debe mantenerse por debajo de 5 kw.

El paciente tiene que estar bajo anestesia general, ya que la sedación es insuficiente para realizar el ERG en el perro.

Para la estimulación luminosa de la retina, se propone el uso de un flash de campo completo, como un estimulador Ganzfeld^(13,14). El estímulo luminoso se debe realizar con luz blanca. No es obligatorio el uso de estímulos cromáticos, aunque se recomienda su uso.

Las respuestas que se deben medir son:

- Respuesta de los bastones: Se miden tras un periodo de adaptación a la oscuridad de, como mínimo, 20 minutos. El examen consta de una estimulación cada 5 minutos (realizando un total de 4 respuestas durante los 20 minutos), en respuesta a un estímulo de baja intensidad, realizadas con una frecuencia igual o inferior a 0,5 Hz. Se debe usar la luz blanca, aunque también se recomiendan los filtros cromáticos.
- Flicker de los bastones: Se debe evaluar mediante la utilización de un estímulo de baja frecuencia, de 10 Hz, tras la evaluación de los bastones a la adaptación a la oscuridad.

- Respuesta mixta de conos y bastones: Consiste en la respuesta a un flash de alta intensidad, tras un periodo de adaptación a la oscuridad o tras el test del flicker de los bastones.
- Respuesta de los conos: El perro tiene que estar adaptado a la luz durante un periodo mínimo de 10 minutos. El flash utilizado tiene que ser de alta intensidad, el cual se llama Flash Estándar. Un único flash es suficiente para evaluar la función de los conos, aunque se pueden realizar 16 ó más flashes y posteriormente hacer la media. La frecuencia del flash utilizado debe estar entre 4,9 – 5,1 Hz. Se debe usar la luz blanca, aunque también se recomiendan los filtros cromáticos.
- Flicker de los conos: Se mide con un estímulo de alta frecuencia, de 50 Hz, usando la intensidad del Flash Estándar.

Se podrán utilizar dos tipos de protocolos en función del estudio que se vaya a realizar:

- Protocolo recomendado para pacientes candidatos a la cirugía de cataratas: Este protocolo está encaminado a determinar rápidamente la función retiniana. Consta de 3 pasos: una adaptación a la oscuridad de 5 minutos, el análisis de la función de los bastones usando un solo flash de baja intensidad y por último, el examen de la función mixta de conos y bastones mediante un estímulo de alta intensidad.
- Protocolo recomendado para el diagnóstico de enfermedades de los fotorreceptores: Consta de 6 pasos: a) adaptación a la oscuridad durante 20 minutos, mientras se evalúa la función de los bastones y el proceso dinámico de adaptación a la oscuridad cada 5 minutos; b) realizar el flicker de los bastones; c) test de la respuesta mixta de conos y bastones; d) adaptación a la luz durante 10 minutos; e) análisis de la función de los conos; f) flicker de los conos.

2. Otras recomendaciones en Medicina Veterinaria⁽²¹⁾:

Los protocolos deben ser simples, cortos, reproducibles y dar un máximo de informaciones. El protocolo mínimo debe constar de:

- Respuesta de los fotorreceptores (conos y bastones) utilizando un estímulo de alta intensidad en un ojo adaptado a la oscuridad.
- Respuesta de los bastones usando un estímulo de baja intensidad (luz azul) en un ojo adaptado a la oscuridad.
- Respuesta de los conos usando un estímulo de alta intensidad en un ojo adaptado a la luz.
- Respuesta obtenida con un estímulo luminoso rápido y repetido: Flicker.

Interpretación del electroretinograma

El estándar para la electroretinografía en perros, aceptado por la ECVO, especifica los parámetros que deben medirse en un ERG⁽¹⁴⁾:

- Amplitud de la onda a: medida desde la base hasta la depresión de la onda a.
- Amplitud de la onda b: medida desde la base de la onda a, hasta el pico de la onda b.
- Tiempo de culminación (Implicit time) de las ondas a y b: medido desde el comienzo del estímulo hasta la base de la onda a y hasta el pico de la onda b, respectivamente.

Indicaciones de la electroretinografía

Este examen sólo se debe realizar en un contexto clínico preciso y el resultado se obtiene de la interpretación del conjunto de la exploración electrofisiológica.

El ERG se puede utilizar cada vez que se investiga el funcionamiento global de la retina en su conjunto o de una clase específica de fotorreceptores. El estudio está indicado en los siguientes casos^(5,10,17):



▲ Catarata madura identificada mediante lámpara de hendidura en un perro.

- **Alteración de la transparencia de la córnea, anomalías del iris** (asociadas a las de la retina), **anomalías de la transparencia del cristalino** (cataratas) y **anomalías del vítreo** (hemorragias, hialitis, cuerpos extraños).
- **Evaluación prequirúrgica en pacientes con cataratas:** La extracción quirúrgica de la catarata mejora la visión sólo si la retina es funcional. Es necesario porque muchas razas que tienen predisposición a desarrollar cataratas, pueden también tener atrofia progresiva de la retina (PRA) hereditaria ^(7,22). Por lo tanto, la condición de la retina debe evaluarse antes de realizar la cirugía de cataratas. Muchas veces la retina no puede evaluarse mediante oftalmoscopia porque la lente está opaca. El método más exacto para evaluar la función retiniana es la electroretinografía. El ERG permite proponer una indicación operatoria de cirugía de extracción del cristalino y de indicar cuál de los ojos presenta una mejor respuesta.
- **Ceguera:** La causa de la ceguera puede estar localizada en el globo, en el nervio óptico o en el cerebro. El ERG está indicado para diferenciar entre enfermedad retiniana y no retiniana ⁽¹⁾. Incluso si la exploración oftalmológica no revela ninguna anomalía, la ceguera puede estar causada por una lesión en la retina. Por lo tanto la electroretinografía es una herramienta útil en estos casos.
- **Alteraciones de la retina:** La degeneración retiniana puede producirse por alteraciones en la capa de fotorreceptores (degeneración

o displasia) o bien por alteraciones del epitelio pigmentado de la retina. El ERG ayuda a determinar la degeneración de la retina, especialmente en estadios tempranos cuando las alteraciones no son visibles oftalmoscópicamente ⁽²²⁾. En muchas razas caninas la degeneración o displasia retiniana es una característica hereditaria, aunque también se puede producir secundariamente a inflamaciones de la retina, de la coroides o de ambas.

En el animal es muy difícil realizar una aproximación tan precisa como en una exploración funcional humana y a menudo el ERG se practica cuando las lesiones están muy evolucionadas y entrañan una modificación del funcionamiento del conjunto de la retina.

En los casos de enfermedad retiniana, en el ERG se puede afectar la amplitud, el tiempo de culminación o ambos, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad retiniana. Si los daños retinianos son focales, hay una disminución de la amplitud, pero no se producen cambios en el tiempo de culminación de las ondas a y b. En casos de desórdenes generalizados de los fotorreceptores, aparece una prolongación del tiempo de culminación y reducción de las amplitudes de las ondas a y b.

- **Localización de alteraciones en la retina:** El ERG permite dissociar el funcionamiento del conjunto de los conos del conjunto de los bastones ⁽²²⁾. Teniendo en cuenta que los bastones están mayoritariamente localizados en la periferia, si el conjunto de los bastones presenta una disfunción, podemos pensar que la retina periférica es disfuncional. Si el conjunto de los conos presenta una disfunción, podemos pensar que existe una disfuncionalidad en el área central, que es donde la población de conos es más densa, en la retina canina ⁽⁸⁾.

- **Glaucoma:** Es una enfermedad muy compleja que produce alteraciones en la retina y en el nervio óptico. El principal factor de riesgo es el aumento de la presión intraocular. Dado que las células ganglionares son las que primero se afectan, los resultados del ERG flash son normales durante los estadios iniciales de la enfermedad. Sólo en los estadios tardíos, cuando las otras capas de la retina también están afectadas, aparecen anomalías en el ERG. El trazado electroretinográfico está considerado una herramienta útil para cuantificar el daño a nivel de las células ganglionares de la retina.
- **Trastornos del comportamiento:** El ERG puede ser un examen complementario, útil para el especialista ante una modificación del comportamiento en ausencia de signos clínicos u oftalmológicos.

Aplicación clínica y variaciones patológicas del ERG

La electroretinografía es una suma de respuestas y puede no detectar lesiones retinianas focales ^(1,22).

Podemos encontrar alteraciones patológicas del ERG, en distintas alteraciones, tanto adquiridas como congénitas ^(1,2,4,5,7,10,14,18,19,21,22).

- A. **Alteraciones adquiridas:** Queratitis y edemas corneales completos; Inflamaciones (uveítis), que cursan con inflamación de la retina, la coroides o ambas, que producen degeneración retiniana; Cataratas; Glaucoma; Atrofia de retina; Degeneración súbita adquirida de la retina (SARD); Degeneración central retiniana felina por déficit de Tiamina; Distrofia epitelial pigmentaria; Retinopatía; Lesiones focales en la retina; Desprendimiento focal de la retina; Desprendimiento generalizado de la retina; Trastorno circulatorio arterial debido a una isquemia; Alteraciones vasculares en la retina (diabetes, hipoxia); Trastorno ve-

noso en la retina; Neuritis óptica y atrofia óptica; Ceguera cortical; Retinopatía Diabética.

- B. Alteraciones hereditarias o congénitas:** Atrofia progresiva de la retina (PRA); Distrofia de conos y bastones (PRA) en Caniche enano y Cocker Spaniel; Displasia retiniana congénita; Displasia de conos y bastones (PRA) en Setter Irlandés y Collie; Displasia de bastones (PRA) y degeneración retiniana temprana en Elkhounds Noruegos; Atrofia central de la retina en Pastor Briard; Degeneración retiniana hereditaria en razas pequeñas; Displasia de fotorreceptores en Schnauzer miniatura; Hemeralopía (ceguera diurna) en la raza Alaska Malamute; Nictalopía congénita (ceguera nocturna); Distrofia muscular en la raza Golden Retriever.

Bibliografía

- 1.- Acland GM. Diagnosis and differentiation of retinal diseases in small animals by electroretinography. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)*, 1988; 3(1): 15-27.
- 2.- Bedford PGC. Control of inherited retinal degeneration in dogs and cats in the United Kingdom. *J Small Anim Pract*, 1989; 30: 172-177.
- 3.- Chevalerand JP. Phénomènes électriques. *Encycl. Med. Chir. Paris, France. Ophthalmologie* 21027. A10, 1990.
- 4.- De Gresti A, Mertel L, Villa A. Esperienze di elettroretinografia clinica in alcuni casi di cecità nel cane. *Veterinaria*, 1995; 9 (3): 103-109.
- 5.- Dodi PL. Aggiornamenti di elettroretinografia (ERG) nel cane. *Istituto di Clinica Medica Veterinaria dell'Università di Parma. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Iniversità di Parma*, 1999; 19 (23 ref): 207-215.
- 6.- Gouras P. Electroretinography : some basic principles. *Invest Ophthalmol*, 1970; 9: 557.
- 7.- Gum GG. Electrophysiology in veterinary ophthalmology. *Vet Clin N Am-Small*, 1980; 10(2): 437-454.
- 8.- Koch SA, Rubin LF. Distribution of cones in retina of the normal dog. *Am J Vet Res*, 1972; 33(2): 361-363.
- 9.- Komaromy AM, Smith PJ, Brooks DE. Electroretinography in dogs and cats. Part I. Retinal morphology and physiology. *The Compendium. Small Animal*, 1998; 20 (3): 343-350.
- 10.- Komaromy AM, Smith PJ, Brooks DE. Electroretinography in dogs and cats. Part II. Technique, Interpretation and Indications. *The compendium. Small Animal*, 1998; 20(3): 355-365.
- 11.- Marmor MF, Zrenner E (for the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision -ISCEV-). Standard for clinical electroretinography (1999 Update). *Doc Ophthalmol*, 1998; 97: 143-156.
- 12.- Mertel L, de Gresti A. Prime esperienze di elettroretinografia clinica (ERG) nel cane normale. *Atti Sisvet*, 1993; XLVII: 2257-2261,.
- 13.- Narfström K, Anderson BE, Andreasson S, Gouras P. Clinical electroretinography in the dog with ganzfeld stimulation: a practical method of examing rod and cone function. *Doc Ophthalmol*, 1995; 90(3): 279-290.
- 14.- Narfström K, Eksten B, Rosolen SG, Spiess BM, Percicot CL, Ofri R, Guidelines for clinical electroretinography in the dog. *Doc Ophthalmol*, 2002; 105(2):83-92.
- 15.- Ofri R. Clinical electrophysiology in veterinary ophthalmology. The past, present and future. *Doc Ophthalmol*, 2002; 104 (1): 5-16.
- 16.- Parry HB, Tansley K, Thomson LC. The electroretinogram of the dog. *J Physiol*, 1953; 120: 28-40.
- 17.- Rosolen SG, Lazard P, Isard PF, Rigaudiere F. Electrophysiologie sensorielle visuelle. *L'électrorétinogramme du chien. Societe Française d'Etudes et de Recherches en Ophtalmologie Vétérinaire (SFEROV)*, 2000.
- 18.- Roze M. Valeur de l'électrorétinographie en ophtalmologie canine. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, 1987; 2: 97-104.
- 19.- Rubin LF. Clinical electroretinography in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1967;151(11): 1456-1569.
- 20.- Scagliotti RH. Comparative neuro-ophthalmology. En: *Veterinary Ophthalmology*, ed por: Kirk N. Gelatt. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 3ª edition. Pensilvania, EE.UU. 1999. Capítulo 36: 1307-1400.
- 21.- Sims MH. Electrodiagnostic evaluation of vision. En: *Veterinary Ophthalmology*, ed por: Kirk N. Gelatt. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 3ª edition. Pensilvania, EE.UU. 1999. Capítulo 12: 483-507.
- 22.- Slatter D. Retina. En: *Fundamentals of veterinary ophthalmology*, ed por: Douglas Slatter. Ed. WB Saunders Company, 3ª edición. Filadelfia, Pensilvania, EE.UU. 2001. Capítulo 16: 419-456.

Introducción a la citología diagnóstica en medicina veterinaria

Rollón Mayordomo¹, E. y Martín de las Mulas, J.²

¹Clínica Veterinaria Canymar, Granja de San Ildefonso, 5. 11007 Cádiz. ²Dpto. de A. y Anatomía Patológica Comparadas Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba 14014 Córdoba.

Introducción

Los procedimientos de diagnóstico citológico son casi tan antiguos como el descubrimiento de las células como elementos básicos de todo organismo vivo y la elaboración de la teoría celular. Sin embargo, este método diagnóstico no se desarrolló de manera plena hasta la década de los 70 del siglo pasado tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Ahora bien, desde un punto de vista evolutivo la historia es algo diferente entre ambas, ya que en medicina humana algunos historiadores han rastreado el origen de la biopsia por punción aspiración con aguja fina hasta una publicación del año 1847 firmada por M. Kun.

En Estados Unidos, el procedimiento de la "biopsia por punción con aguja y aspiración" fue introducido por Martin y Ellis en el Memorial Hospital de Nueva York alrededor del año 1925 (12), y cinco años después publicaron sus resultados con el uso de esta técnica diagnóstica en 65 pacientes con tumores malignos (25). El doctor Martin inició entonces una estrecha colaboración con el doctor Stewart, que era un renombrado y distinguido anatomopatólogo quirúrgico, colaboración que se prolongó durante 20 ó 30 años, y aunque publicaron sus resultados sobre 2500 tumores biopsiados por este método (37), el uso de la citología diagnóstica no se extendió a otras instituciones debido, según diversos autores, al rápido crecimiento del campo de la histopatología en Estados Unidos durante las décadas de los 40, 50 y 60.

En Europa, la punción aspiración con aguja fina adquirió gran popularidad en la década de los 50

debido a la escasez de anatomopatólogos cualificados (24), siendo sus principales difusores dos médicos con una sólida formación en hematología y medicina clínica: el doctor López-Cardozo en Holanda y el doctor Soderstrom en Suecia. Estos dos médicos introdujeron un cambio importante en la técnica de la biopsia por PAAF: el uso de la aguja de 22 gauge o más (con un diámetro externo de 0'6 mm o menos), que es el que se usa hoy día, en vez de la aguja de 18 gauge que usaba el doctor Martin en el Memorial Hospital de Nueva York. En realidad, fueron los europeos los que contribuyeron al auge de la biopsia por PAAF que tuvo lugar a finales de la década de los 70, al publicar grandes series de casos en los que demostraban la relativa simplicidad y precisión diagnóstica del método, así como sus limitaciones.

Aunque el florecimiento de la citología veterinaria tuvo también lugar en la década de los 70, existen pocos datos de su uso rutinario anterior a estas fechas. Alrededor de la década de los 70 ya aparecieron los primeros artículos y manuales de citología veterinaria en Estados Unidos (8, 32, 33, 34 y 35). La Facultad de Veterinaria de la Universidad de California fue pionera en el uso de la biopsia por punción aspiración con aguja fina (PAAF) en Medicina Veterinaria, y según la doctora O'Rourke, ha evolucionado, esencialmente, como una extensión de la hematología, usando métodos similares de preparación de los frotis y de tinción (31). Los doctores Cowell y Tyler publicaron en 1979 un manual para el diagnóstico citológico (5), del que ya han salido dos ediciones más, una en 1989 y la última en 1999 (6 y 7).

En Europa, la introducción rutinaria de la biopsia por PAAF fue algo más tardía. En la década de los 80 aparecen ya publicaciones acerca de los métodos de toma, preparación y estudio de las muestras así como de fiabilidad diagnóstica (9 y 10). Un poco más tarde, el doctor Larkin, publica su experiencia con este método, que inició durante su estancia en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de California en 1987 (23). En Francia, la experiencia de un grupo muy activo en el uso de este método diagnóstico se plasmó, ya en la década de los 90, en la realización de cursos de difusión internacional y en la publicación de un libro (11). Los doctores Ted van den Ingh y Jan Vos, aprendieron las técnicas de preparación, estudio e interpretación de las biopsias por PAAF, y tras publicar, en el año 1989, un manual de los aspectos técnicos de la citología por aspiración con aguja fina (20), iniciaron lo que hoy en día es un método rutinario de diagnóstico. Poco después publicaron los resultados obtenidos en el estudio comparado citológico e histológico de 348 lesiones caninas de distintas localizaciones (40). En otros países de Europa, incluida España, no se han publicado manuales de distribución internacional, pero hoy día la citología es una técnica de diagnóstico eficaz muy extendida en consultorios, clínicas y hospitales.

La citología diagnóstica

1. Definiciones

La **citología** es la ciencia que se ocupa del estudio de las células de un tejido con independencia de la arquitectura de la lesión y de la disposición de las células en

dicha lesión. La **citología no exfoliativa** o citología exfoliativa artificial se ocupa del estudio de células que han sido obtenidas mediante distintos métodos de extracción (1).

La **punción con aguja fina** es el método más usado en la práctica clínica para obtener muestras de masas sólidas tanto superficiales como profundas. El material necesario para su realización es sencillo (una aguja de 22 gauge y una jeringa, portaobjetos y productos de tinción citológica) y la técnica es rápida (tanto en lo que respecta a la toma y preparación de la muestra como a la emisión del diagnóstico), inocua (la morbilidad es insignificante y no suele haber complicaciones) y barata, pudiendo realizarse sin anestesia ni sedación en pacientes ambulatorios.

La **impronta** es una muestra de tejido tomada mediante toques de la superficie de la masa objeto de estudio con un portaobjetos. Goza de las ventajas de la PAAF en cuanto a sencillez, rapidez, inocuidad y bajo coste, pero sus indicaciones están limitadas a:

- 1) Estudios intraoperatorios, como apoyo al plan quirúrgico (límites de resección libres de neoplasia; requerimiento de los propietarios de confirmación del diagnóstico de neoplasia maligna no tratable para proceder a la eutanasia en el mismo acto quirúrgico; determinación del tipo de neoplasia por si pudiera ser tratada con radioterapia intraoperatoria) (38). En la especie humana se ha comprobado su eficacia para conocer la afección del ganglio linfático regional en el caso de melanoma maligno, evitando un segundo procedimiento quirúrgico aproximadamente en la mitad de los pacientes con afección ganglionar (19).
- 2) Diagnósticos rápidos de masas extirpadas con el fin de orientar el tratamiento en tanto en cuanto llega el informe histopatológico.

2. Indicaciones y uso

Las principales indicaciones de la citología diagnóstica o citopatología son: 1) La diferenciación entre la naturaleza reactiva o neoplásica de una lesión; y 2) La clasificación de las neoplasias en benignas o malignas (2, 7, 17, 27, 33 y 36). Una tercera indicación es la identificación del origen celular de las neoplasias.

En el campo de la oncología, la citología diagnóstica tiene, además, unas indicaciones más precisas, sobre todo cuando se requiere información adicional para instaurar un tratamiento y para apoyar o descartar una estrategia quirúrgica concreta (27). Algunas de las indicaciones de la citología diagnóstica en oncología sería en derrames torácicos y abdominales, en lavados prostáticos, linfadenopatía, masa cutánea /subcutánea, etc.

3. Fiabilidad Diagnóstica

La fiabilidad diagnóstica de la citología es la probabilidad de que los diagnósticos emitidos sean certeros.

3.1. Factores involucrados

La fiabilidad diagnóstica de la citología depende de dos factores fundamentales: la obtención de una muestra de calidad, que a su vez depende, básicamente, de la experiencia de la persona que la obtiene aunque también influye el tipo de lesión y, en segundo lugar, de la correcta interpretación microscópica (28 y 31). Siempre ha existido controversia acerca de quién debería realizar el estudio e interpretación de la citología, el clínico que realiza la toma o el anatomopatólogo, y sigue habiendo partidarios de ambos. La hipotética consecución de estos objetivos (la obtención de una muestra de calidad y la correcta interpretación microscópica) se evalúa mediante el análisis de la eficacia de la citología no exfoliativa, bien sea por PAAF o por impronta, eficacia que se puede establecer de acuer-

do con dos criterios: 1) La evaluación histológica de la lesión, y / o 2) El seguimiento del paciente (en el caso de los tumores malignos).

3.2. Citología no exfoliativa

La citología no exfoliativa se considera hoy día un método de diagnóstico fiable en la especie humana. Los estudios de eficacia diagnóstica de la citología, basados en el estudio histológico de la lesión o en el seguimiento del paciente, son más abundantes en el caso de la biopsia por PAAF que por impronta, y los resultados varían entre el 82% y el 91% de eficacia diagnóstica (4, 12, 13, 16, 18 y 21). Los estudios de eficacia diagnóstica de la citología no exfoliativa basados en el diagnóstico histopatológico de la lesión no son muy abundantes en medicina veterinaria. En la capacidad de discriminación entre proceso neoplásico y no neoplásico, Vos y colaboradores (1989) analizaron 348 lesiones caninas en distintas localizaciones por PAAF y por impronta, y la coincidencia diagnóstica o eficacia diagnóstica fue del 84% (40), valor idéntico (84%) al obtenido por Caniatti y colaboradores (1999) en su estudio realizado sobre 222 lesiones de piel y tejidos blandos (3). En la capacidad de discriminación entre neoplasia maligna y benigna, Mills y Griffiths (1984) en su estudio sobre 145 tumores de diversos orígenes y en distintas especies obtuvieron una eficacia diagnóstica del 90% (29). Griffiths y colaboradores (1984) analizaron 147 tumores cutáneos caninos por PAAF y la coincidencia con el diagnóstico histopatológico fue del 74% (15). O'Keefe y Couto (1987) analizaron varios casos de lesiones nodulares en bazo por PAAF y la eficacia diagnóstica de la citopatología fue del 100% (30). Vos y colaboradores (1989) obtuvieron una eficacia diagnóstica del 84% (40); Kristensen y colaboradores

(1990) analizaron 44 tumores hepáticos caninos y felinos por PAAF y por impronta y la eficacia diagnóstica fue del 65% (22); y Teske y colaboradores (1991), analizaron varios tumores pulmonares caninos y felinos y la eficacia diagnóstica fue del 83% (39). En la capacidad de discriminación del origen celular de las neoplasias, Ménard y colaboradores (1986) analizaron esta variable y obtuvieron una eficacia diagnóstica del 74% (26). Sin embargo, es interesante destacar, como ellos mismos sugieren, que observaron diferencias entre las lesiones caninas, con una eficacia diagnóstica del 72%, y las lesiones felinas, cuya eficacia diagnóstica fue del 87%, y que entre las primeras estaban incluidos los tumores de la mama, en los que la citología no es una técnica de diagnóstico fiable. Así, la citología de la mama canina debe ser solo orientativa, y el diagnóstico definitivo de la lesión ha de descansar en el estudio histopatológico. Por último, en estudios aislados se ha evaluado también la capacidad de discriminación de la citopatología del grado de diferenciación de las neoplasias malignas, como en el carcinoma de células escamosas (14), con buenos resultados.

En conclusión, la citología no exfoliativa es una técnica diagnóstica imprescindible que debe estar presente en los protocolos de estudio de los tumores de las especies canina y felina por ser sencilla de realizar y de gran utilidad diagnóstica, sirviendo para evitar intervenciones quirúrgicas innecesarias o agresivas en los casos de no neoplasia o neoplasia benigna y, en aquellos claramente malignos, para facilitar las mejores opciones de tratamiento. Sin embargo, la fiabilidad diagnóstica de la citología no exfoliativa depende de la persona que realiza la toma de la muestra, ya que es un factor esencial en la obtención de muestras adecuadas, y de la interpretación del frotis.

Bibliografía

- 1.- Bamford, J. (1966): En *Cytological diagnosis in Medical Practice*. J & A Churchill Ltd, London: 1-16.
- 2.- Baker, R., Lumsden, JH. (2000): En *Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat*. St. Louis (MO), Mosby Inc.
- 3.- Caniatti, M., Ceruti, R., Ghisleni, G., Roccabianca, P., Scanziani, E. (1999): Correlation between fine needle aspiration (FNA) and histology in 222 palpable cutaneous lesions of dogs and cats. 17th meeting of the ESVP. Nantes, Francia, 14-17 de Septiembre.
- 4.- Chu, EW., Hoyer, RC. (1973): The clinician and the cytopathologist evaluate fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 17(5): 413-417.
- 5.- Cowell, RL., Tyler, RD. (1979): En *Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*. Santa Bárbara, American Veterinary Publications.
- 6.- Cowell, RL., Tyler, RD, Meinkoth, JH. (1989): En *Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*. Santa Bárbara, American Veterinary Publications.
- 7.- Cowell, RL., Tyler, RD. (1999): En *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*. St. Louis (MO), Mosby, Inc.
- 8.- Duncan, JR., Prasse, KW. (1979): Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol* 16(6): 673-679.
- 9.- Else, RW. (1989): Biopsy – Special techniques and tissues. *In Practice* 12: 27-34.
- 10.- Else, RW., Simpson, JW. (1988): Valor diagnóstico de la citología exfoliativa de líquidos corporales en perros y gatos. *Vet Rec* 123(3): 70-76.
- 11.- Fournel – Fleury, C., Magnol, J-P., Guelfi, JF. (1994): En *Atlas en couleur de cytologie du cancer chez le chien et le chat*. París, Conférence Nationale des Vétérinaires Spécialisés en Petits Animaux.
- 12.- Frable, WJ. (1989): Needle aspiration biopsy: Past, Present and Future. *Human Pathol* 20 (6): 504-517.
- 13.- Frable, WJ., Frable, MA. (1979): Thin-needle aspiration biopsy, the diagnosis of head and neck tumors revisited. *Cancer* 43 (4): 1541-1548.
- 14.- Garma-Aviña, A. (1994): The cytology of squamous cell carcinomas in domestic animals. *J Vet Diagn Invest* 6 (2): 238-246.
- 15.- Griffiths, GL., Lumsden, JH., Valli, VEO. (1984): Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol* XIII (1): 13-17.
- 16.- Hajdu, SI., Melamed, MR. (1973): The diagnostic value of aspiration smears. *Am J Clin Pathol* 59(3): 350-356.
- 17.- Hall, RL., MacWilliams, RS. (1988): The cytologic examination of cutaneous and subcutaneous masses. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 3(2): 94-108.
- 18.- Ho, CS., Tao, LC., McLoughlin, MJ. (1978): Percutaneous fine-needle aspiration biopsy of intra-abdominal masses. *Can Med Assoc J* 119(11): 1311-1314.
- 19.- Hogevar, M., Bracko, M., Pogacnik, A., Vidergar-Kralj, B., Besic, N., Zgajnar, J. (2003): Role of imprint cytology in the intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39(15): 2173-2178.
- 20.- Ingh, TSGAM Van De, Vos, JH. (1989): De techniek van de dunne naal aspiratie cytologie. *Tijdschr. Diergeneesk.* 114 (13): 713-719.
- 21.- Kline, TS., Neal, HS. (1978): Needle aspiration biopsy: a critical appraisal. *J Am Med Assoc* 239(1): 36-39.
- 22.- Kristensen, AT., Klausner, JS., Weiss, DJ., Hardy, RM. (1990): Liver cytology in cases of canine and feline hepatic disease. *Small Anim, Comp Cont Edu Vet* 12: 797-809.

23. Larkin, HA. (1994): Veterinary Cytology. Fine needle aspiration of masses or swellings on animals. *Irish Vet J* 47: 65-73.
24. Linsk, JA. (1985): Aspiration cytology in Sweden: The Karolinska group. *Diagn Cytopathol* 1(4): 332-335.
25. Martin, HE., Ellis, EB. (1930): Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg* 92: 169-181.
26. Ménard, M., Fontaine, M., Morin, M. (1986): Fine needle aspiration biopsy of malignant tumors in dogs and cats: a report of 102 cases. *Can Vet J* 27(12): 504-511.
27. Meyer, DJ. (2001): *En Small Animal Clinical Oncology*. Ed. S.J. Withrow and E.G. MacEwen. W.B. Saunders, Philadelphia: 43-57.
28. Meyer, DJ., Franks, P. (1986): Clinical Cytology. Part 1: Management of tissue specimens. *Mod Vet Pract (Small An)* 67: 440-445.
29. Mills, JN., Griffiths, GL. (1984): The accuracy of clinical diagnoses by fine-needle aspiration cytology. *Aust Vet J* 61(8): 269-271.
30. O'Keefe, DA., Couto, CG. (1987): Fine-needle aspiration of the spleen as an aid in the diagnosis of splenomegaly. *J Vet Intern Med* 1(3): 102-109.
31. O'Rourke, LG. (1983): Cytologic technics: sampling, slide preparation, staining. *Mod Vet Pract* 64: 185-189.
32. Perman, V., Alsaker, RD., Riis, RC. (1979): *Cytology of the Dog and Cat*. Indiana, American Animal Hospital Association.
33. Rebar, AH. (1980): *En Handbook of Veterinary Cytology*. Saint Louis, Missouri, Ralston Purina Company.
34. Roszel, JF. (1967): Exfoliative cytology in diagnosis of malignant canine neoplasms. *Vet Scope* 12: 14-20.
35. Roszel, JF. (1981): Cytologic procedures. *J Am Anim Hosp Assoc* 17: 903-910.
36. Seybold, I., Goldston, RT., Wilkes, RD. (1982): Exfoliative cytology. *Vet Med Small An Clin*: 1029-1033.
37. Stewart, F. (1933): The diagnosis of tumors by aspiration. *Am J Pathol* 9: 801-812.
38. Stone, EA. (1995): Biopsy: principles, technical considerations and pitfalls. *Vet Clin of North Am* 25 (1): 33-45.
39. Teske, E., Stokhof, AA., Van Den Ingh, TSGAM., Volvekamp, WThC., Slappendel, RJ., de Vries, HW. (1991): Transthoracic needle aspiration biopsy of the lung in dogs with pulmonary disease. *J Am Anim Hosp Assoc* 27: 289-294.
40. Vos, JH., van den Ingh, TSGAM., van Mil. (1989): Non-exfoliative canine cytology: the value of fine needle aspiration and scraping cytology. *Vet Q* 11 (4): 222-231.