

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

Thaís Rapachi Mann

**ESTUDO RETROSPECTIVO, ÍNDICE AgNOR E NÍVEIS SÉRICOS DE
VITAMINA D EM CÃES COM MASTOCITOMA**

Santa Maria, RS
2016

Thaís Rapachi Mann

**ESTUDO RETROSPECTIVO, ÍNDICE AgNOR E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA
D EM CÃES COM MASTOCITOMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^aDr^a Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RAPACHI MANN, THAIS

ESTUDO RETROSPECTIVO, ÍNDICE AgNOR E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM MASTOCITOMA / THAIS RAPACHI MANN.- 2016.

55 f.; 30 cm

Orientadora: CINTHIA MELAZZO DE ANDRADE

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. mastocitoma 2. canino 3. vitamina D 4. AgNOR I.
MELAZZO DE ANDRADE, CINTHIA II. Título.

Thaís Rapachi Mann

ESTUDO RETROSPECTIVO, ÍNDICE AgNOR E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM MASTOCITOMA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 23/12/2016:

**Cynthia Melazzo de Andrade, Dra. (UFSM)
(Presidente/ Orientador)**

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)

Eduardo Kenji Masuda, Dr. (Axys Análises)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

- A meus pais por serem os grandes incentivadores e responsáveis para que esse trabalho acontecesse. É para vocês.

- Ao meu namorado Marcelo pela compreensão, carinho e companhia durante esse período conturbado.

- A meus familiares mais próximos, especialmente tias Cleide e Ivana pelos momentos de descontração e leveza aos finais de semana, também pelos conselhos que sempre estão dispostas a oferecer.

- A toda equipe do LacVet, especialmente minha orientadora Cinthia, por me proporcionar a liberdade de trabalhar com algo que gosto e por todo auxílio na condução desse trabalho. Também sou muito grata aos residentes do laboratório que me ajudaram sempre com as coletas sendo fundamentais em muitos aspectos do meu mestrado.

- Ao programa de pós-graduação.

- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

- À UFSM.

- Agradeço, enfim, a Deus por possibilitar que tudo desse certo, mesmo nos momentos de questionamento em relação ao caminho trilhado.

RESUMO

ESTUDO RETROSPECTIVO, ÍNDICE AgNOR E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM CÃES COM MASTOCITOMA

AUTOR: Thaís Rapachi Mann
ORIENTADOR: Cinthia Melazzo de Andrade

Mastocitomas são proliferações neoplásicas de mastócitos, de etiopatogênese desconhecida, que representam até 21% de todos os tumores cutâneos caninos. Este tumor possui uma grande variedade de apresentações e comportamentos biológicos, os quais vão desde benignos a extremamente agressivos levando à metástase e morte. A identificação citológica do mastocitoma um método bastante recomendado para detecção inicial do tumor, é de baixo custo, pode ser realizada com o animal consciente e permite suspeitar de um tumor de alto grau conforme as características celulares. Além da graduação histológica, que é o padrão-ouro para estabelecer o prognóstico do mastocitoma, marcadores adicionais são recomendados, como a contagem de AgNOR, um indicador de proliferação celular. Adicionalmente, alguns estudos enfocam a relação entre mastocitoma e vitamina D, uma vez que mastocitomas expressam receptores de vitamina D (VDR). Assim, a finalidade desta pesquisa é caracterizar a ocorrência de mastocitoma canino diagnosticado por exame citológico na região de Santa Maria/RS, descrever um protocolo para determinação de índice AgNOR em amostras citológicas de mastocitoma e investigar a relação entre níveis de vitamina D e índice AgNOR em cães com este tumor, visto que o índice AgNOR já é consolidado como marcador prognóstico para o mastocitoma e a vitamina D vem sendo apontada como alvo de investigação neste tumor. Em relação ao perfil de ocorrência do mastocitoma canino, neste trabalho encontraram-se resultados semelhantes aos descritos na literatura, com algumas particularidades referentes a raças e achados clínico-patológicos, permitindo o direcionamento para suspeita de mastocitoma e planejamento de intervenções terapêuticas mais adequadas para cada caso. Referente ao índice AgNOR, foi especificado um protocolo adaptado, a partir de técnicas já descritas, aplicável a amostras citológicas. Também pode-se observar que a vitamina D e o índice AgNOR em cães com mastocitoma estão correlacionados de forma negativa e moderada ($P=0,011$), sugerindo-se que os níveis de vitamina D sejam avaliados nos cães com este tumor. Em adição, estudos de acompanhamento de cães com mastocitoma e monitoramento de seu tempo de sobrevivência são necessários para que a dosagem de vitamina D possa ser proposta como marcador prognóstico e agente terapêutico para esta neoplasia.

Palavras chave: mastocitoma, cães, citopatologia, AgNOR, vitamina D.

ABSTRACT

RETROSPECTIVE STUDY, AGNOR INDEX AND SERUM LEVELS OF VITAMIN D IN DOGS WITH MAST CELL TUMOR

AUTOR: Thaís Rapachi Mann
ORIENTADOR: Cinthia Melazzo de Andrade

Mast cell tumors (MCT) are neoplastic tumors of mast cells of unknown etiopathogenesis, representing up to 21% of all canine cutaneous cancers. This tumor varies widely in biological presentations and behaviors, ranging from benign to extremely aggressive, leading to metastasis and death. The cytological identification of MCT is a highly recommended method for initial detection of the tumor, it is inexpensive, can be performed with conscious animal and allows to suspect a tumor of high degree according to the cellular features. In addition to the histological grading, which is the gold standard for establishing the prognosis of MCT, additional markers are recommended, among them the AgNOR count, an indicator of cell proliferation. Additionally, some studies focus on the relationship between MCT and vitamin D, since mast cell tumors express vitamin D receptors (VDR). Thus, the aim of this research is to characterize the occurrence of canine MCT diagnosed by cytological examination in the region of Santa Maria/RS, to describe a protocol for determining AgNOR index in cytological samples of MCT and to investigate the relationship between vitamin D levels and AgNOR index in dogs with this tumor, since the AgNOR index is already consolidated as a prognostic marker for mastocytoma and vitamin D has been reported as a target for MCT management. Regarding to the occurrence profile of this tumor, we found results similar to those described in the literature, with some peculiarities referring to breeds and clinicopathological findings, allowing to suspected of MCT and planning more appropriate therapeutic interventions for each case. Referring to the AgNOR index, a protocol adapted from techniques already described was applied to cytological samples. Also has been observed that vitamin D and AgNOR index in dogs with MCT are negatively and moderately correlated ($P=0,011$), suggesting that vitamin D levels can be measured in dogs with this tumor. In addition, follow-up studies of dogs with MCT and monitoring their outcoming are necessary, so that the vitamin D can be proposed as a prognostic marker and therapeutic agent for this neoplasm.

Keywords: mast cell tumor, dogs, cytopatjology, AgNOR, vitamin D.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

- Figura 1 – Técnica de impregnação pela prata em amostras citológicas de mastocitoma. Lâminas separadas por material nas extremidades, uma sobre a outra (A) e submersão em posição horizontal; aspecto após incubação em estufa a temperatura de 25° C, durante 45 minutos (B).....42
- Figura 2 – Aspecto microscópico das AgNORs em amostra citológica de mastocitoma (400x).....43
- Figura 3 – Reta de regressão linear demonstrando associação entre índice AgNOR e níveis de vitamina D em 24 cães com mastocitoma.....44

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 – Frequency of dog breeds affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA submitted to the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.....	25
Table 2 – Frequencies of sex, age and number of nodules in dogs affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA submitted to the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.....	26
Table 3 – Frequency of canine mast cell tumors according to their location diagnosed by cytological examination of FNA submitted to the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.....	27
Table 4 – Clinical signs related to MCT in dogs affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA submitted to the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MANUSCRITOS.....	13
2.1 MANUSCRITO 1 – CANINE MAST CELL TUMOR DIAGNOSED BY CYTOPATHOLOGY.....	13
2.2 MANUSCRITO 2 – NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E ÍNDICE AgNOR EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE CÃES COM MASTOCITOMA.....	29
3 DISCUSSÃO.....	45
4 CONCLUSÃO.....	47
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	52

1 INTRODUÇÃO

Mastocitomas são proliferações neoplásicas de mastócitos, os quais são células redondas, possuem núcleo redondo a oval e grânulos citoplasmáticos que se coram com corantes como azul de toluidina, Giemsa, e azul de metileno, por afinidade destes corantes básicos pelos proteoglicanos ácidos contidos nos grânulos de mastócitos. Alguns destes corantes exibem cor diferente quando ligados aos grânulos, de modo que muitas vezes são chamados de metacromáticos (LONDON; SEGUIN, 2003; BLACKWOOD et al., 2012; COWELL; VALENCIANO, 2014).

Os mastócitos são derivados de células precursoras da medula óssea. Eles partem da medula óssea em um estado imaturo e migram para muitos tecidos, particularmente aqueles que tem contato primário com antígenos estranhos (por exemplo, pele, trato respiratório e gastrointestinal), onde, em seguida amadurecem em mastócitos teciduais. As citocinas importantes no desenvolvimento e maturação dos mastócitos incluem interleucinas IL-3, IL-6, IL-4, e “stem cell fator” (SCF, c-kit) (AUSTEN; BOYCE, 2001; LONDON; SEGUIN, 2003).

Na maioria das espécies, processos neoplásicos que envolvem mastócitos são relativamente incomuns. No entanto, os tumores de mastócitos ocorrem com frequência em animais de companhia, representando até 21% de todos os tumores cutâneos caninos. Embora os mastócitos normalmente sejam encontrados em abundância nos pulmões e trato gastrointestinal, a grande maioria dos mastocitomas no cão ocorre na derme e no tecido subcutâneo. Raramente, mastocitomas primários podem estar presentes em outros locais, tais como a cavidade oral, orofaringe, laringe e trato gastrointestinal. O mastocitoma visceral envolvendo o baço, fígado ou medula óssea (muitas vezes referido como mastocitose disseminada) é geralmente o resultado de disseminação sistêmica de um mastocitoma cutâneo primário agressivo, embora possa ocorrer como uma síndrome independente. Leucemia primária de mastócitos no cão é extremamente rara (LONDON; SEGUIN, 2003; THAMM; VAIL, 2007; NELSON; COUTO, 2010).

O mastocitoma canino possui uma grande variedade de apresentações e comportamentos biológicos, os quais vão desde benignos a extremamente agressivos levando à metástase e morte. O mastocitoma deve ser considerado potencialmente maligno (LONDON; SEGUIN, 2003).

A etiopatogênese do mastocitoma é desconhecida. O aumento da incidência em determinadas raças sugere a possibilidade de uma causa genética subjacente, por exemplo desregulação na expressão do receptor de SCF/c-kit (LONDON; SEGUIN, 2003; WEBSTER et al., 2006; WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2010).

Segundo Cowell e Valenciano (2014), a identificação citológica do mastocitoma é de grande valor. Os mastócitos são reconhecidos pelos seus pequenos grânulos intracitoplasmáticos vermelho-púrpura (WELLE et al., 2008). A aspiração por agulha fina é de baixo custo e pode ser realizada com o animal consciente. O exame citológico permite o diagnóstico, mas não a gradação do tumor, embora possa se suspeitar de um tumor de alto grau se as células forem muito pleomórficas (COWELL; VALENCIANO, 2014). Camus et al. (2016) propuseram um sistema de gradação citológica para o mastocitoma, obtendo 88% de sensibilidade e 94% de especificidade em relação ao grau histológico.

Vários sistemas de gradação histológica foram propostos. Entre eles o sistema mais utilizado tem sido o de Patnaik et al. (1984), na qual os mastocitomas são classificados em três graus, sendo o III de pior prognóstico, II intermediário e I com melhor prognóstico. No entanto, atualmente parece estar havendo uma tendência à utilização do sistema proposto por Kiupel et al. (2011), que visa aumentar a concordância entre patologistas e reduzir as incertezas de prognóstico do grau intermediário. Nesta classificação, os mastocitomas são agrupados em alto e baixo grau, sendo os de alto grau com pior prognóstico em relação aos de baixo grau.

Segundo Sledge et al. (2016), mesmo a gradação histológica sendo o padrão-ouro para estabelecer o prognóstico do mastocitoma, por si só não se pode prever o comportamento de cada mastocitoma específico. Por isso marcadores adicionais e correta interpretação de achados clínicos são recomendados. Essa combinação de ferramentas auxilia na seleção do melhor plano de tratamento para determinado cão. Os marcadores de proliferação celular incluem PCNA, Ki-67, AgNOR e índice mitótico. As mutações no gene *c-kit* e o padrão de expressão do receptor tirosina-quinase KIT também são indicadores prognósticos para mastocitomas, uma vez que regulam a sobrevivência, proliferação, diferenciação e migração dos mastócitos.

Bostock et al. (1989) demonstraram que a contagem de AgNOR é um indicador prognóstico preciso, sendo indicador prognóstico melhor e mais específico do que o grau histológico ou índice mitótico. Vários estudos combinam a quantificação de AgNOR com outros indicadores, por exemplo, c-kit, ki67, índice mitótico, grau

histológico e sobrevida (BOSTOCK et al., 1989; SIMÕES et al, 1994; KRAVIS et al., 1996; RECH et al., 2004; NEWMAN et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008; THOMPSON et al, 2011; SLEDGE et al., 2016).

Outro ponto importante que tem sido investigado por grupos de pesquisadores é a relação entre mastocitoma e vitamina D. O receptor de vitamina D (VDR) é amplamente expresso por mastócitos caninos reativos e neoplásicos *in vivo*. Foi comparada a frequência de expressão de VDR nos mastocitomas e em mastócitos reativos. Nos mastocitomas de grau mais elevado, a frequência de marcação de VDR foi significativamente maior. Essas descobertas sugerem que VDR é regulado em mastocitomas caninos, especialmente dentro de tumores de alto grau (RUSSEL et al., 2010). Além disso, uma pesquisa sugere que baixos níveis de vitamina D podem ser um fator de risco para MCT em Labradores (WAKSHLAG et al., 2011).

O calcitriol, metabólito ativo da síntese de vitamina D, é um regulador do metabolismo ósseo e da homeostase do cálcio (HOLICK, 1996). Baseado em seus locais de síntese, seus alvos, modo de ação, regulação por feedback e sua estrutura, o calcitriol é considerado um hormônio esteroide (DELUCA, 1984).

Os efeitos do calcitriol são mediados principalmente através da ligação ao receptor da vitamina D (VDR), um membro da superfamília de receptores nucleares de hormônios esteroides (RUSSEL et al., 2010). O calcitriol induz parada do ciclo celular e apoptose. Os mecanismos destes efeitos são associado com a parada em G0 /G1, indução de apoptose, diferenciação e modulação do crescimento (TRUMP et al., 2006). Estudos epidemiológicos indicam que a insuficiência de vitamina D pode ter um papel etiológico em vários cânceres humanos (DEEB et al., 2007), incluindo câncer de cólon, mama, próstata e ovário (GARLAND et al., 2006).

A produção de vitamina D em humanos ocorre com a fotólise do 7DHC, que acontece na pele após exposição à radiação ultravioleta B (comprimento de onda entre 290-320 nm), gerando a previtamina D3, que por sua vez pode retornar à forma 7DHC ou isomerizar formando a vitamina D3. A velocidade de isomerização e o equilíbrio previtamina D3/vitamina D3 são regulados pela temperatura e presença de lipídios e proteínas na pele. Quando formada, a vitamina D3 é transportada por proteínas carreadoras (HOW et al., 1994).

How et al. (1994) concluíram que, na pele do cão e do gato, os níveis de 7DHC são baixos, equivalendo a apenas 10% da concentração na pele de ratos. Eles foram usados como comparativo, pois sabe-se que esta espécie é capaz de sintetizar

vitamina D na pele após exposição à radiação UVB. Isto sugere que a evolução não exigiu que carnívoros formassem sua própria vitamina D, já que a gordura, fígado e sangue de suas presas iriam satisfazer essa necessidade. Este estudo demonstra que a vitamina D pode ser considerada uma vitamina essencial para o cão e o gato, exigindo uma ingestão alimentar regular, independentemente da estação do ano. Além disso, foi demonstrado que cães alimentados com rações sem adição de vitamina D desenvolvem hipovitaminose D, mesmo se expostos aos raios UVB diariamente.

Malone et al. (2010) sugerem que combinações de calcitriol com vimblastina, lomustina, imatinib and toceranib podem ter utilidade significativa no tratamento de cães com mastocitomas. No entanto, deve ser feito um ajuste na dosagem do calcitriol, pois foi observada alta freqüência de efeitos adversos na administração de calcitriol oral (quatro cães tiveram hipercalcemia e cinco cães tiveram azotemia reversível). Os resultados encontrados nesse estudo suportam o uso do calcitriol ou de outros análogos da vitamina D como agentes terapêuticos no tratamento do mastocitoma canino, podendo ser particularmente útil quando a cirurgia ou a radioterapia não é viável, ou como um adjuvante para os tratamentos. A presença do receptor para a vitamina D em amostras de biópsia sugere um alvo terapêutico para intervenção (RUSSEL et al., 2010).

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar a ocorrência de mastocitoma diagnosticado por exame citológico. Em adição, foram determinados o índice AgNOR em amostras citológicas de mastocitomas e os níveis de vitamina D de cães diagnosticados com este tumor com a finalidade de investigar a relação entre essas duas variáveis, visto que o índice AgNOR já é consolidado como marcador prognóstico para o mastocitoma e a vitamina D está em foco em diversos estudos como um importante objeto de pesquisa relacionado ao mastocitoma, também outros cânceres humanos e animais e associada a doenças crônicas.

2 MANUSCRITOS

2.1 MANUSCRITO 1

CANINE MAST CELL TUMOR DIAGNOSED BY CYTOPATHOLOGY

Artigo a ser submetido para a revista Veterinary Clinical Pathology

Title Page

CANINE MAST CELL TUMOR DIAGNOSED BY CYTOPATHOLOGY

Running header:

Thais R. Mann¹, Bianca S. de Cecco¹, Diandra V. Felin¹, Ana M. Engelmann¹, Lara S. Dutra¹, Glaucia D. Kommers², Taiara M. da Silva², Cinthia M. de Andrade¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Clínica de Pequenos Animais

²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Patologia

Corresponding author: Thais Rapachi Mann

Address: Avenida Roraima, 1000, HVU – Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – nº97, Sala 126. Camobi, Santa Maria – RS. Cep: 97015-900.

E-mail: thaismann@yahoo.com.br

Abstract

Background: Mast cell tumor (MCT) is a round cell neoplasia common in small animal practice. Fine-needle aspiration (FNA) is a valuable diagnostic tool. The MCT varies widely in its biological behavior and still represents a challenge regarding prognosis and treatment.

Objectives: The aim of this study is to describe the occurrence of cutaneous MCT in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, diagnosed through FNA.

Methods: Characterizing the occurrence of cutaneous MCT diagnosed by FNA in dogs through reviewing medical records. Analyzed data were breed, sex, age, number and location of nodules, hematologic evaluation, medical history and histological degree of MCT.

Results: A total of 2,559 cytological exams were reviewed in the studied period resulting in 227 cases of dogs with cutaneous MCT diagnosed by FNA.

Conclusion: Crossbreed elderly dogs, with mean age of 9.4 years were the mostly affected by MCT, followed by boxers. There was a slight predisposition by females and most dogs had a single MCT. The preferential locations were limbs and abdominal region and a few dogs presented anemia and clinical signs related to MCT. The majority of histological degrees reported were grade II MCT.

Key words: cytology, dog, fine-needle aspiration, mast cells, survey

Introduction

Mast cell tumors (MCT) are neoplastic proliferations of mast cells,¹ classified as round (discrete) cell tumors.² Although normal mast cells are found in abundance in the lungs and gastrointestinal tract, the majority of MCTs in the dog arise from mast cells in the dermis and subcutaneous tissues.³ These tumors are commonly found in small animal practice, accounting for 16–21% of skin neoplasms in dogs.¹ MCT vary widely in their biological behavior, ranging from nearly benign to highly invasive and metastatic.⁴

The etiopathogenesis of MCTs in the dog is unknown. The increased incidence of MCTs in some breeds suggests an underlying genetic cause. Furthermore, because most of the tumors arise in the skin, it has been suggested that topical carcinogens may play a role in this disease.^{3,4} Dysregulated expression of stem cell factor receptor (SCFR, c-kit) is involved in the etiology of canine MCT and neoplastic transformation of mast cells.^{5,6}

Cytological identification of MCTs is valuable and fine-needle aspiration (FNA) is inexpensive and can be performed in the conscious animal.² Mast cells are recognized by their distinctive small, red-purple intracytoplasmic granules.^{3,4} FNA cytology gives the diagnosis but not the tumor grade, although a high grade tumor may be suggested if cellular pleomorphism is prominent. For an accurate grade, histopathology is required.¹

All MCTs should be removed with wide surgical excision and submitted to histopathology evaluation for tumor grading and tissue margin.^{2,4} Several grading

systems have been proposed, and among them, the classification by Patnaik et al (1984) is the most widely used. This system classifies MCTs into 3 grades, according to morphology and survival rate. To improve concordance among pathologists and reduce the prognostic uncertainty of the intermediate grade, a 2-tier histologic grading system was proposed in 2011 by Kiupel et al.⁷

Further prognostic information can be achieved by immunohistochemical, and histochemical staining of MCT for markers of cellular proliferation such as argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), Ki67, and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Additionally, it is suggested immunohistochemical staining for the presence and quantification of c-KIT mutations and KIT patterns of expression.^{2,4,8}

Histologic grading is the gold standard prognostic tool and molecular technics have improved accuracy for MCTs behavior and increased likelihood of identifying more aggressive MCTs. Furthermore, the results of such evaluation can aid in selection of the best treatment, particularly important for owners who wish to treat beyond primary surgical excision.⁸

Despite its easy cytological diagnosis, MCT still represents a challenge regarding prognosis and treatment. The aim of this study is to describe the occurrence of cutaneous MCT diagnosed by FNA in 227 dogs in the region of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil from November 2008 and August 2016.

Materials and Methods

1. Characterizing the occurrence of cutaneous MCT

In this retrospective study, medical records of dogs with canine MCT diagnosed by cytological examination of FNA in the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of

the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) were analyzed between November 2008 and August 2016.

Analyzed data were breed, sex, age, number and location of nodules/masses, hematologic evaluation and medical history to identify possible paraneoplastic or predisposing disorders related to MCT at the time of FNA diagnosis. Whenever available in medical records, the histological degree of MCT was reported.

2. Statistical analysis

Data were analyzed in the form of descriptive statistics of tabular data in Excel software.

Results

A total of 2,559 cytological exams were collected by FNA in the studied period. Our study retrieved 227 cases of MCTs in dogs, resulting in a prevalence of 8.8%. This information is related to all neoplastic and non-neoplastic lesions, diagnosed in dogs through cytopathology.

MCTs were most common in crossbreed dogs, representing 38.3% (table 1). The second most commonly reported breed was boxer, followed by dachshund and miniature pinscher, pitbull, labrador retriever, cocker spaniel, brazilian terrier, poodle, sharpei, beagle, brazilian mastiff, english bulldog, chow chow and german shepherd. The remaining breeds, bernese mountain dog, border collie, dogo canario, golden retriever, siberian husky, maltese, rottweiler and weimeraner represented less than 1%.

A slight predisposition by female were noted. Elderly dogs (>10 years) were most affected, followed by adults and four dogs were unknown age. The median age at diagnosis was 9,4 years. According to the number of nodules, most had a single MCT and the remaining had two or more MCTs (table 2).

A total of 272 site locations were diagnosed with MCT. One hundred and sixty six (166) dogs had a single MCT and 61 had more than one nodule. It was diagnosed most frequently in the hindlimbs and abdominal region, followed by thoracic region, scrotum, forelimbs, back region, head, vulva, neck, lymph nodes, perianal region and tail (table 3).

The majority of dogs had no hematological abnormalities. Thirty-four of the 227 (15.0%) dogs had normocytic normochromic anemia.

In 74.0% of the dogs, there were no clinical signs related to MCT. 11.4% reported ulcerated and/or bleeding nodules, 8.0% had previous skin problems and 6.6% exhibited gastrointestinal problems (table 4).

In 74% of the cases, tumor histological grading was not available. Of the 60 availables, 58% were grade II MCT, 22% were grade III MCT and 20% were grade I MCT.

Discussion

In most species, neoplastic processes involving mast cells are relatively uncommon³. However MCT is a very common tumor in the small animals practice, particularly in dogs.^{2,4} One study from the central region of Rio Grande do Sul reported MCT as the most common skin tumor in adults and elderly dogs by biopsy, with a 20.9% of total diagnosis.⁹ Our survey, based on cytology, found lower frequency,

possibly due to the inclusion of neoplastic and non-neoplastic citological diagnosis in our searching.

In this retrospective study, based on FNA diagnosis, the crossbreed dogs were the most affected by MCT. This may be due to higher number of these dogs referred to the hospital. Similar to previous studies, boxers were the most common breed.¹⁰⁻¹⁴ However, has been described that in this breed the tumor tends to be more well differentiated and carry a better prognosis.^{1,3} Although, a few cases of MCTs are reported in miniature pinscher and dachshund, our data showed high incidence, similarly to another local study.¹² This is probably due to the popularity of these breeds in Brazil.

In our study there were a slight sexual predisposition by females, despite the literature reports, in which this finding is not observed.^{1,3,10-13} The mean age was also in accordance to previous studies,^{1,3,11,12,15-17} demonstrating that MCT mainly affects older dogs.

Regarding the number of nodules, this study found single nodules as more frequent, according to literature.^{4,10} However, our finding of multiple MCTs was higher than another survey.¹⁰ This may be due to the FNA diagnosis, since at collection time, any lump in the animal skin is easily sampled, which often does not occur when studies are based on biopsies, because sometimes, not all tumors removed are submitted to histopathology evaluation. According to our data, it is more likely a dog having a single MCT than multiple MCT at 3:1 ratio.

About the lump locations, the data are similar to those previously described, showing that limbs and abdominal region are preferential sites for MCTs.^{10,18} The location of the tumor is important for therapeutic approach, it is known that tumors occurring in oral cavity, prepuce perineum, scrotum and inguinal region as well as

mucocutaneous membrane appear to be more aggressive.^{3,15} The poor prognosis in these sites may also be due to the difficulty of performing adequate surgery with wide surgical margins.¹

Other observed data was the presence of normocytic normochromic anemia, which if persistent, indicates nonregenerative anemia.¹⁹ In his study it is suggested that this type of anemia appear because MCT is a chronic disorder, leading to anemia of chronic disease (ACD). ACD pathogenesis imply three mechanisms mainly related to the effects of inflammatory cytokines: lower survival of erythrocytes, impaired mobilization or use of Fe and impaired production of erythrocytes.¹⁹ It can not be ruled out the presence of anemia due to gastrointestinal bleeding, which can lead to iron deficiency anemia.¹

About the medical history, most dogs showed no signs related to paraneoplastic or predisponent disorders. When present, most signs are related to release of histamine, heparin, and other vasoactive amines and may suggest aggressive behaviour,^{1,3,4} particularly in ulcerated tumors. The frequency of previous skin diseases in this research, as otitis, folliculitis and demodectic mange, make aware that chronic and repeated cutaneous inflammation may play a role in MCT development.^{4,10,20} The gastrointestinal signs may be associated with gastric injury, due to release of cytoplasmic granule contents, such as histamine, leading to stimulation of H₂ receptors on parietal cells, excessive gastric acid production and development of gastrites and ulcers.³

On the reviewed medical records, informations regard surgical procedure, submission to histopathology and/or tumor grade were rarely available. Of those available, most were grade II, as reported in other researchs.^{11-13,16,21} In Patnaik classification, well-differentiated MCTs (grade I) carry an excellent long-term prognosis

and are usually cured by surgical excision alone, while poorly differentiated (grade III) MCTs are locally invasive and more likely to metastasize, so chemotherapy is generally recommended in addition to surgery. Conversely, the behavior of intermediate (grade II) MCTs is more difficult to predict.⁷

Management of MCTs is still a challenge for small animal practitioners. Most appropriate therapeutic approach is achieved by multidisciplinary evaluation of the patient. Therefore it is important to know the profile of the affected dog with MCT guiding diagnostic and prognostic auxiliary tests to support the best treatment option for each dog pursuing a better outcome.

References

1. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol.* 2012;10: e1–e29.
2. Cowell RL, Valenciano AC. *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat.* 4th ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2014: 582p.
3. London CA, Seguin B. Mast cell tumours in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003; 33: 473–489.
4. Welle MM, Rohrer Bley C, Howard J, Rufenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol.* 2008; 19: 321–339.
5. Takeuchi Y, Fujino Y, Watanabe M, et al. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Vet Immunol. Immunopathol.* 2010; 137: 208–216.

6. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 2006; 8: 104–111.
7. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? *Vet Pathol*. 2015; 52: 70-73
8. Sledge DG, Webster J, Kiupel M. Canine cutaneous mast cell tumors: A combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. *The Vet J*. 2016; 215:43-54
9. Souza TM, Figuera RA, Irigoyen LF, Barros CSL. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães (Retrospective study on 761 canine skin tumors). *Ciencia Rural*. 2006; 36: 555-560.
10. Hottendorf GH, Nielsen SW. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralblatt Veterinarmedizin*. 1967; 14: 272–281.
11. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol*. 1984; 21: 469–474.
12. Costa-Casagrande TA, Elias DS, Melo SR, Matera JM. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais - Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Retrospective study of canine mast cell tumor at Surgery Service of Small Animals - Veterinary Hospital of College of Veterinary Medicine and Animal Science, of São Paulo University). *Arch Vet Sci*. 2008, 13: 176-183.
13. Monteiro B, Boston S, Monteith G. Factors influencing complete tumor excision of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: a retrospective study in 100 dogs. *Can Vet J*. 2011;52:1209–1214.

14. Shoop SJ, Marlow S, Church DB, et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. *Canine Gen Epidemiol.* 2015; 2: 1–19.
15. Thamm DH, Turek MM, Vail DM. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. *J Vet Med Sci.* 2006; 68: 581–587.
16. Mullins MN, Dernell WS, Withrow SJ, Ehrhart EJ, Thamm DH, Lana SE. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 228: 91–95.
17. Trappler MC, Popovitch CA, Goldschmidt MH, Goldschmidt KH, Risbon RE. Scrotal tumors in dogs: A retrospective study of 676 cases (1986–2010). *Can Vet J.* 2014; 55:1229–1233.
18. Pakhrin B, Kang MS, Bae IH, et al. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *J Vet Sci.* 2007; 8:229–236.
19. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.* 2nd ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2008; 920p.
20. Govier SM. Principles of treatment for mast cell tumors. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 18: 103–106.
21. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 2007; 44: 335–341.

Table 1: Frequency of dog breeds affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA in the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.

Breeds	Number per breed	%
Crossbreed	87	38.3
Boxer	44	19.4
Dachshund	16	7.0
Miniature Pinscher	16	7.0
Pitbull	13	5.7
Labrador Retriever	11	4.8
Cocker Spaniel	7	3.2
Brazilian Terrier	5	2.2
Poodle	4	1.8
Sharpei	4	1.8
Beagle	3	1.3
Brazilian Mastiff	3	1.3
Chow Chow	2	1
English Bulldog	2	1
German Shepherd	2	1
Bernese Mountain Dog	1	0.4
Border Collie	1	0.4
Dogo Canario	1	0.4
Golden Retriever	1	0.4
Maltese	1	0.4
Rottweiler	1	0.4
Siberian Husky	1	0.4
Weimeraner	1	0.4
Total	207	100

Table 2: Frequencies of sex, age and number of nodules in dogs affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA in the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.

Data	Category	Number	%
Sex (n=227)	Female	123	54.2
	Male	104	45.8
Age (n=223)	Adults (1-8 Years)	93	41.7
	Elderly (>8 Years)	130	58.3
Number of nodules (n=227)	Multiple (≥ 2)	61	26.9
	Single	166	73.1

Table 3: Total of 272 body sites diagnosed with MCT, and its frequencies in dogs affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA in the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.

Site of Body	Number	%
Hindlimb	57	20.9
Abdominal Region	55	20.2
Thoracic Region	27	10
Scrotum	24	8.8
Forelimb	23	8.4
Back Region	21	7.7
Head	18	6.6
Vulva	16	6.0
Neck Region	14	5.1
Lymph Nodes	10	3.7
Perianal Region	5	1.8
Tail	2	0.8
Total	272	100

Table 4: Clinical signs related to MCT in dogs affected by mast cell tumor diagnosed by cytological examination of FNA in the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (RS-Brazil) between November 2008 and August 2016.

Clinical Signs	Number	%
Ulcerated Nodule	26	11.4
Skin Problems	18	8.0
Digestive Signs	15	6.6
None related to MCT	168	74
Total	227	100

2.2 ARTIGO 2

Níveis Séricos de Vitamina D e Índice AgNOR em Amostras Citológicas de Cães com Mastocitoma

Artigo a ser submetido na revista Ciência Rural

1 **Níveis Séricos de Vitamina D e Índice AgNOR em Amostras Citológicas de Cães com**
2 **Mastocitoma**

3 **Serum Levels of Vitamin D and AgNOR Index in Cytological Samples of Dogs with**
4 **Mast Cell Tumor**

5 **Thaís Rapachi Mann^I, Talita Pozzer^{II}, Bianca Santana de Cecco^I, Diandra Visentini**
6 **Felin^I, Ana Martiele Engelmann^I, Lara Seffrin Dutra^I, Glaucia Denise Kommers^{III},**
7 **Cinthia Melazzo de Andrade^I**

8
9 **-ARTIGO CIENTÍFICO-**

10 **RESUMO**

11 O mastocitoma é um tumor de alta incidência em cães. Seu diagnóstico é facilmente obtido
12 através de exame citológico. No entanto, métodos adicionais para prever o prognóstico do
13 mastocitoma são recomendados, como a determinação do índice AgNOR, que reflete a
14 proliferação celular. Em relação à vitamina D, sabe-se que sua deficiência pode contribuir para
15 o desenvolvimento de vários cânceres humanos. Já foi demonstrado que em cães não há
16 suficiente formação de vitamina D na pele. Estudos apontam que níveis séricos mais baixos de
17 vitamina D podem ser um fator de risco para mastocitoma em labradores. Assim o objetivo
18 deste estudo foi descrever uma técnica para demonstração de AgNORs em amostras citológicas
19 e a relação entre os níveis séricos de vitamina D e o índice AgNOR em cães com mastocitoma.
20 Obtiveram-se bons resultados na demonstração de AgNORs em amostras citológicas
21 utilizando-se um protocolo adaptado a partir de técnicas anteriormente descritas. Através da
22 análise estatística do coeficiente de correlação de Pearson, verificou-se que quanto menores os

^ILaboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LacVet). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

^{II}Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

^{III}Laboratório de Patologia Veterinária (LPV). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

1 níveis de vitamina D, maiores os índices AgNOR. Além disso, foi realizada análise de regressão
2 linear simples, demonstrando uma relação linear significativa entre vitamina D e AgNOR. Com
3 isso, pode ser sugerida a inclusão da dosagem de vitamina D como exame complementar no
4 manejo de casos de mastocitoma canino. Ainda assim, a abordagem de outros marcadores
5 prognósticos e estudos de acompanhamento de cães com mastocitoma são necessários para que
6 a vitamina D possa ser proposta como marcador prognóstico e agente terapêutico em cães com
7 esse tumor.

8

9 **Palavras-chave:** mastocitoma, canino, AgNOR, vitamina D.

10

11 **ABSTRACT**

12

13 Mast cell tumor (MCT) is a high incidence tumor in dogs. Its diagnosis is easily obtained
14 through cytological examination. However, additional methods to predict the prognosis of MCT
15 are recommended, such as the determination of the AgNOR index, which reflects cell
16 proliferation. Regarding to vitamin D, it is known that its deficiency can contribute to the
17 development of several human cancers. It has already been shown that in dogs there is
18 insufficient vitamin D formation in the skin. Studies indicate that lower levels of vitamin D
19 may be a risk factor for MCT in labradors. Thus the objective of this study was to describe a
20 technique for demonstrating AgNORs in cytological samples and the relationship between
21 serum vitamin D levels and AgNOR index in dogs with MCT. Good results were obtained in
22 the demonstration of AgNORs in cytological samples using a protocol adapted from previously
23 described techniques. Through the statistical analysis of Pearson's correlation coefficient, it was
24 found that the lower the vitamin D levels, the higher the AgNOR indices. In addition, simple
25 linear regression analysis was performed, demonstrating a significant linear relationship

1 between vitamin D and AgNOR. Thus, the inclusion of vitamin D dosage may be suggested as
2 a complementary examination in the management of cases of canine MCT. Nevertheless, the
3 approach of other prognostic markers and follow-up studies of dogs with mastocytoma are
4 necessary so that vitamin D can be proposed as a prognostic marker and therapeutic agent in
5 dogs with this tumor.

6

7 **Key words:** mast cell tumor, dog, AgNOR, vitamin D.

8

9 INTRODUÇÃO

10

11 O mastocitoma é um dos tumores mais frequentes na espécie canina. Sua apresentação
12 clínica e comportamento biológico são variáveis (BLACKWOOD et al., 2012). Sua
13 etiopatogenia é desconhecida e o exame citológico de punção aspirativa por agulha fina (PAAF)
14 é o método diagnóstico inicial preferencial, no qual os mastócitos aparecem como células
15 redondas, com núcleo redondo a oval, central e que podem ser de difícil visualização devido à
16 presença de grânulos. Além disso, mastócitos malignos pouco diferenciados podem conter
17 poucos ou nenhum grânulo (LONDON & SEGUIN, 2003). Métodos adicionais para prever o
18 prognóstico do mastocitoma são recomendados, entre eles a determinação do índice AgNOR
19 (SLEDGE et al., 2016).

20 AgNORs são proteínas nucleolares argirófilas não histonas que estão associadas a genes
21 ribossômicos localizados na região organizadora nucleolar (NOR) que refletem a proliferação
22 celular (PLOTON et al., 1986). As NORs são alças de DNA no nucléolo das células onde ocorre
23 transcrição de RNA ribossomal, as quais tem afinidade pela prata (PLOTON et al., 1986;
24 KRAVIS et al., 1996).

1 A contagem de AgNOR é um indicador de proliferação celular utilizado com valor
2 prognóstico para o mastocitoma (BOSTOCK et al., 1989). Webster et al. (2007) recomendam
3 que o índice AgNOR seja rotineiramente avaliado em pacientes com mastocitoma, em conjunto
4 com outros marcadores prognósticos, pois maiores contagens de AgNOR estão associadas a
5 maiores taxas de recidivas locais e distantes de mastocitoma. Além disso, maiores índices
6 AgNOR também estão relacionados a tumores de grau mais elevado, metastatizações e menor
7 tempo de sobrevida (SIMÕES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996; RECH et al., 2004).

8 Em relação à vitamina D, estudos indicam que sua deficiência poderia ter um papel
9 etiológico em vários cânceres humanos (DEEB et al., 2007), incluindo câncer de cólon, mama,
10 próstata e ovário (GARLAND et al., 2006). Sabe-se que em cães não há suficiente formação de
11 vitamina D na pele, exigindo ingestão alimentar regular (HOW et al., 1994). Corroborando com
12 esse fato, um estudo conduzido por Laing et al. (1999) não encontrou flutuações sazonais nas
13 concentrações de vitamina D em cães, ou seja, não há interferência da exposição solar na
14 produção de vitamina D em cães.

15 Estudos apontam que a vitamina D contribui para a regulação do desenvolvimento e
16 função dos mastócitos (BARONI et al., 2007; YU et al., 2011). Em medicina veterinária, a
17 relação entre mastocitoma e vitamina D vem sendo investigada por grupos de pesquisadores.
18 Russel et al. (2010) demonstraram que o receptor de vitamina D (VDR) é amplamente
19 expressado em mastócitos caninos neoplásicos e reativos, sugerindo um novo alvo para a
20 intervenção terapêutica, tema abordado por Malone et al (2010), com resultados promissores.
21 Além disso, Wakshlag et al. (2011) sugerem que baixos níveis de vitamina D podem ser um
22 fator de risco para mastocitoma em labradores.

23 Neste contexto, o objetivo deste estudo é correlacionar os níveis séricos de vitamina D
24 e o índice AgNOR em amostras coletadas por PAAF de cães com mastocitoma e descrever a
25 técnica para demonstração de AgNORs que melhor se adaptou para aplicação em amostras

1 coletadas por PAAF, uma vez que inicialmente houve dificuldade em obter resultados
2 satisfatórios com uso de métodos já descritos na literatura.

3

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5

6 Foram coletadas amostras citológicas de 27 cães com mastocitoma cujo diagnóstico foi
7 feito por PAAF. Para o diagnóstico utilizou-se corante Panótico Rápido. Amostras não coradas
8 foram fixadas com spray para citodiagnóstico à base de etanol (Merckofix®) e armazenadas até
9 o momento da execução da técnica, em caixas porta lâminas, em temperatura ambiente.

10 Para a técnica, foi preparada uma solução de nitrato de prata em concentração de 50%
11 e uma solução de gelatina coloidal em concentração de 2% de gelatina P.A. e 1% de ácido
12 fórmico (KRAVIS et al. 1996). No momento do procedimento de impregnação pela prata, as
13 lâminas foram imersas em solução de prata na proporção de 2 volumes de nitrato de prata para
14 1 volume de gelatina coloidal, em quantidade suficiente para cobrir o número de lâminas a
15 serem impregnadas, dependendo do tamanho do recipiente.

16 Neste trabalho, foram utilizados recipientes plásticos para a execução da técnica. Para
17 otimizar a utilização dos reagentes, as lâminas foram submersas horizontalmente, uma sobre a
18 outra, separadas por algum material nas extremidades que impedia que se tocassem (Figura 1a),
19 então incubadas em estufa a temperatura de 25° C, durante 45 minutos (Figura 1b). Após a
20 incubação, as lâminas foram enxaguadas em água destilada durante 2 minutos, secas ao ar,
21 montadas com lamínulas através do meio de montagem Entellan®, e observadas ao
22 microscópio óptico. Os pontos enegrecidos em 100 núcleos de mastócitos foram contados,
23 conforme metodologia recomendada por Crocker et al. (1989) (Figura 2). Foi feita a média de
24 três contagens de AgNOR para cada amostra.

1 Coletaram-se amostras de soro para dosagem de 25(OH)D, que é a principal forma
2 circulante de vitamina D (GARLAND et al., 2006) de 24 dos cães cujas AgNORs foram
3 quantificadas. Estas coletas foram feitas assim que se confirmou o diagnóstico de mastocitoma
4 através de exame citopatológico, antes de qualquer intervenção terapêutica.

5 Os tutores dos cães foram questionados quanto ao tipo de alimentação fornecida aos
6 animais. Não foi requerido jejum prévio à coleta, pois esta foi feita no momento do atendimento
7 do animal. As amostras de soro foram coletadas em tubos sem anticoagulante, envoltos em
8 papel de alumínio, para proteger a amostra da luz, uma vez que a vitamina D é fotossensível.

9 As dosagens de 25(OH)D foram feitas pelo método de quimioluminescência em
10 laboratório de análises clínicas de humanos. Para padronização das dosagens foi feito o limiar
11 de detecção do método em amostras séricas de cães saudáveis.

12 Referente à análise estatística, primeiramente foi calculado o coeficiente de correlação
13 de Pearson (r) para verificar a presença de relação entre o índice AgNOR e os níveis de
14 25(OH)D. Existindo a relação, foi averiguada a significância do coeficiente calculado através
15 do P-valor e o comportamento quanto à força e sentido de correlação.

16 A análise de regressão linear foi aplicada a fim de estimar como AgNOR se comporta
17 em função da vitamina D e vice-versa, em que também foi averiguada a significância dos
18 coeficientes, assim como da reta, através do P-valor.

19 As análises foram feitas utilizando-se o software Statistica, considerando 95% de
20 confiança.

21

22 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

23

24 Em relação à contagem de AgNOR, há poucos protocolos detalhadamente descritos na
25 literatura para aplicação da técnica de sua quantificação em amostras citológicas. A maioria

1 tem enfoque voltado para a histopatologia, e naqueles em que se descrevem técnicas aplicadas
2 a amostras citológicas, falta precisão na determinação de tempo e temperatura utilizados para
3 incubação.

4 Em um primeiro momento, houve uma tentativa em reproduzir o método descrito por
5 Kravis et al. (1996), sem sucesso, pois à temperatura de 70°C formaram-se extensos
6 precipitados enegrecidos sobre a amostra, levando à tentativa de executar a técnica em
7 temperatura ambiente, conforme proposto por Lindner (1993). Porém, com a utilização deste
8 método, observaram-se AgNORs fracamente marcadas e difíceis de identificar. Além disso,
9 com ambos os métodos houve variação na intensidade de coloração das lâminas e marcação de
10 grânulos citoplasmáticos e precipitados espalhados sobre a lâmina, que se confundiam com
11 AgNORs.

12 As oscilações da temperatura ambiente são um fator limitante, seja por alterações
13 climáticas, bem como pela utilização de condicionadores de ar. Portanto, chegou-se em
14 consenso de incubar as lâminas em estufa, a 25°C durante 45 minutos, tempo utilizado por
15 Kravis et al. (1996), obtendo bons resultados.

16 A média geral da contagem de AgNOR nas 27 amostras citológicas de mastocitoma
17 canino foi de 1,83, com quantidade mínima de 0,32 AgNOR e máxima 4,84 AgNOR. Não foi
18 observada diferença de intensidade de marcação de AgNORs e aumento de precipitados entre
19 lâminas submersas com a face do esfregaço para cima em relação àquelas que estavam com a
20 face do esfregaço para baixo.

21 Conforme demonstrado por Kravis et al. (1996), a frequência de AgNOR em amostras
22 citológicas de mastocitoma é significativamente correlacionada com a frequência de AgNOR
23 em amostras de biópsia e significativamente associada com grau histológico do tumor.

24 A técnica relatada neste estudo, adaptada a partir de outras previamente descritas,
25 permitiu bons resultados para aplicação em esfregaços citológicos de mastocitoma canino

1 coletados através de PAAF, possibilitando aplicação rápida e prática para abordagem do
2 prognóstico do mastocitoma canino. Porém, a técnica torna-se onerosa, uma vez que o nitrato
3 de prata tem custo elevado, portanto sua utilização deve ser calculada conforme o tamanho do
4 recipiente e para que o máximo de lâminas sejam coradas.

5 No que se refere à vitamina D, já foi demonstrado que, diferentemente do que ocorre
6 em humanos, a exposição solar não produz efeitos para sua produção na pele de cães (HOW et
7 al., 1994), e que também não há influência sobre seus níveis séricos em diferentes intensidades
8 de exposição solar (LAING et al., 1999). Isso indica que a vitamina D na espécie canina é
9 essencialmente obtida através da alimentação, sendo as principais fontes desse nutriente os
10 produtos de origem animal (DEEB et al., 2007).

11 Todos cães participantes deste estudo recebiam dietas consideradas mistas, ou seja, a
12 alimentação era composta de ração comercial e também sobras de comida caseira, o que
13 minimiza a interferência da dieta nas dosagens da vitamina D.

14 A média geral de vitamina D dos 24 cães foi de 38,3 ng/ml (19,3-43,6 ng/ml) (GOW et
15 al., 2009), com valor mínimo de 10,5 ng/ml e máximo de 108,6 ng/ml, demonstrando que a
16 maioria dos cães não apresentavam deficiência de vitamina D. No entanto, AgNOR e 25(OH)D
17 demonstraram ter moderada correlação negativa ($r=-0,5$; $P=0,011$). Desta forma, quanto
18 menores os níveis de vitamina D, maiores os índices AgNOR. Esse resultado fornece indícios
19 de que cães com menores níveis de vitamina D possam estar predispostos a desenvolverem
20 mastocitomas de comportamento biológico mais agressivo, uma vez que o índice AgNOR mais
21 elevado pode indicar maior propensão a metástases e recidivas e menor tempo de sobrevivência
22 (SIMOES et al., 1994; WEBSTER et al., 2007; WEBSTER et al., 2008).

23 Através da análise de regressão linear, verificou-se que as variáveis AgNOR e 25(OH)D
24 estão associadas significativamente através da equação: $AgNOR = 2,6712 - 0,022 * 25(OH)D$
25 (Figura 3). Este sinal negativo na equação encontrada condiz com o que foi constatado no

1 coeficiente de correlação de Pearson, possibilitando uma estimativa de índice AgNOR em cães
2 com mastocitoma, a partir dos níveis de vitamina D.

3 Nesse sentido, o índice AgNOR juntamente com os níveis de vitamina D avaliados neste
4 trabalho, podem colaborar para o acompanhamento e manejo de cães com esta neoplasia.

5 Dessa forma, a dosagem de vitamina D pode ser sugerida como um exame
6 complementar para auxiliar na conduta de casos de cães com mastocitoma. No entanto, os dados
7 apresentados neste estudo não permitem afirmar que a vitamina D seja instituída como
8 marcador prognóstico ou como adjuvante terapêutico de suplementação para o tratamento do
9 mastocitoma canino, apenas representam mais um esforço em estabelecer uma conexão entre
10 os índices de vitamina D e o comportamento biológico do mastocitoma canino.

11 Além disso, recomenda-se que sejam aplicados outros marcadores a fim de estabelecer
12 uma comparação com o índice AgNOR, que isoladamente não atesta o potencial maligno de
13 um tumor. Dentre os marcadores que podem ser aplicados estão a graduação citológica e
14 histopatológica, marcadores moleculares c-kit e ki-67, estadiamento clínico, tempo de
15 sobrevida e a metastatização para linfonodos e outros órgãos.

16

17 **CONCLUSÃO**

18

19 Através dos resultados obtidos neste estudo, pode-se verificar que cães com mastocitoma
20 que tenham menores níveis de vitamina D são propensos a apresentar maior índice AgNOR.
21 Portanto, sugere-se que a dosagem de vitamina D seja incluída como um exame complementar
22 no manejo de casos de mastocitoma canino. Ainda assim, estudos de acompanhamento de cães
23 com mastocitoma e monitoramento de seu tempo de sobrevida são necessários para que a
24 dosagem de vitamina D possa ser proposta como marcador prognóstico e agente terapêutico

1 para o mastocitoma canino e o índice AgNOR deve ser avaliado em conjunto com outros
2 marcadores prognósticos.

3

4 **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

5 Este trabalho foi aprovado pela CEUA/UFSM pelo protocolo número 8372230216.

6

7 **REFERÊNCIAS**

8

9 BARONI , E. et al. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-
10 dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 250-262, 2007.

11 BLACKWOOD L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats.
12 **Vet Comp Oncol**, v.10, p.1-29, 2012.

13 BOSTOCK D.E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of postsurgical prognosis in
14 canine spontaneous mast cell tumors. **Br J Cancer**, v.59, p. 915–918, 1989.

15 DEEB, K.K.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer:
16 potential for anticâncer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p.684-700, 2007

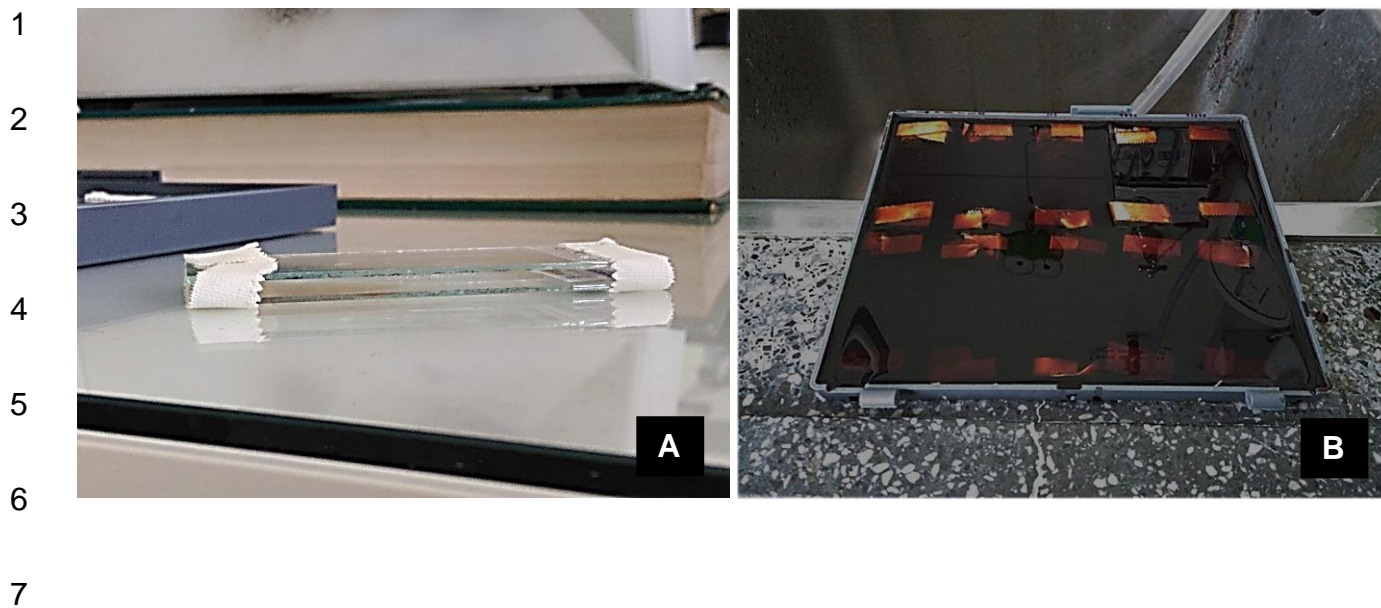
17 GARLAND et al. The role of vitamin d in cancer prevention. **American Journal of Public**
18 **Health**, v.96, n.2, p. 252-261, 2006.

19 GOW et al. Calcium metabolism in eight dogs with hypoadrenocorticism. **Journal of Small**
20 **Animal Practice**, v.50, p.426-430, 2009.

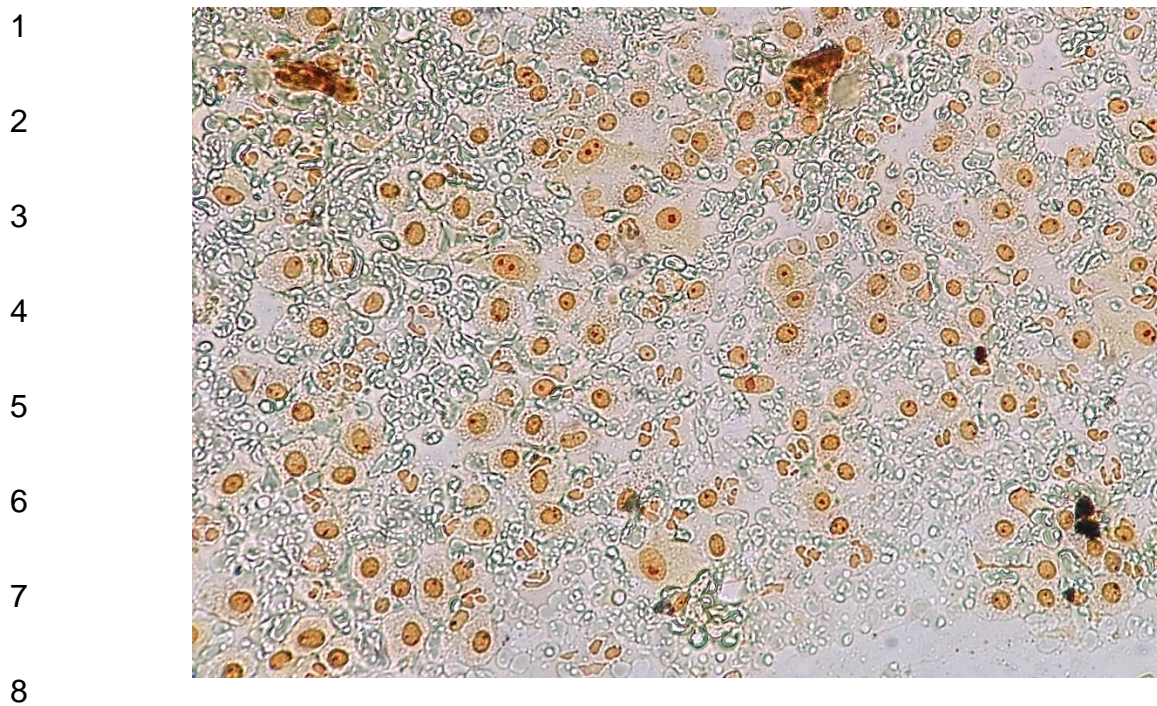
21 HOW, K.L; HAZEWINKEL, H.A.; MOL, J.A. Dietary vitamin D dependence of cat and dog
22 due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. **Gen Comp Endocrinol**, v.96, p.12–18,
23 1994.

- 1 KRAVIS L.D. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fineneedle
2 aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 209,
3 p. 1418–1420, 1996.
- 4 LAING C.J. et al. Seasonal vitamin D status of Greyhounds in Sydney. **Aust Vet J**, v. 77, p.
5 35-38, 1999.
- 6 LINDNER, L.E. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions
7 (AgNOR). **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 439-445, 1993.
- 8 LONDON, C.A. & SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Vet Clin Small Anim**, v.33,
9 p.473–489, 2003.
- 10 MALONE, E.K. et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour
11 chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent
12 activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. **Veterinary and**
13 **Comparative Oncology**, v.8, n.3, p.209–220, 2010.
- 14 PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic
15 proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J**, v.18, p.5-14, 1986.
- 16 RECH, R.R. et al. Canine cutaneous mast cell tumor. Study of 45 cases. **Arq Bras Med Vet**
17 **Zootec**, v.56, n.4, p.441-448, 2004.
- 18 RUSSEL, D.S. et al. An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine
19 cutaneous mast cell tumours. **J Comp Pathol**. v.143, n.2-3, p.223-226, 2010.
- 20 SIMÕES, J.P.C. et al. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods.
21 **Vet Pathol**, v. 31, p. 637-647, 1994.
- 22 SLEDGE D.G. et al. Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic
23 approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Vet J**, v. 215, p. 43-54, 2016.

- 1 YU, C. et al. Vitamin D3 signalling to mast cells: a new regulatory axis. **The International**
- 2 **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, p. 41–46, 2011.
- 3 WAKSHLAG, J.J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin
- 4 D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British Journal of Nutrition**,
- 5 v.106, p.60–63, 2011.
- 6 WEBSTER, J.D. et al. cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations
- 7 with c-kit and its role in prognostication. **Vet Pathol**, v. 44, p. 298–308, 2007.
- 8 WEBSTER, J.D. et al. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated
- 9 with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 32, p. 1-8, 2008.

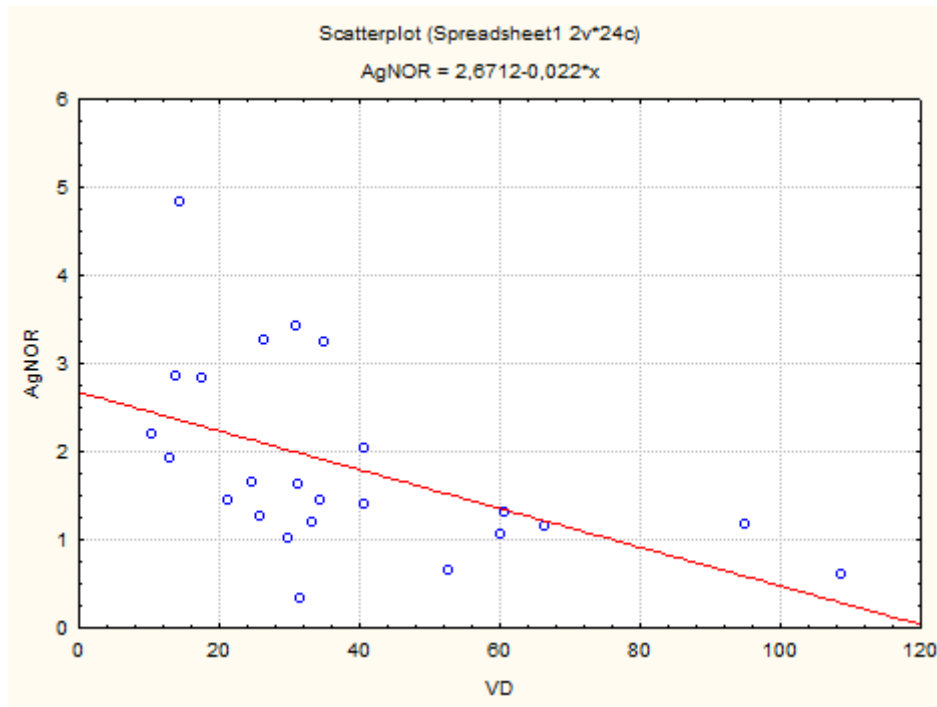


8 Figura 1 – Técnica de impregnação pela prata em amostras citológicas de mastocitoma.
9 Lâminas separadas por material nas extremidades, uma sobre a outra (A) e submersão em
10 posição horizontal; aspecto após incubação em estufa a temperatura de 25° C, durante 45
11 minutos (B).



9 Figura 2 – Aspecto microscópico das AgNORs em amostra citológica de mastocitoma (400x).

1
2
3
4
5
6
7
8



9 Figura 3 – Retas de regressão linear demonstrando associação entre índice AgNOR e níveis de
10 vitamina D em 24 cães com mastocitoma.

3 DISCUSSÃO

Vários estudos abordam o mastocitoma canino, tanto referentes ao comportamento biológico, como às modalidades terapêuticas e tentativas de predizer prognóstico de cães com este tumor (PATNAIK et al., 1984; GOVIER, 2003; THAMM et al., 2006; KIUPEL et al., 2011; CAMUS et al., 2016; SLEDGE et al., 2016), em diferentes regiões anatômicas (GIEGER et al., 2003; MULLINS et al., 2006; THOMPSON et al., 2011) de vários países (PAKHRIN et al., 2007; COSTA-CASAGRANDE et al., 2008; SHOOP et al., 2015). O que todos estes estudos trazem em comum, é que o mastocitoma é um tumor comumente diagnosticado em cães.

Apesar da grande quantidade de trabalhos tratando do mastocitoma canino, poucos abordam o diagnóstico citopatológico, mesmo este sendo um método bastante recomendado para detecção inicial do tumor (LONDON; SEGUIN, 2003; COWELL; VALENCIANO, 2014).

Neste trabalho, baseado em mastocitomas diagnosticados pelo método de exame citopatológico por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), encontraram-se resultados semelhantes aos descritos na literatura, porém destacam-se algumas peculiaridades. Por exemplo, apesar de a raça boxer ser a mais afetada pelo mastocitoma em diferentes regiões do mundo, as maiores frequências de ocorrência desse tumor em cães dachshund e pinscher em relação a outros estudos semelhantes demonstraram que preferências locais por determinadas raças devem ser consideradas.

Outra particularidade apresentada neste estudo é relacionada a manifestações clínicas e clínico-patológicas que podem indicar distúrbios paraneoplásicos. Ainda que pouco frequentes, essas manifestações e achados laboratoriais podem direcionar a suspeita de mastocitoma e também antecipar intervenções terapêuticas mais adequadas para cada caso.

Neste sentido, a avaliação de amostras citológicas de mastocitoma pode ser útil tanto para apontar características compatíveis com tumor de maior potencial de malignidade (CAMUS et al., 2016) quanto para a determinação do índice AgNOR, auxiliando na determinação do prognóstico do animal (KRAVIS et al., 1996). Ou seja, um cão com mastocitoma em estágio avançado pode ser preservado de procedimento mais invasivo e ainda assim pode-se ter uma dimensão do comportamento do tumor

através de amostras coletadas por PAAF em menor período de tempo, para assim ser escolhida a melhor abordagem terapêutica.

Em relação à vitamina D, ainda há poucos estudos investigando sua relação com o mastocitoma canino. Todavia, nessas pesquisas, já se pode observar que há indícios de que essa relação exista (BARONI et al., 2007; MALONE et al., 2010; RUSSEL et al., 2010; YU et al., 2011; WAKSHLAG et al., 2011). Portanto, este trabalho é mais um esforço em investigar a possibilidade da vitamina D ser considerada um aspecto importante a ser abordado referente ao mastocitoma.

Além disso, através de análises estatísticas, pode-se observar que a vitamina D e o índice AgNOR em cães com mastocitoma estão correlacionados, corroborando para que em estudos futuros seja acompanhada a evolução clínica desses cães.

4 CONCLUSÃO

O mastocitoma é um tumor frequentemente diagnosticado na região de Santa Maria, RS, Brasil, afetando principalmente cães sem raça definida, sem predisposição sexual, com idade média de nove anos. A localização anatômica de maior frequência diagnóstica são os membros e a maioria dos cães não exhibe sinais clínicos ou alterações hematológicas relacionadas ao mastocitoma.

É possível diagnosticar o mastocitoma através de exame citopatológico e ainda aplicar a técnica de AgNOR para prever o comportamento biológico do tumor nessas mesmas amostras, resguardando o animal da necessidade de procedimentos mais invasivos.

A vitamina D é um novo alvo de investigação que vem demonstrando ter importante relação com o desenvolvimento de diversos cânceres, inclusive o mastocitoma canino, assim sugere-se que seus níveis sejam avaliados nos cães com esta neoplasia. No entanto, estudos de acompanhamento são necessários para que a vitamina D possa ser considerada como marcador prognóstico ou agente terapêutico em cães com mastocitoma.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho é o primeiro a investigar a relação de vitamina D com mastocitoma canino através do índice AgNOR, sendo observada moderada correlação entre essas variáveis. Portanto, futuramente, pretende-se:

- Aumentar o número de observações de cães com mastocitoma cujas amostras de vitamina D sejam analisadas e acompanhar esses animais em relação à evolução clínica.
- Dar continuidade à aplicação da técnica de quantificação das AgNOR em amostras citopatológicas de mastocitoma canino associando à graduação citológica proposta por CAMUS et al. (2016).
- Relacionar os níveis de vitamina D em cães com mastocitoma classificado conforme CAMUS et al. (2016) e sua evolução clínica.
- Aplicar outros marcadores prognósticos, por exemplo ki-67, em amostras citológicas de cães com mastocitoma.

REFERÊNCIAS

AUSTEN, K.F.; BOYCE, J.A. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. **Leukemia Research**, v.25, p.511–518, 2001.

BARONI , E. et al. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 250-262, 2007.

BLACKWOOD L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Vet Comp Oncol**, v.10, p.1-29, 2012.

BOSTOCK D.E. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of postsurgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **Br. J. Cancer**. v.59, p. 915–918, 1989.

CAMUS et al. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome. **Veterinary Pathology**. v. 53, n.6, p.1117-1123, 2016.

COSTA-CASAGRANDE et al. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais - Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Arch Vet Sci**. v.13, p.176-183, 2008.

COWELL, R.L.; VALENCIANO, A.C. **Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 4^a ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier; 2014.

DEEB, K.K.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p.684-700, 2007.

DELUCA, H.F. The Metabolism, Physiology, and Function of Vitamin D. In: KUMAR, R. **Vitamin D**. Boston: Martinus Nijhoff. p.1-68, 1984.

GARLAND et al. The role of vitamin d in cancer prevention. **American Journal of Public Health**. v.96, n.2, p. 252-261, 2006.

GIEGER et al. Biologic Behavior and Prognostic Factors for Mast Cell Tumors of the Canine Muzzle: 24 Cases (1990–2001). **J Vet Intern Med**. v.17, p. 687–692, 2003.

GOVIER, S.M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clin Tech Small Anim Pract.** v.18, p.103–106, 2003.

HOLICK, M.F. Vitamin D and bone health. **Journal of Nutrition.** v.126, n.4, p.1159-1164, 1996.

HOW, K.L; HAZEWINDEL, H.A.; MOL, J.A. Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. **Gen Comp Endocrinol.** v.96, p.12–18, 1994.

KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology.** v.48, n.1, p.147-155, 2011.

KRAVIS, L.D. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.209, p.1418-1420, 1996.

LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Vet Clin Small Anim.** v.33, p.473–489, 2003.

MALONE, E.K. et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances mast cell tumour chemotherapy and receptor tyrosine kinase inhibitor activity in vitro and has single-agent activity against spontaneously occurring canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology.** v.8, n.3, p.209–220, 2010.

MULLINS et al. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **J Am Vet Med Assoc.** v.228, p.91–95, 2006.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais.** 4° ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.

NEWMAN, S. J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumour: diagnosis and prognosis. **J. Comp. Path,** v. 136, p. 231-239, 2007.

PAKHRIN et al. Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. **J Vet Sci.** v.8, p.229–236, 2007.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MacEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Vet Pathol.** v.21, p.469–474, 1984.

RECH, R.R. et al. Canine cutaneous mast cell tumor. Study of 45 cases. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56, n.4, p.441-448, 2004.

RUSSEL, D.S. et al. An immunohistochemical study of vitamin D receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours. **J Comp Pathol.** v.143, n.2-3, p.223-226, 2010.

SIMÕES, J.P.C. et al. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. **Vet Pathol**, v. 31, p. 637-647, 1994.

SLEDGE D.G. et al. Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Vet J**, v. 215, p. 43-54, 2016.

SHOOP et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. **Canine Genet. Epidemiol.** v.2, p.1–19, 2015.

TAKEUCHI et al. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell tumor cell lines. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.137, p.208–216, 2010.

THAMM et al. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **J Vet Med Sci.** v.68, p.581–587, 2006.

THAMM, D.H.; VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW S.J.; MACEWEN, E.G. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology.** 4th ed. St Louis: Saunders-Elsevier; p.402–424, 2007.

THOMPSON, J.J. et al. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and kit expression as prognostic indices. **Veterinary Pathology**, v. 48, n.1, p. 169-181, 2011.

TRUMP, D. L. et al. Vitamin D compounds: clinical development as cancer therapy and prevention agents. **Anticancer Res.** v.26, p.2551–2556, 2006.

WAKSHLAG, J.J. et al. Cross-sectional study to investigate the association between vitamin D status and cutaneous mast cell tumours in Labrador retrievers. **British Journal of Nutrition.** v.106, p.60–63, 2011.

WEBSTER et al. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasia**. v.8, p.104–111 2006.

WEBSTER, J.D. et al. cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-kit and its role in prognostication. **Vet Pathol**, v. 44, p. 298–308, 2007.

WEBSTER, J.D. et al. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 32, p. 1-8, 2008.

WELLE et al. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Vet Dermatol**. v.19, p.321–339, 2008.

YU, C. et al. Vitamin D3 signalling to mast cells: a new regulatory axis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, p. 41–46, 2011.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Níveis Séricos de Vitamina D em Cães com Mastocitoma Cutâneo

Pesquisador responsável: Cinthia Melazzo de Andrade

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria/ Departamento de Clínica de Pequenos Animais

Telefone e endereço postal completo: Ex: (55) 3220-8814. Avenida Roraima, 1000, prédio 97, sala 126, 97105-970 - Santa Maria - RS.

Local da coleta de dados: Hospital Veterinário Universitário

Eu Cinthia Melazzo de Andrade, responsável pela pesquisa Níveis Séricos de Vitamina D em Cães com Mastocitoma Cutâneo, o convidamos a participar como voluntário deste nosso estudo.

Esta pesquisa pretende investigar a relação entre mastocitoma cutâneo canino e vitamina D. Acreditamos que ela seja importante porque algumas descobertas sugerem que o receptor de vitamina D é regulado em mastocitomas caninos, especialmente dentro de tumores de alto grau.

Para sua realização será feito o seguinte: coleta de sangue, de exame citológico do tumor e inspeção de linfonodos do seu cão com mastocitoma.

É possível que aconteçam os seguintes desconfortos ou riscos: estresse e dor de leve intensidade em seu cão durante os procedimentos de coleta.

Os benefícios que esperamos como estudo incluem investigar se há relação do nível de vitamina D do cão com o desenvolvimento do mastocitoma, para embasar futuros estudos que possam utilizar este hormônio como possível terapia na condução dos casos de mastocitoma cutâneo canino.

Durante todo o período da pesquisa você terá a possibilidade de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento. Para isso, entre em contato com alguns dos pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa.

Em caso de algum problema relacionado com a pesquisa, você terá direito à assistência gratuita que será prestada através da realização de exames que forem necessários para averiguar o estado de saúde de seu cão.

Você tem garantido a possibilidade de não aceitar que seu cão participe ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e poderão divulgadas, apenas, em eventos ou publicações, sem a identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Também serão utilizadas imagens.

Os gastos necessários para a participação do seu cão na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica, também, garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa.

Autorização

Eu, _____ após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro para que a participação de meu cão é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais meu cão será submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em permitir que meu cão participe deste estudo.

Assinatura do voluntário

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Santa Maria, ____ de _____ de 201_.