

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

Thaís Rapachi Mann

**TÉCNICA ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE
PROLIFERATIVO AgNOR EM AMOSTRAS CITOLOGICAS DE
MASTOCITOMA CANINO**

Santa Maria, RS
2021

Thaís Rapachi Mann

**TÉCNICA ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO
AgNOR EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MASTOCITOMA CANINO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cinthia Melazzo de Andrade

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mann, Thais Rapachi
TÉCNICA ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE
PROLIFERATIVO AgNOR EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE
MASTOCITOMA CANINO / Thais Rapachi Mann.- 2021.
50 f.; 30 cm

Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Cães 2. Citopatologia 3. Mastócitos 4. Oncologia I.
Melazzo de Andrade, Cinthia II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

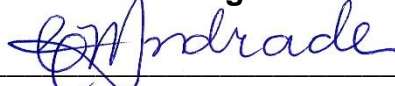
Declaro, THAIS RAPACHI MANN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thaís Rapachi Mann

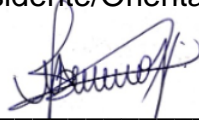
**TÉCNICA ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO
AgNOR EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MASTOCITOMA CANINO**

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

Aprovado em 26 de agosto de 2021:



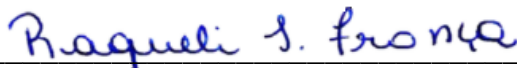
Cinthia Melazzo de Andrade, Dra, UFSM
(Presidente/Orientadora)



Andressa Bueno, Dra, UFSM



Guilherme Dornelles, Dr, URI



Raqueli Teresinha França, Dra, UFPel



Veronica Souza Paiva Castro, UFSM

Santa Maria, RS
2021

RESUMO

TÉCNICA ADAPTADA PARA DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO AgNOR EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MASTOCITOMA CANINO

AUTORA: Thais Rapachi Mann
ORIENTADORA: Cinthia Melazzo de Andrade

Mastocitomas são proliferações neoplásicas de mastócitos pouco comuns na maioria das espécies e frequentes em animais de estimação. A grande maioria ocorre na derme e tecido subcutâneo e a etiopatogenia é desconhecida. Sua aparência clínica varia amplamente e sempre deve ser considerado potencialmente maligno, podendo estar associado à manifestação de sinais clínicos causados pela liberação de aminas vasoativas que estão presentes nos grânulos dos mastócitos. Deve ser feita investigação de possíveis metástases e, sempre que possível, remoção cirúrgica para graduação histológica do tumor, que é o exame padrão-ouro na determinação prognóstica do mastocitoma. O exame citopatológico é a ferramenta diagnóstica inicial, de baixo custo, rápida e não invasivo para o diagnóstico do mastocitoma. Recentemente, sistemas de graduação citológica do mastocitoma vem sendo propostos, possibilitando a identificação precoce do grau do tumor, o que pode ser útil para planejar estratégias de tratamento e discutir o prognóstico com o proprietário do cão. Outros marcadores podem e devem ser empregados para identificar o índice proliferativo do tumor, como a contagem de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs). Este trabalho busca gerar dados que auxiliem na caracterização da apresentação do paciente com mastocitoma em associação ao índice proliferativo AgNOR. Neste sentido, foram gerados dois manuscritos acerca da abordagem prática do paciente canino com mastocitoma. No primeiro manuscrito, foi padronizada uma técnica para determinar o índice proliferativo AgNOR coletadas citológicas, através da qual possibilitou-se impregnar lâminas previamente coradas com corantes de rotina, antecipando assim o índice proliferativo tumoral. No segundo manuscrito, foram selecionados 63 casos de cães com mastocitoma, os quais tiveram o índice AgNOR relacionado ao sexo, raça, local e grau citológico. Os achados demonstram que não há predisposição sexual nem racial para elevados índices AgNOR, mas em alguns locais anatômicos o desenvolvimento do mastocitoma possui maiores índices proliferativos. Também observou-se que altos índices AgNOR estão associados a mastocitomas de alto grau citológico, o que pode representar um pior prognóstico. Dessa forma, sugere-se avaliar o paciente com mastocitoma no pré-cirúrgico através do estadiamento clínico conjuntamente à análise citológica e índice AgNOR citológico para o adequado direcionamento das estratégias terapêuticas. A utilização do marcador proliferativo AgNOR é vantajosa pois é de execução rápida e fácil e fornece suporte para que a abordagem clínica tenha melhores resultados, permitindo definir a necessidade de procedimentos terapêuticos complementares além da remoção cirúrgica.

Palavras-chave: Cães. Mastócitos. Oncologia.

ABSTRACT

ADAPTED TECHNIQUE FOR DEMONSTRATING AgNORs IN CANINE MAST CELL TUMOR CYTOLOGICAL SAMPLES

AUTHOR: Thais Rapachi Mann

ADVISOR: Cinthia Melazzo de Andrade

Mast cell tumors are neoplastic proliferations of mast cells, uncommon in most species and frequent in pets. Majority of MCT occur in the dermis and subcutaneous tissue and the etiopathogenesis is unknown. Its clinical appearance varies a lot and must always be considered potentially malignant, and may be associated with the expression of clinical signs caused by the release of vasoactive amines that are present in mast cell granules. Metastases should be searched and, whenever possible, surgical removal for histological grading of the tumor, which is the gold standard exam in the prognostication of mast cell tumor. The cytopathological exam is the initial, inexpensive, fast, and non-invasive tool for diagnosing mast cell tumors. Recently, cytological grading systems for mast cell tumors have been proposed, enabling the early identification of the tumor grade, which can be useful to plan treatment strategies and discuss the prognosis with the dog's owner. Other markers should be used to identify the proliferative index of the tumor, such as the count of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs). This work aims to generate information to advise about the presentation of patients with mast cell tumors in association with the AgNOR proliferative index. Thus, two manuscripts were produced about the practical approach of the canine patient with mast cell tumor. In the first manuscript, a technique to determine the AgNOR proliferative index collected from cytology was standardized, through which it was possible to impregnate slides previously stained with routine dyes, thus anticipating the tumor proliferative index. In the second manuscript, 63 cases of dogs with mast cell tumors were selected, which had the AgNOR index related to sex, breed, location and cytological grade. The findings demonstrate that there is no sexual or racial predisposition to high AgNOR indices, but in some anatomical sites the development of mast cell tumors has higher proliferative indices. It was also observed that high AgNOR indices are associated with high cytological grade mast cell tumors, which may represent a worse prognosis. Thus, it is suggested to evaluate the patient with mast cell tumor in the pre-surgical period by clinical staging, cytological analysis and cytological AgNOR index for the proper targeting of therapeutic strategies. The use of the AgNOR proliferative marker is useful because it is quick and easy to perform and provides support for the clinical approach having better results, helping to define the need for complementary therapeutic procedures in addition to surgical removal.

Key words: Dogs. Mast Cells. Oncology.

LISTA DE FIGURAS

TESE

- Figura 1 – Fotomicrografia de mastócitos e seus grânulos com constituintes bioativos..... 10
- Figura 2 – Apresentação clínica variável do Mastocitoma Canino.....12
- Figura 3 – Aparência citológica de um mastocitoma em citologia aspirativa.....15
- Figura 4 – Diagrama esquemático para graduação citológica de mastocitomas.....16
- Figura 5 – Mastocitoma de baixo grau citológico e de alto grau citológico.....17
- Figura 6 – Ilustração demonstrativa da distribuição das AgNORs.....18

Manuscrito 1

- Figura 1 – Presença de extensos precipitados enegrecidos sobre a amostra.....28
- Figura 2 – Pontos de enegrecidos intranucleares representando as AgNORs.....28

Manuscrito 2

- Figura 1 – Fotomicrografia de um mastocitoma canino, demonstrando as AgNOR's em técnica de impregnação pelo nitrato de prata.....44

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Tabela 1 – Instruções de preparo de 150mL de solução de trabalho.....27

Manuscrito 2

Tabela 1 – Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado ao sexo (n=63).....42

Tabela 2 – Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado à raça (n=62).....43

Tabela 3 – Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado ao local anatômico do tumor (n=63).....43

Tabela 4 – Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado à graduação citológica (n=36).....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 MASTÓCITOS.....	10
2.2 MASTOCITOMA CANINO.....	11
2.3 ESTADIAMENTO CLÍNICO NO MASTOCITOMA CANINO.....	13
2.4 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DO MASTOCITOMA CANINO.....	14
2.5 DIAGNÓSTICO GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DO MASTOCITOMA CANINO...15	
2.6 GRADUAÇÃO CITOLÓGICA DO MASTOCITOMA CANINO.....	16
2.7 ÍNDICE AgNOR COMO MARCADOR PROGNÓSTICO PARA O MASTOCITOMA CANINO.....	17
2.8 RECOMENDAÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O MASTOCITOMA CANINO.....	19
3 MANUSCRITOS.....	20
3.1 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY...21	
3.2 MANUSCRITO SUBMETIDO NA CIÊNCIA RURAL.....	29
4 DISCUSSÃO.....	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O mastocitoma (MCT) é um tumor de diagnóstico muito frequente na clínica médica de cães, e ainda representa um desafio quanto ao prognóstico e tratamento dos animais afetados. Apesar de muitos avanços e de a graduação histológica ser o padrão-ouro para estabelecer o prognóstico do mastocitoma, esta por si só não pode prever o comportamento de cada mastocitoma específico. Por isso são recomendadas técnicas adicionais para planejamento terapêutico dos cães com MCT. Com a maior utilização de técnicas de diagnóstico citológico, atualmente o planejamento terapêutico de pacientes com MCT pode ser elaborado com auxílio de diversas ferramentas e sistemas de classificação de maneira precoce, como a técnica descrita neste estudo, que torna a identificação de regiões organizadoras nucleolares mais prática e rápida possibilitando a determinação do índice proliferativo do tumor antes da excisão cirúrgica. Neste contexto, estudos como este são úteis para auxiliar em uma conduta precisa dos pacientes com MCT, pois propõe que a abordagem desses pacientes deve ser feita de maneira sistemática, criando-se um roteiro que envolve o estadiamento clínico, avaliação de exames complementares, avaliação citológica com graduação, marcadores de proliferação, planejamento para excisão cirúrgica ou quimioterapia citorrredutora, graduação histológica com avaliação de margens e marcadores prognósticos imunohistoquímicos para definir a necessidade de terapias complementares como a quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou cuidados paliativos.

Dessa forma, os objetivos deste estudo são, conjuntamente ao diagnóstico citológico, possibilitar a determinação do índice proliferativo do MCT através da contagem de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) e relacionar o índice encontrado à aspectos clínicos como: sexo, raça, localização e número de tumores e grau citológico. Por conseguinte, procura-se também auxiliar clínicos veterinários para uma abordagem precisa e casos de MCT cutâneo em cães, criando um roteiro para avaliação sistemática dos animais afetados e direcionando o planejamento terapêutico mais adequado. Além disso, pretende-se que o índice AgNOR possa fazer parte da avaliação citológica pós punção aspirativa do MCT, pois é um método simples e rápido de avaliar o índice proliferativo do tumor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

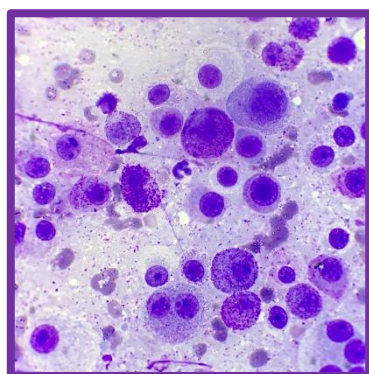
2.1 MASTÓCITOS

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

Seus grânulos contém grande constituintes bioativos, como histamina e heparina, envolvidos na hipersensibilidade, alergia e processos inflamatórios. Conforme o tecido de destino, os mastócitos assumem granulações típicas. Em tecido conjuntivo possuem grânulos com maior quantidade de histamina e heparina, já em mucosas, possuem mais condroitinossulfato (LONDON; SEGUIN, 2003).

Sua característica morfológica é a aparência redonda, com núcleo redondo a oval e grânulos citoplasmáticos que se coram por afinidade dos corantes básicos pelos proteoglicanos ácidos contidos nos grânulos (azul de toluidina, Giemsa). Alguns destes corantes exibem cor diferente quando ligados aos grânulos, de modo que muitas vezes são chamados de metacromáticos (BLACKWOOD et al., 2012; COWELL; VALENCIANO, 2014) (Figura 1).

Figura 1: Fotomicrografia de mastócitos e seus grânulos com constituintes bioativos (Panótico Rápido, aumento de 400x).



Fonte: arquivo pessoal.

2.2 MASTOCITOMA CANINO

Na maioria das espécies, processos neoplásicos que envolvem mastócitos são relativamente incomuns. No entanto, os tumores de mastócitos ocorrem com frequência em animais de estimação, especialmente nos cães (BOSTOCK, 1986; O'KEEFE, 1990; ROGERS, 1996; SOUZA et al., 2006). Embora os mastócitos normalmente sejam encontrados em abundância nos pulmões e trato gastrointestinal, a grande maioria dos MCTs no cão ocorrem na derme e tecido subcutâneo (WELLE et al., 2008;). Ocasionalmente, MCTs primários podem estar presentes em outros locais, tais como a cavidade oral, orofaringe, laringe e trato gastrointestinal e muscular (BLACKWOOD et al., 2012; ROBINSON et al, 2017). O MCT visceral envolvendo o baço, fígado ou medula óssea (muitas vezes referido como mastocitose disseminada) é geralmente o resultado de disseminação sistêmica de um MCT 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; SHOOP et al., 2015).

A etiopatogenia do MCT no cão é desconhecida, bem como a razão para a alta incidência nesta espécie. Uma vez que a maior parte dos MCTs surgem na pele, tem sido sugerido que agentes cancerígenos tópicos e fatores epigenéticos podem desempenhar um papel nesta doença. A maior incidência de MCT em certas raças sugere a possibilidade de uma causa genética subjacente. Um exemplo é a raça boxer, a qual têm alta incidência de MCT, mas estes tendem a ser mais bem diferenciados e com melhor prognóstico (LONDON; SEGUIN, 2003; WEBSTER et al., 2006; WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2010, BLACKWOOD et al., 2012; SHOOP et al., 2015).

A aparência clínica do tumor pode variar amplamente (Figura 2). Dessa forma, não é possível identificar uma lesão cutânea como um MCT simplesmente por sua aparência. Além disso, o MCT possui grande variedade de comportamentos biológicos, podendo ser extremamente agressivos levando à metástase e morte, devendo ser considerados potencialmente malignos (THAMM; VAIL, 2007; LONDON; SEGUIN, 2003, BLACKWOOD, 2012).

A variável subcutânea do MCT tem sido mencionada na literatura como uma massa macia que pode ser clinicamente semelhante ao lipoma. O MCT subcutâneo envolve apenas o tecido adiposo hipodérmico e não invade estruturas anexiais ou a

derme. Sua caracterização e prognóstico não foram totalmente determinados e não se praticam nesses neoplasmas as classificações de graduação histológica. No entanto, a variante subcutânea parece ter melhor prognóstico que o MCT cutâneo (NEWMAN et al. 2007; THOMPSON et al., 2011).

Figura 2: Apresentação clínica variável do MCT Canino. A – MCT na região do tronco; B – MCT ulcerado em prepúcio; C – MCT na cauda; D – MCT na região perineal, com ulceração e aumento de volume exacerbado; E – MCT em região interdigital.



Fonte: arquivo pessoal.

2.3 ESTADIAMENTO CLÍNICO NO MASTOCITOMA CANINO

A avaliação diagnóstica do paciente com MCT tem três objetivos: primeiro, o diagnóstico definitivo; segundo, pesquisa de possíveis metástases e em terceiro, investigação de sinais clínicos paraneoplásicos (ROGERS, 1996). Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), as diretrizes para o estadiamento clínico do MCT são as seguintes (adaptado de Owen, 1980):

Estágio 1: Um tumor confinado à derme, sem envolvimento de linfonodo regional.

- 1a) Sem sinais clínicos.
- 1b) Com sinais clínicos.

Estágio 2: Um tumor confinado à derme, com comprometimento de linfonodo regional.

- 2a) Sem sinais clínicos
- 2b) Com sinais clínicos

Estágio 3: Vários tumores dérmicos ou um grande tumor infiltrante com ou sem comprometimento de linfonodo regional.

- 3a) Sem sinais clínicos
- 3b) Com sinais clínicos

Estágio 4: Qualquer tumor com metástase à distância ou recorrência com metástase (incluindo envolvimento de sangue ou de medula óssea).

- 4a) Sem sinais clínicos
- 4b) Com sinais clínicos

Todos os linfonodos regionais devem ser cuidadosamente examinados para sinais de aumento de volume, e qualquer linfonodo suspeito deve ser aspirado para o exame citológico. Além disso, mesmo linfonodos de tamanho normal podem ser metastáticos, por isso recomenda-se que alguns linfonodos regionais sejam examinados por citologia aspirativa. Os mastócitos podem estar presentes em linfonodos normais e são frequentemente encontrados em linfonodos reativos. Assim, pode ser difícil determinar se os mastócitos encontrados no exame citológico do

linfonodo são neoplásicos ou parte da população celular normal (BOOKBINDER et al., 1992).

Quanto aos achados de exames laboratoriais, cães com MCT podem ter eosinofilia devido a fatores quimiotáticos e IL-5 produzida pelos mastócitos e anemia pode estar presente secundariamente ao hiperesplenismo ou sangramento gastrointestinal. Ocasionalmente, os mastócitos podem ser vistos em hemogramas de rotina (LONDON; SEGUIN, 2003).

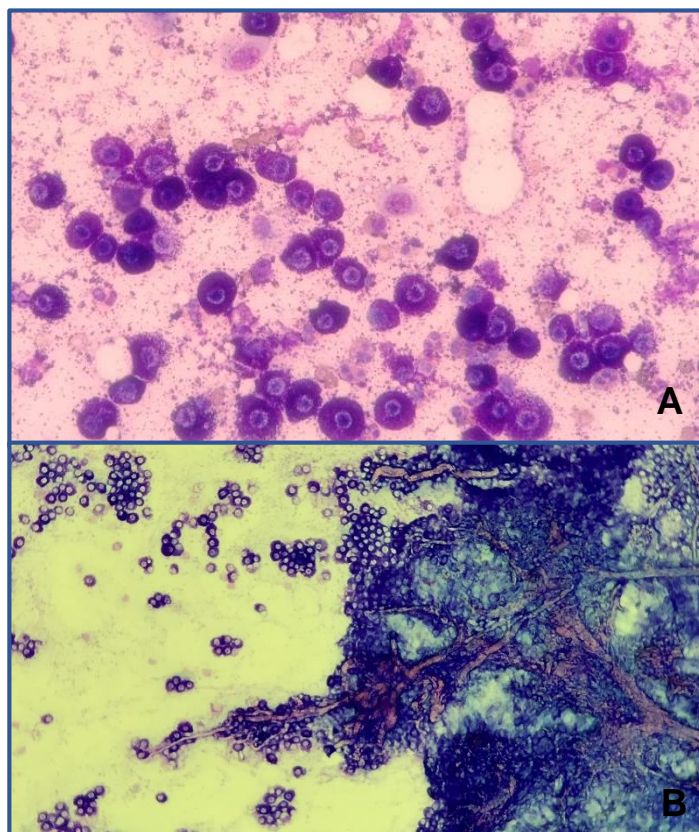
Os sinais clínicos dos MCTs são causados pela liberação de histamina, heparina e outras aminas vasoativas. Os níveis de histamina elevados levam à estimulação de receptores H2 em células parietais, produção excessiva de ácido gástrico e desenvolvimento de úlceras. Conseqüentemente, sinais como vômitos, anorexia, melena, e dor abdominal podem estar presentes (LONDON; SEGUIN, 2003; BLACKWOOD et al., 2012).

2.4 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DO MASTOCITOMA CANINO

A avaliação citológica do MCT é de grande valor, pois tem baixo custo e dispensa procedimentos anestésicos, sendo provavelmente o método mais fácil para o diagnóstico. Os mastócitos aparecem como células redondas, com núcleo redondo a oval, central, e que pode ser difícil de visualizar devido à presença de grânulos intracitoplasmáticos (Figura 3 – A e B) (WELLE et al., 2008) (LONDON; SEGUIN, 2003). Além disso, mastócitos malignos pouco diferenciados podem conter poucos ou nenhum grânulo e apresentar pleomorfismo acentuado (LONDON; SEGUIN, 2003) (COWELL; VALENCIANO, 2014).

O exame citológico permite o diagnóstico, mas não a graduação do tumor (COWELL; VALENCIANO, 2014) e a biópsia excisional é necessária para graduação histológica do tumor, que é considerada o exame padrão-ouro para prever o comportamento biológico do MCT cutâneo canino (KIUPEL et al., 2011).

Figura 3: Aparência citológica de um MCT em citologia aspirativa (coloração Panótico Rápido). A –mastócitos com granulação abundante e grânulos livres (aumento de 400x). B –fitas de colágeno associadas aos mastócitos, característica observada em algumas apresentações citológicas de MCT (aumento de 100x).



Fonte: arquivo pessoal.

2.5 DIAGNÓSTICO E GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DO MASTOCITOMA CANINO

Atualmente estão em uso dois sistemas de graduação histológica para os MCTs cutâneos. O sistema proposto por Patnaik et al. (1984) divide os MCTs em três tipos histológicos, sendo o grau I representativo de tumores bem diferenciados e de grau III tumores pouco diferenciados (mais agressivos). O grau II compreende tumores moderadamente diferenciados, criando um grupo grande e heterogêneo de lesões com diferentes comportamentos biológicos.

Um novo sistema de graduação histológica foi proposto por Kiupel et al. (2011) como um meio de superar tais limitações. Este é um sistema de dois níveis, evitando assim os problemas relacionados ao grau intermediário de Patnaik et al. (1984), e

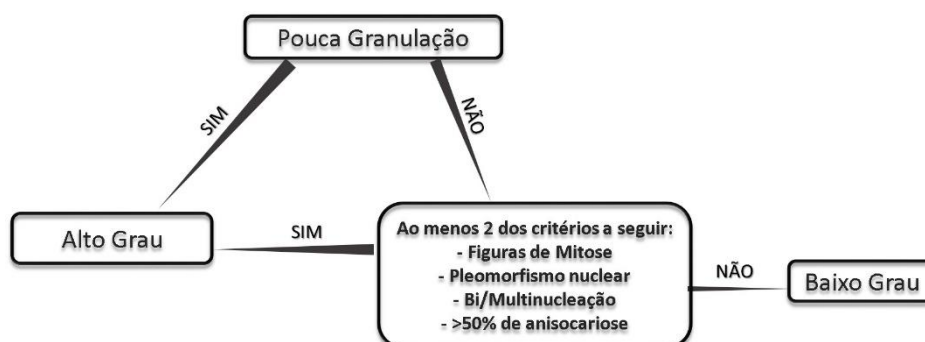
fornece importantes informações de prognóstico. Todos os critérios de classificação são baseados na morfologia nuclear e atividade mitótica, excluindo questões como a profundidade do tumor. Todos MCTs de grau I no sistema de Patnaik et al. (1984) foram classificados como baixo grau por Kiupel et al. (2011) e todos de grau III foram classificados como alto grau. Os de grau II foram na maior parte classificados como de baixo grau, e o novo sistema tem a vantagem de fornecer informações de prognóstico mais clara, em comparação com Patnaik et al. (1984) (SABATTINI et al., 2015).

Recentemente, sistemas de graduação citológica do MCT vem sendo propostos (CAMUS et al., 2016; HERGT et al., 2016), pois uma identificação precoce do grau do tumor pode ser útil para planejar estratégias de tratamento e discutir o prognóstico com o proprietário do cão.

2.6 GRADUAÇÃO CITOLÓGICA DO MASTOCITOMA CANINO

Camus et al. (2016) propuseram um sistema de graduação citológica para o MCT, obtendo 88% de sensibilidade e 94% de especificidade em relação ao grau histológico. Neste método são avaliados a presença de grânulos dos mastócitos e presença de pelo menos duas das características a seguir: figuras de mitose, bi/multinucleação, pleomorfismo nuclear e >50% de anisocariose (Figura 4).

Figura 4: Diagrama esquemático para graduação citológica de MCTs.

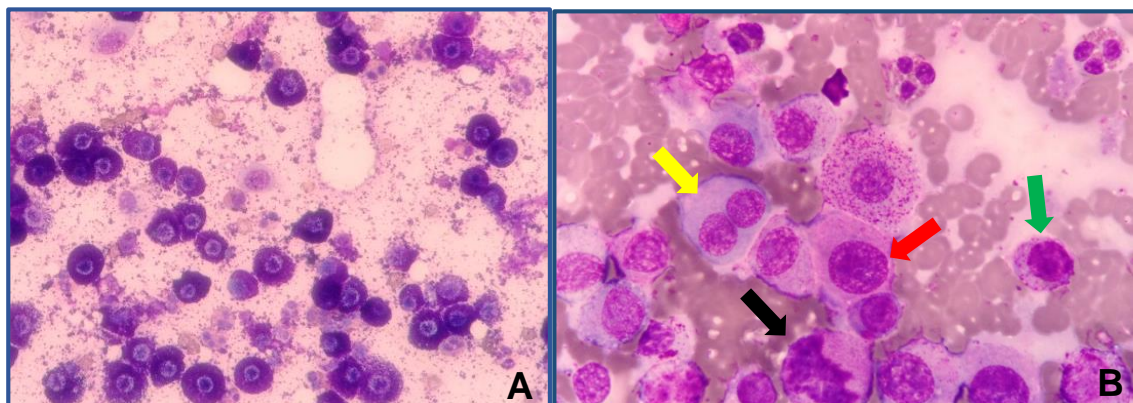


Fonte: adaptado de Camus et al. (2016).

O método proposto por Hergt et al. (2016) é baseado na aplicabilidade do sistema de Kiupel à citologia. Especificamente, os tumores com ≥ 7 mitoses/10 campos, ≥ 3 células multinucleadas/10 campos, ≥ 3 núcleos bizarros/10 campos ou presença de cariomegalia são classificados como de alto grau e todos os outros tumores são considerados de baixo grau.

Na figura 5 (A e B) estão exemplificados casos classificados como baixo e alto grau citológico, respectivamente, baseados nos dois sistemas discutidos anteriormente.

Figura 5: A – MCT de baixo grau citológico (Panótico Rápido, aumento de 400x); B – MCT de alto grau citológico (seta preta – figuras de mitose; seta amarela – binucleação; seta vermelha – anisocariose e cariomegalia; seta verde – granulação escassa) (Panótico Rápido, aumento de 1000x).



Fonte: arquivo pessoal.

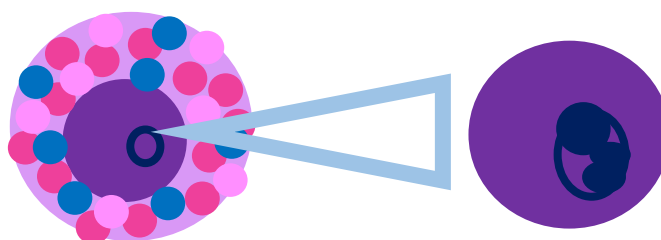
2.7 ÍNDICE AgNOR COMO MARCADOR PROGNÓSTICO PARA O MASTOCITOMA CANINO

Regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de cromossomos que contêm todos os componentes necessários para a síntese de rRNA e para a transcrição dos genes ribossomais, intimamente associadas ao componente fibrilar denso do nucléolo. A estrutura formada com a associação a proteínas não-histonas tem afinidade pela prata, possibilitando obter um indicador de proliferação celular através da impregnação com nitrato de prata (PLOTON et al., 1986; BOSTOCK et al., 1989; VAZ-CURADO et al., 2008).

Especificamente, a técnica de evidenciação da região organizadora nucleolar argirofílica (AgNOR) (Figura 6), é útil para marcar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição. Além disso, permite visualizar o nucléolo e estudar a variação do seu tamanho, através do número de pontos corados pela prata em tecidos (PLOTON et al., 1986). Estudos da técnica em neoplasias humanas mostram que o número de AgNOR por núcleo correlaciona com o grau histológico. Quanto maior o número de pontos argirofílicos intranucleares, mais desfavorável é o prognóstico (BOSTOCK et al., 1989).

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).

Figura 6: Ilustração demonstrativa da distribuição das regiões organizadoras nucleolares em um mastócito.



Fonte: arquivo pessoal.

Já foi estabelecido que a determinação do índice AgNOR em amostras citológicas é correlacionada com o índice em amostras histopatológicas e com o grau histológico, portanto constitui um método confiável para obter informações sobre o provável comportamento biológico do MCT (KRAVIS et al., 1996).

2.8 RECOMENDAÇÕES TERAPÊUTICAS PARA O MASTOCITOMA CANINO

Independente do grau e localização, todos MCTs cutâneos devem ser considerados potencialmente malignos, e deve ser feita investigação de possíveis metástases e, quando possível, remoção cirúrgica (ROGERS, 1996).

As recomendações terapêuticas dependem do estágio clínico, grau histológico e localização do tumor. Nos casos de nódulos solitários, quando é possível a excisão completa, a cirurgia é potencialmente curativa. Quando o MCT apresenta comportamento biológico mais agressivo e impossibilidade de excisão completa, quimioterapia e radioterapia prévias são indicadas para citorredução e também no pós operatório. No entanto, nos casos em que já estão presentes metástases, o tratamento recomendado é o paliativo, consistindo em quimioterapia e terapia de suporte (OLIVEIRA et al., 2020).

Para melhor definir as opções de tratamento, devem ser consideradas as variáveis clínicas envolvidas, a graduação do tumor, o comprometimento de margens e marcadores prognósticos e assim avaliar se terapias adjuvantes à cirurgia serão necessárias (BLACKWOOD et al., 2012; SLEDGE et al., 2016).

3 MANUSCRITOS

Os resultados desse trabalho encontram-se na forma de dois manuscritos, os quais serão submetido para as revistas Veterinary Clinical Pathology e Ciência Rural. As normas das revista podem ser conferidas, respectivamente, em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/1939165x/homepage/forauthors.html>

<http://coral.ufsm.br/ccrrevista/normas.html>

3.1 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO NA VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY

TITLE PAGE

**ADAPTED TECHNIQUE FOR DEMONSTRATING AgNORs IN CANINE MAST
CELL TUMOR CYTOLOGICAL SAMPLES**

Demonstration of AgNORs in canine mast cell tumors

Thaís R. Mann^{1*}, MSc

Ana M. Engelmann¹, MSc

Camila B. E. Mello¹, MSc

Cinthia M. de Andrade¹, DSc

¹Department of Small Animal Clinic, Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, Santa Maria-RS 97105900, Brazil

*Corresponding author:

Department of Small Animal Clinic, Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, Santa Maria-RS 97105900, Brazil

E-mail: thaismann@yahoo.com.br

Telephone number: +55 (055) 99979 5686

ORCID ID: 0000-0002-7648-3075

ABSTRACT

Introduction: Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) are non-histone argyrophilic nucleolar proteins associated with ribosomal genes placed in the nucleolar organizer region that reflect cell proliferation and have affinity for silver. It is useful to evaluate the prognosis by the AgNOR countings in several neoplasms, because higher AgNOR indices are related to higher-grade tumors, metastases, and shorter survival.

Objective: To report on a quick and practical technique adapted for use in routine cytology to demonstrate AgNORs.

Materials and methods: The cytopathological diagnosis of mast cell tumor (MCT) in samples collected by fine needle aspiration puncture (FNAP) was determined. Next, the slides are impregnated with a solution containing silver nitrate and analyzed under a microscope, counting the number of blackened intranuclear points, which represented the AgNORs.

Results: Better results were obtained on slides pre-stained with Diff Quik compared to the slides only fixed in methanol. The major failures identified were insufficient cellularity and absence of silver impregnation.

Conclusion: The technique reported in this study allowed satisfactory results for AgNOR counting in cytological smears from MCT. It is recommended the association with other markers to establish a comparison with the AgNOR index, which by itself does not attest to the malignant potential of a tumor.

Key words: dog, oncology, proliferative index

INTRODUCTION

Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) are non-histone argyrophilic nucleolar proteins associated with ribosomal genes placed in the nucleolar organizer region (NOR) that reflect cell proliferation.¹ NORs are loops of DNA in the nucleolus of cells where ribosomal RNA transcription occurs and have affinity for silver.^{1,2}

The silver nitrate impregnation process, which reveals AgNORs, enables to indicate cell proliferation, which is useful to evaluate the prognosis in several neoplasms, including mast cell tumors (MCT).³ It is recommended that the AgNOR index be routinely evaluated in patients with MCT, in conjunction with other prognostic

markers, as higher AgNOR counts are associated with higher rates of local and distant mast cell recurrences.⁴ In addition, higher AgNOR indices are also related to higher-grade tumors, metastases, and shorter survival times.^{2,5,6}

The aim of this study was to report on a quick and practical technique adapted for use in routine cytology to demonstrate AgNOR in canine MCT, which can also be applied to cytological slides from other neoplasms.

MATERIALS AND METHODS

Firstly, the cytopathological diagnosis of MCT in samples collected by fine needle aspiration puncture (FNAP) was determined. Next, the slides are impregnated with a solution containing silver nitrate (Synth®).

In this study, the impregnations were performed in three steps. Initially, two methods described in the literature were tried, until the third step resulted in a satisfactory outcome, thus creating an adapted technique to demonstration of NORs. In the first step, the method described by Kravis et al. (1996),² was tested, in the second step that of Lindner (1993)⁷ was tested and in the third step, the method described hereafter.

The slides were stored at room temperature until the technique was performed. In cases where it was feasible, slides were stored both fixed in methanol (Laborclin®) and also previously stained with Diff Quik (Laborclin®). As routine hospital cases were involved, it was not possible to have a parallel control of unstained and stained slides for all cases.

On the day of the impregnations, the work solution was prepared, which was composed of a mixture of silver nitrate (Synth®) and colloidal gelatine. Silver nitrate was made up in a concentration of 50%, and colloidal gelatine was made up of a concentration of 2% P.A. gelatine (Dinâmica®) and 1% formic acid (Synth®).

When performing the technique, the silver nitrate and colloidal gelatin solutions were mixed in a 2:1 ratio, respectively. A container was used that held the number of slides to be completely submerged by the volume of the final work solution (Table 1). The container with the submerged slides was incubated in an oven at 25°C for 45 minutes. Next, the slides were washed in distilled water for 2 minutes.

The slides were dried at room temperature, mounted with coverslips and mounting medium (Canada Balsam (Synth®) or Entellan®) and analyzed under a microscope at 100x magnification, counting the number of blackened intranuclear points, which represented the AgNORs in 100 mast cells.

RESULTS

The technique was tested in three steps. In steps 1 and 2, 46 cytological samples of canine MCT were used. With the reproduction of the first technique² extensive blackened precipitates were formed on the sample (Figure 1). In the next step, with the other technique⁷, weakly marked and difficult to identify AgNORs were observed. The results of these samples were not included in this study.

In the third stage, 87 cytological slides were used, in which an adaptation, combining the methods of the two techniques, was tested and good results were achieved in 47 cases (Figure 2). Of these, in 13, a comparison was made between applying the technique on slides pre-stained with Diff Quik and slides only fixed in methanol. Better results of impregnation were observed on slides that had previously received routine staining. In the other 40 cases, the cellularity in the sample was insufficient (there were not 100 mast cells for counting) and/or there was no silver impregnation. These were also excluded from the study.

DISCUSSION

Firstly, there was an unsuccessful attempt to reproduce the method described by Kravis et al. (1996)², because at a temperature of 70°C, extensive blackened precipitates formed on the sample, disabling the counting. This failure was ascribed to the high temperature, so the technique was tried at room temperature, as proposed by Lindner (1993)⁷. However, using this method, AgNORs were weakly marked and difficult to identify. Furthermore, with both methods there was variation in the impregnation, background and cells filled by precipitates and mast cell granules, which were confused with AgNORs.

Room temperature fluctuations were a limiting factor, whether due to climate change or the use of air conditioners. Therefore, the adjustment of incubating the slides

in an oven at 25°C for 45 minutes was reached. This step was tested on 87 slides, obtaining successfully results in 47 cases.

In 40 cases, the results obtained were unsatisfactory because of insufficient cellularity in the sample (there were not 100 mast cells for the counts) and an absence of silver impregnation. This last finding may be related to an insufficient penetration of silver nitrate due to unknown factors or to the low proliferative index of the analyzed tumor.

The previous staining of the slide was positive for the application of this technique, since the cases were previously analyzed and it was possible to select a good slide to determine the AgNORs, thus eliminating the insufficient cellularity factor for the final analysis. Another recommendation is to make at least three slides during the puncture, in order to obtain additional samples if necessary to remake the impregnations.

The technique reported in this study, adapted from others previously described, allowed satisfactory results for application in cytological smears of canine MCT collected through FNAP, previously stained with routine stains, enabling quick and practical application to approach the prognosis of this tumor. However, the technique is expensive, as silver nitrate has a high cost, so its use must be calculated according to the size of the container and so that the maximum number of slides can be stained.

Furthermore, for prognostic purposes, it is recommended that other markers be applied in order to establish a comparison with the AgNOR index, which by itself does not attest to the malignant potential of a tumor. Among the markers that can be applied are cytological and histopathological grading, molecular markers c-kit and ki-67, clinical staging, survival time and metastasis to lymph nodes and other organs.

Acknowledgements: NA

Conflict of interest statements: The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding: Work supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) – Funding code 001.

Ethical Approval: This study followed the guidelines of the National Center for Control Animal Experimentation and was approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM), process nr. 8372230216, approved in June, 9, 2016.

Informed Consent: The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- 1 Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.* 1986; 18: 5-14.
- 2 Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fineneedle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 209: 1418–1420.
- 3 Bostock DE, Crocker J, Harris K, Smith P. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer.* 1989; 59: 915–918.
- 4 Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-kit and its role in prognostication. *Vet Pathol.* 2007; 44: 298–308.
- 5 Simões JPC, Schoning P, Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol.* 1994; 31: 637-647.
- 6 Rech RR, Graça DL, Kommers GD, Sallis ESV, Raffi MB, Garmatz SL. Mastocitoma cutâneo canino: estudo de 45 casos (Canine cutaneous mast cell tumor: study of 45 cases). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004; 4: 441-448.

7 Lindner, LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 41, n. 3, p. 439-445, 1993.

Table 1 Instructions for preparing 150ml of work solution

100mL 50% Silver Nitrate Solution <i>50g Silver Nitrate</i> <i>100mL Distilled water</i>	50mL 2% Colloidal Gelatin Solution <i>1g Gelatin P.A.</i> <i>50mL Distilled water</i> <i>0,5mL Formic acid</i>
Final volume: 150mL of work solution in a 2:1 ratio	

Figure 1: Fine-needle aspirate of MCT impregnated with a solution containing silver nitrate. Presence of extensive blackened precipitates on the sample (arrow). 10x magnification.

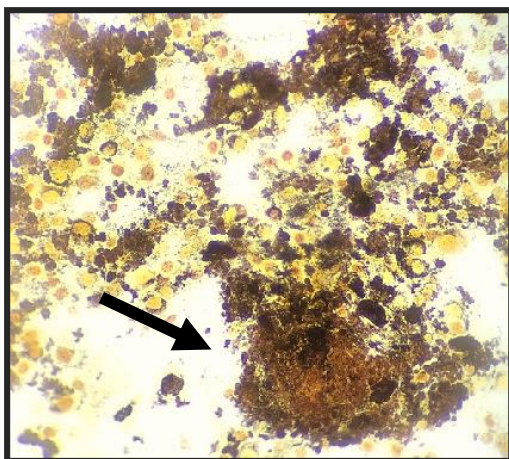


Figure 2: Fine-needle aspirate of MCT impregnated with a solution containing silver nitrate. Intranuclear black spots representing the AgNORs (arrows). 40x magnification.



1 3.2 MANUSCRITO SUBMETIDO NA CIÊNCIA RURAL

2

3 **Avaliação do índice proliferativo em amostras citológicas de cães com mastocitoma**4 **Evaluation of the AgNOR index in cytological samples from dogs with mast cell tumors**

5

6 **Thais R. Mann¹, Cinthia M. Andrade^{1*}**7 **RESUMO**

8 Mastocitomas são proliferações neoplásicas de mastócitos frequentes em animais de estimação,
9 representando até 20% de todos os tumores cutâneos caninos. A citologia aspirativa é um
10 método fácil e rápido de diagnóstico do mastocitoma e associada a marcadores proliferativos,
11 como o índice de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR), é capaz de fornecer
12 um bom indicativo do comportamento biológico do tumor. Com este trabalho pretende-se obter
13 dados relativos à predisposição sexual, racial, de locais de ocorrência e do grau citológico do
14 mastocitoma, relacionando essas informações com o índice proliferativo AgNOR. Dessa
15 forma, aplicou-se a técnica de demonstração de AgNOR's em amostras citológicas de cães e
16 obteve-se o índice AgNOR médio conforme sexo, raça, local e grau citológico. Os achados
17 demonstram que não há predisposição sexual nem racial para elevados índices AgNOR, mas
18 em alguns locais anatômicos o desenvolvimento do mastocitoma possui maiores índices
19 proliferativos. Também observou-se que altos índices AgNOR estão associados a mastocitomas
20 de alto grau, o que pode representar um pior prognóstico. O manejo dos pacientes com

¹ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, n. 1000. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: thaismann@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

1 mastocitoma ainda é um desafio e abordagem terapêutica mais apropriada é alcançada pela
2 avaliação multifatorial do paciente. A utilização do marcador proliferativo AgNOR é vantajosa
3 pois é de execução rápida e fácil e fornece suporte para que a abordagem clínica tenha melhores
4 resultados, permitindo definir a necessidade de procedimentos terapêuticos complementares
5 além da remoção cirúrgica.

6 **Palavras-chave:** PAAF, índice proliferativo, mastócitos, neoplasia, oncologia.

7

8 **ABSTRACT**

9 Mast cell tumors (MCT) are neoplastic proliferations of mast cells that are common in pets,
10 representing up to 20% of all canine skin tumors. Aspirative cytology is an easy and fast method
11 for diagnosing MCT and associated with proliferative markers, such as the argyrophilic
12 nucleolar organizer regions (AgNOR) index, enable providing a good indication of the
13 biological behavior of the tumor. The aim of this work is to obtain data on sexual and racial
14 predisposition, places of occurrence and cytological degree of the mast cell tumor, relating this
15 information to the AgNOR proliferative index. Thus, the AgNOR's demonstration technique
16 was applied in cytological samples of dogs and the AgNOR mean index was obtained according
17 to sex, race, location and cytological grade. The findings show that there is no sexual or racial
18 predisposition to high AgNOR indices, but in some anatomical sites the development of MCT
19 has higher proliferative indices. It was also observed that high AgNOR indices are associated
20 with high-grade mast cell tumors, which may represent a worse prognosis. The management of
21 patients with mast cell tumors is still a challenge and a more appropriate therapeutic approach
22 is achieved through the multifactorial assessment of the patient. The use of the AgNOR
23 proliferative marker is advantageous because it is quick and easy to perform and provides
24 support for the clinical approach having better outcomes, allowing complementary therapeutic
25 procedures in addition to surgical removal.

1 **Key words:** FNAB, proliferative index, mast cells, neoplasm, oncology.

2

3 **INTRODUÇÃO**

4 O mastocitoma é formado por proliferações neoplásicas de mastócitos e representa até
5 20% de todos os tumores cutâneos caninos (ROGERS 1996; LONDON & SEGUIN, 2003;
6 SOUZA et al., 2006). Embora os mastócitos normalmente sejam encontrados em abundância
7 nos pulmões e trato gastrointestinal, no cão a maioria dos mastocitomas ocorre na derme e
8 tecido subcutâneo (WELLE et al., 2008). Assim, tem sido sugerido que agentes cancerígenos
9 tópicos podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento deste câncer (LONDON
10 & SEGUIN, 2003). O aumento da incidência de mastocitoma em certas raças sugere a
11 possibilidade de uma causa genética subjacente, por exemplo desregulação na expressão do
12 receptor de SCF/c-kit (ROGERS 1996; WEBSTER et al., 2006; WELLE et al., 2008; SLEDGE
13 et al., 2016). No entanto, a etiopatogenia do mastocitoma no cão é desconhecida, bem como a
14 razão para a alta incidência nessa espécie (LONDON & SEGUIN, 2003).

15 A apresentação clínica do mastocitoma pode variar amplamente e, independente do grau
16 e localização, essa neoplasia deve ser considerada potencialmente maligna (BLACKWOOD et
17 al., 2012). Dessa forma, se faz necessário o rápido diagnóstico, tendo em vista a determinação
18 do prognóstico e protocolo terapêutico adequado. Para tal, a punção aspirativa por agulha fina
19 (PAAF) é de grande valor, pois tem baixo custo e dispensa procedimentos anestésicos, sendo o
20 método de diagnóstico inicial preferencial (LONDON & SEGUIN, 2003; WELLE et al., 2008).

21 No exame citológico os mastócitos são visualizados como células redondas, com núcleo
22 redondo a oval, central e que podem ser de difícil visualização devido à presença de grânulos
23 citoplasmáticos. Ainda, mastócitos com características de malignidade e pouco diferenciados
24 podem conter poucos ou nenhum grânulo (LONDON & SEGUIN, 2003). No entanto, apesar
25 da facilidade de diagnóstico pela análise citológica e tendo em vista a dificuldade existente em

1 planejar a abordagem terapêutica adequada aos pacientes com mastocitoma, métodos adicionais
2 para prever o prognóstico dessa neoplasia são recomendados, entre eles destaca-se a graduação
3 citológica descrita por CAMUS et al. (2016) e a técnica de evidenciação das AgNOR's
4 (SLEDGE et al., 2016) em amostras citológicas.

5 A técnica de AgNOR é utilizada como marcador do índice proliferativo tumoral, sendo
6 útil para evidenciar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição. Além disso, permite
7 visualizar o nucléolo e estudar a variação do seu tamanho pelo número de pontos corados por
8 prata nos núcleos das células avaliadas (PLOTON et al., 1986). BOSTOCK et al. (1989)
9 demonstraram que a contagem de AgNOR é um indicador prognóstico preciso, melhor e mais
10 específico do que o grau histológico ou índice mitótico (BOSTOCK et al., 1989; SIMÕES et
11 al., 1994; KRAVIS et al., 1996; RECH et al., 2004; WEBSTER et al., 2007; SLEDGE et al.,
12 2016). Assim, recomenda-se que o índice AgNOR seja rotineiramente avaliado em pacientes
13 com mastocitoma, pois maiores índices AgNOR estão associadas a maiores taxas de recidivas
14 locais e distantes do sítio inicial, tumores de grau mais elevado, metastatizações e menor tempo
15 de sobrevida (SIMÕES et al., 1994; KRAVIS et al., 1996; RECH et al., 2004; WEBSTER et
16 al., 2007). Estudos da técnica em neoplasias humanas mostraram que o número de AgNOR por
17 núcleo correlaciona com o grau histológico. Quanto maior o número de pontos argirofílicos
18 intranucleares, pior é o prognóstico (BOSTOCK et al., 1989).

19 Nesse contexto, o objetivo deste estudo é gerar dados que auxiliem na caracterização do
20 perfil de animais afetados pelo mastocitoma, incluindo sexo, raça e local de ocorrência e grau
21 citológico dos tumores e relacionando essas informações com o índice proliferativo do
22 mastocitoma através da contagem de AgNOR.

23

24 **MATERIAIS E MÉTODOS**

25 *1. Seleção das Amostras*

1 Foram selecionadas amostras citológicas de cães, com mastocitoma, cujo diagnóstico
2 foi feito por PAAF. O diagnóstico foi previamente realizado com a utilização de corante
3 Panótico Rápido (Laborclin®).

4 As amostras foram avaliadas quanto à viabilidade – presença de mastócitos suficientes
5 para as contagens e presença de informações clínicas para cada caso selecionado. As fichas de
6 atendimento dos pacientes foram revisadas quanto à raça, sexo, localização anatômica do tumor
7 e grau citológico e histológico (quando disponíveis), resultando em 63 casos no total, gerando
8 informações para associação com o índice AgNOR. O grau histológico estava descrito em
9 apenas 11 casos, portanto optou-se por não utilizar este dado no estudo.

10 Para a variável raça, os animais foram divididos em dois grupos: cães com raça definida
11 e cães sem raça definida (SRD). Para um caso não havia descrição sobre a raça, portanto esse
12 não foi contabilizado na tabulação dos dados referentes à raça, totalizando 62 casos para esta
13 variável.

14 Quanto ao sexo, em todas as fichas constava a informação, totalizando 63 casos avaliados.

15 As localizações anatômicas foram agrupadas pelas seguintes regiões, totalizando 63
16 casos:

17 Cabeça: incluindo orelhas, perioral, pálpebras e face como um todo;

18 Cervical: incluindo face ventral, dorsal e imediações do pescoço;

19 Membros torácicos: incluindo todas as estruturas desde a região escapular até dígitos dos
20 membros torácicos direito e esquerdo;

21 Tórax: incluindo regiões costais direita e esquerda e região torácica ventral;

22 Dorso: incluindo toda extensão desde a cintura escapular até base da cauda;

23 Abdomen: incluindo extensão ventral desde a região xifoide até períneo e flancos
24 direito e esquerdo;

1 Genital: incluindo prepúcio e escroto para os machos, vulva para as fêmeas e períneo
2 para ambos os sexos;

3 Membros pélvicos: incluindo todas estruturas desde a região coxofemoral até dígitos
4 dos membros pélvicos direito e esquerdo;

5 Cauda em toda sua extensão;

6 Múltiplas localizações: incluindo casos em que o cão apresentou dois ou mais nódulos
7 em regiões distintas.

8 Para a variável grau citológico, em 36 casos constava a informação referente à
9 graduação pelo sistema de CAMUS et al. (2016).

10

11 *2. Técnica para Demonstração de AgNOR*

12 As lâminas citológicas foram preparadas para avaliação do índice AgNOR conforme
13 técnica adaptada a partir das metodologias descritas por KRAVIS et al. (1996) e LINDNER
14 (1993). Preparou-se uma solução de nitrato de prata (Synth®) em concentração de 50% e uma
15 solução de gelatina coloidal em concentração de 2% de gelatina P.A (Dinâmica®) e 1% de
16 ácido fórmico (Synth®). As lâminas foram imersas em solução na proporção de 2 volumes de
17 nitrato de prata para 1 volume de gelatina coloidal, incubadas em estufa a temperatura de 25°C
18 durante 45 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram enxaguadas com água
19 destilada durante 2 minutos, secas ao ar, montadas com lamínulas através de meio de montagem
20 Entellan® ou Bálsamo do Canadá (Synth®) e observadas ao microscópio óptico em objetiva
21 de imersão (100x). Para determinação do índice AgNOR, foram contados os pontos enegrecidos
22 corados pela prata em 100 núcleos de mastócitos, conforme metodologia recomendada por
23 CROCKER et al. (1989). O valor obtido foi dividido por 100, gerando um índice que é
24 habitualmente relacionado a outros parâmetros, por exemplo: grau histológico ou citológico,

1 índice mitótico e estadiamento clínico do tumor. Neste trabalho, o índice foi relacionado ao
2 sexo, à raça, à localização anatômica do tumor e ao grau citológico

3

4 *3. Análise Estatística*

5 Os dados foram analisados através de métodos estatísticos descritivos com tabulação de
6 dados e geração de tabelas em Microsoft Excel 2013®.

7

8 **RESULTADOS**

9 Um total de 63 amostras citológicas de cães com mastocitoma foram avaliadas em
10 relação ao índice proliferativo pela demonstração das AgNORs (fig. 1). Desses cães, 31 eram
11 machos e 32 eram fêmeas. Trinta e dois animais eram sem raça definida (SRD), 30
12 apresentavam raça definida e para um cão não constava informação referente à raça.

13 Os locais anatômicos dos mastocitomas incluídos no estudo foram: cabeça (n=4), região
14 cervical (n=2), membros torácicos (n=7), região torácica (n=6), região dorsal (n=5), região
15 abdominal (n=12), região genital (n=14), membros pélvicos (n=6), cauda (n=1) e múltiplas
16 localizações (n=6).

17 A média geral do índice AgNOR nas amostras citológicas de mastocitoma canino foi
18 de 1,85, com quantidade mínima de 0,02 AgNOR e máxima 4,84 AgNOR. As médias das
19 frequências AgNOR para a variável sexo foram: machos 1,81 e fêmeas 1,88 (tabela 1). Já para
20 a variável raça, obteve-se média de índice AgNOR 1,83 em animais sem raça definida e 1,81
21 para aqueles com raça definida (tabela 2). Em relação à localização anatômica, os tumores na
22 região da cabeça apresentaram índice AgNOR médio de 2,45; na região cervical de 1,86
23 AgNOR; em membros torácicos de 1,41 AgNOR; na região torácica de 1,81 AgNOR; na região
24 dorsal de 1,70 AgNOR; na região abdominal de 1,87 AgNOR; na região genital de 1,62

1 AgNOR; em membros pélvicos de 2,11 AgNOR; na cauda 1,78 AgNOR e aqueles com dois ou
2 mais locais com nódulos a média foi de 2,39 AgNOR (tabela 3).

3 Naqueles tumores classificados com grau citológico alto (n=26), a média geral de
4 AgNOR foi de 2,06 e nos de grau citológico baixo (n=10) de 1,32 (tabela 4).

5

6 **DISCUSSÃO**

7 A frequência de AgNOR em amostras citológicas de mastocitoma pode ser
8 significativamente correlacionada com a frequência desse índice em amostras de biópsia e com
9 grau histológico do tumor (KRAVIS et al., 1996). No entanto, no presente estudo, das 63 fichas
10 clínicas avaliadas em apenas 11 haviam informações sobre a graduação histológica do tumor,
11 o que impossibilitou a utilização desse parâmetro como um dado a ser analisado em conjunto
12 com o índice AgNOR.

13 A maioria dos mastocitomas se desenvolvem na pele e agentes cancerígenos tópicos
14 podem desempenhar um papel na etiopatogenia dessa neoplasia. Mastocitomas cutâneos
15 ocorrem geralmente como nódulos solitários e aproximadamente 50% deles está localizado no
16 tronco e região perineal, 40% nos membros, e 10% na cabeça e pescoço (WELLE et al., 2008).
17 Em relação aos locais onde o mastocitoma se desenvolve, obteve-se a média mais alta de
18 AgNOR na cabeça, incluindo face, orelhas e região oral, mesmo não sendo este o local de maior
19 frequência diagnóstica neste estudo. A presença de inflamações, como otites crônicas, por
20 exemplo, e a presença de mastócitos em mucosas de revestimento nas cavidades oral e nasal
21 podem caracterizar um fator determinante para que nesses locais o tumor possua maior índice
22 proliferativo. Ainda, já foi demonstrado que mastocitomas em mucosas possuem
23 comportamento biológico mais agressivo, não podendo ser descartado o fato de que em alguns
24 desses locais o acesso cirúrgico é dificultado (WELLE et al., 2008).

1 Cães com mais de um mastocitoma apresentaram também alta média para o índice
2 AgNOR. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OWEN, 1980), a presença de mais de
3 um mastocitoma já é indicativa de estadiamento clínico 3, o que justifica um alto índice AgNOR
4 nesses casos.

5 Com relação à raça, não se observou frequências AgNOR mais elevadas em um grupo
6 específico. A influência das raças caninas no prognóstico e índices de proliferação do
7 mastocitoma deve ser melhor investigada, uma vez que o aumento da incidência dessa neoplasia
8 em determinadas raças sugere a possibilidade de uma causa genética subjacente (LONDON &
9 SEGUIN, 2003; WEBSTER et al., 2006; WELLE et al., 2008; TAKEUCHI et al., 2010;
10 BLACKWOOD et al., 2012; SHOOP et al., 2015).

11 Os cães da raça boxer podem ser citados como exemplo da influência da raça na
12 incidência e prognóstico de mastocitomas. Esses apresentam uma alta predisposição para
13 mastocitoma, no entanto, é relatado que nessa raça a maioria dos mastocitomas tendem a ser
14 bem diferenciados, com melhor prognóstico (LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM et al.,
15 2006; SLEDGE et al., 2016) e comportamento biológico menos agressivo (PATNAIK et al.,
16 1984; WELLE et al., 2008).

17 Não foi observada predisposição sexual para o desenvolvimento de mastocitomas com
18 maiores índices proliferativos, como também já foi demonstrado na maioria dos estudos que
19 não há predileção por ou associação entre gênero e sobrevivência em cães com mastocitoma
20 (LONDON & SEGUIN, 2003; BLACKWOOD et al., 2012).

21 Verificou-se que para os mastocitomas classificados como alto grau citológico, a média
22 de AgNOR foi superior àqueles de baixo grau citológico. Sabe-se que cães com mastocitoma
23 de alto grau tem menores taxas de sobrevida, maior probabilidade de desenvolver tumores
24 adicionais e conseqüentemente pior prognóstico (CAMUS et al., 2016). Dessa forma, os
25 achados deste estudo favorecem a utilização do índice AgNOR como um fator para prever o

1 comportamento do mastocitoma, em conjunto com a análise citológica prévia à intervenção
2 cirúrgica.

3

4 **CONCLUSÃO**

5 O manejo dos pacientes com mastocitoma ainda é um desafio para os clínicos de
6 pequenos animais. A abordagem terapêutica mais apropriada é alcançada pela avaliação
7 multifatorial do paciente, portanto é importante a utilização de métodos auxiliares de
8 diagnóstico e prognóstico permitindo um melhor resultado.

9 A utilização da técnica de demonstração das AgNOR's para determinar o índice
10 proliferativo do tumor tem grandes vantagens no sentido de fornecer o suporte para que a
11 abordagem clínica tenha melhores resultados, pois é um método de execução rápida, pode ser
12 feito diretamente na lâmina de avaliação citológica, sem necessidade de coleta de outras
13 amostras ou procedimentos cirúrgicos, tem boa correlação com grau histológico (KRAVIS et
14 al., 1996) e permite definir a necessidade de procedimentos terapêuticos complementares além
15 da remoção cirúrgica. Em adição, a técnica AgNOR em amostras citológicas demonstrou boa
16 relação com o grau citológico do mastocitoma.

17

18 **Agradecimentos:** à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

19 **Declarações de conflito de interesses:** Os autores não declararam nenhum potencial conflito
20 de interesses com relação à pesquisa, autoria e / ou publicação deste artigo.

21 **Comitê de Ética e Biossegurança:** Este estudo seguiu as diretrizes do Centro Nacional de
22 Controle de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da
23 Universidade Federal de Santa Maria (CEUA / UFSM), processo nr. 8372230216, aprovado em
24 9 de junho de 2016.

1 Referências

- 2 1. BLACKWOOD, L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and
3 cats. **Vet Comp Oncol.** v.10, p. 1–29, 2012. Disponível em:
4 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x> Acesso em:
5 23/06/2021. doi: 10.1111/j.1476-5829.2012.00341.x
- 6 2. BOSTOCK, D.E., et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis
7 in canine spontaneous mast cell tumours. **Br J Cancer.** v.59, p.915–918, 1989. Disponível
8 em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2246742/> Acesso em: 23/06/2021.
9 doi: 10.1038/bjc.1989.193
- 10 3. CAMUS et al. Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of
11 clinical outcome. *Veterinary Pathology.* v53, n.6, p.1117-1123, 2016. Disponível em:
12 <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985816638721> Acesso em: 24/06/2021.
13 doi: 0.1177/0300985816638721
- 14 4. CROCKER, J. et al. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized
15 approach. **J of Pathol.** v158, p.185-188, 1989. Disponível em:
16 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2475599/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
17 10.1002/path.1711580303
- 18 5. KRAVIS, L.D. et al. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fineneedle
19 aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. **J Am Vet Med Assoc.** v.209,
20 p.1418–1420, 1996.
- 21 6. LINDNER, L.E. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer
22 regions (AgNOR). **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.41, n.3, p. 439-
23 445, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8429207/> Acesso em:
24 23/06/2021. doi: 10.1177/41.3.8429207

- 1 7. LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumours in the dog. **Vet Clin North Am Small**
2 **Anim Pract.** v.33, p. 473–489, 2003. Disponível em:
3 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12852232/> Acesso em: 23/06/2021. doi: 10.1016/s0195-
4 5616(03)00003-2
- 5 8. OWEN, L.N. TNM classification of tumours in domestic animals. 1ªed. Geneva: **World**
6 **Health Organization.** 1980. Disponível em:
7 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68618/VPH_CMO_80.20_eng.pdf
8 Acesso em: 24/06/2021
- 9 9. PATNAIK, A.K. et al. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival
10 time in 83 dogs. **Vet Pathol.** v.21, p.469–474, 1984. Disponível em:
11 <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098588402100503> Acesso em:
12 23/06/2021. doi: 10.1177/030098588402100503
- 13 10. PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic
14 proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J.** v18, p5-14,
15 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2423479/> Acesso em: 23/06/2021.
16 doi: 10.1007/BF01676192
- 17 11. RECH, R.R. et al. Mastocitoma cutâneo canino: estudo de 45 casos (Canine cutaneous mast
18 cell tumor: study of 45 cases). **Arq Bras Med Vet Zootec.** v4, p441-448, 2004. Disponível
19 em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/GVT9LP4PW69bBxmPNG66jHN/?lang=pt> Acesso
20 em: 23/06/2021. doi: 10.1590/S0102-09352004000400004
- 21 12. ROGERS, K.S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Vet Clin North**
22 **Am Small Anim Pract.** v.26, p.87–102, 1996. Disponível em:
23 [https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616\(96\)50008-2/fulltext](https://www.vetsmall.theclinics.com/article/S0195-5616(96)50008-2/fulltext) Acesso em:
24 23/06/2021. doi: 10.1016/S0195-5616(96)50008-2

- 1 **13.** SHOOP, S.J. et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England.
2 **Canine Genet. Epidemiol.** v.2, p1–19, 2015. Disponível em:
3 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4579370/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
4 10.1186/2052-6687-2-1
- 5 **14.** SIMÕES, J.P.C. et al. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods.
6 **Vet Pathol.** v.31, p.637-647, 1994. Disponível em:
7 <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589403100602> Acesso em:
8 23/06/2021. doi: 10.1177/030098589403100602
- 9 **15.** SLEDGE, D.G. et al. Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and
10 pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection. **The Vet J.** v.215,
11 p.43-54, 2016. Disponível em:
12 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023316300752> Acesso em:
13 23/06/2021. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.06.003
- 14 **16.** SOUZA, T.M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães (Retrospective
15 study on 761 canine skin tumors). **Ciencia Rural.** v.36, p.555-560, 2006. Disponível em:
16 <https://www.scielo.br/j/cr/a/PfL8Qcpz4Z8hSb55yQZKPLq/?lang=pt> Acesso em:
17 23/06/2021. doi: 10.1590/S0103-84782006000200030
- 18 **17.** TAKEUCHI, Y. et al. Aberrant autophosphorylation of c-Kit receptor in canine mast cell
19 tumor cell lines. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.137, p.208–216, 2010. Disponível em:
20 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20591500/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
21 10.1016/j.vetimm.2010.05.009
- 22 **18.** THAMM, D.H. et al. Outcome and prognostic factors following adjuvant
23 prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **J Vet**
24 **Med Sci.**v.68, p.581–587, 2006. Disponível em:

- 1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16820715/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
 2 10.1292/jvms.68.581
- 3 **19.** WEBSTER, J.D. et al. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous
 4 mast cell tumors. **Neoplasia**. v.8, p.104–111, 2006. Disponível em:
 5 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1578516/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
 6 10.1593/neo.05622
- 7 **20.** WEBSTER, J.D. et al. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors:
 8 associations with c-kit and its role in prognostication. **Vet Pathol**. v.44, p.298–308, 2007.
 9 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17491070/> Acesso em: 23/06/2021. doi:
 10 10.1354/vp.44-3-298
- 11 **21.** WELLE, M.M et al. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical
 12 features, pathology and treatment. **Vet Dermatol**. v.19, p.321–339, 2008. Disponível em:
 13 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18980632/> Acesso em: 23/06/2021. doi: 10.1111/j.1365-
 14 3164.2008.00694.x

15

16 **Tabelas**

17

18 **Tabela 1:** Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado ao sexo (n=63).

SEXO	ÍNDICE AGNOR
	MÉDIO
MACHOS	1.81
FÊMEAS	1.88

19

20

1 **Tabela 2:** Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado à raça (n=62).

RAÇA	ÍNDICE AGNOR
	MÉDIO
CÃES COM RAÇA DEFINIDA	1.81
CÃES SEM RAÇA DEFINIDA	1.83

2

3

4 **Tabela 3:** Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado ao local anatômico
5 do tumor (n=63).

LOCAL	ÍNDICE AGNOR
	MÉDIO
CABEÇA	2.45
MÚLTIPLOS	2,39
MEMBRO PÉLVICO	2.11
ABDOMEN	1.87
CERVICAL	1.86
TORÁCICA	1,81
CAUDA	1.78
DORSO	1.70
GENITAL	1.62
MEMBRO TORÁCICO	1.41

6

7

1 **Tabela 4:** Médias do índice AgNOR em mastocitomas caninos relacionado à graduação
2 citológica (n=36).

GRAU CITOLÓGICO	ÍNDICE AGNOR
	MÉDIO
ALTO GRAU	2,06
BAIXO GRAU	1,32

3

4

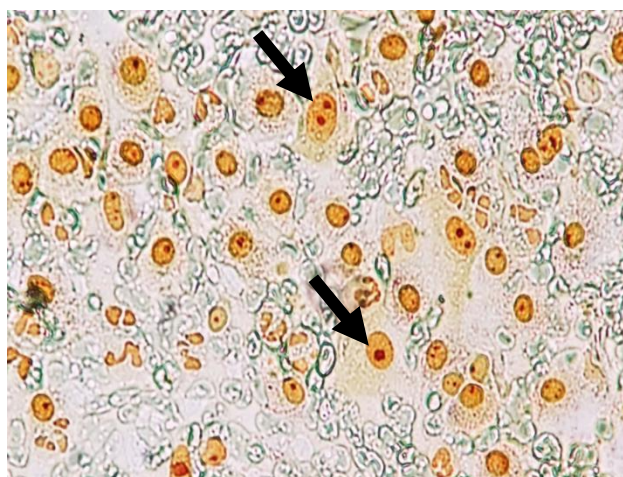
5 **Legenda da Figura**

6 **Fig.1** – Fotomicrografia de um mastocitoma canino, demonstrando as AgNOR's em técnica de
7 impregnação pelo nitrato de prata (setas). Aumento 40x.

8

9 **Figura**

10 Fig. 1



16

17

18

4 DISCUSSÃO

O MCT é um tumor de diagnóstico muito frequente na clínica médica de cães, e ainda representa um desafio quanto ao prognóstico e tratamento dos animais afetados. Apesar de muitos avanços e de a gradação histológica ser o padrão-ouro para estabelecer o prognóstico do MCT, esta por si só não pode prever o comportamento de cada MCT específico. Vários estudos abordam o MCT canino, tanto referentes ao comportamento biológico, como às modalidades terapêuticas e tentativas de prever 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).

Em inúmeros estudos demonstra-se que a avaliação de amostras citológicas de MCT 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).

Para exemplificar uma das vantagens do exame citopatológico, um cão com MCT 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 aspiradas do tumor em menor período de tempo, para ser escolhida a melhor abordagem terapêutica. Outro ponto positivo, é a possibilidade de aplicar a técnica de AgNOR na mesma amostra citológica, resguardando o animal de nova punção e permitindo antecipar o índice proliferativo previamente ao procedimento cirúrgico ou terapêutico.

A técnica descrita neste estudo é vantajosa para auxiliar na conduta dos pacientes com MCT, pois é aplicada de maneira simples e rápida. Uma vez que os índices médios ficam próximos a 1,8 AgNOR, podemos propor esse índice como um ponto de corte para classificar os MCTs em alto índice proliferativo ($>1,8$) ou baixo índice proliferativo ($<1,8$).

Outra consideração importante desse estudo é referente à abordagem do paciente com MCT. Esta deve ser feita de maneira sistemática, primeiramente considerando os aspectos que levam à suspeita de MCT. Por ser um tumor com

apresentações clínicas variáveis, qualquer nódulo em qualquer região anatômica de cães deve ser investigado para descartar a possibilidade de MCT e conseqüentemente deverá ser puncionado.

Durante a anamnese, queixas como vômitos esporádicos ou frequentes, aumento de volume e vermelhidão transitórias, sangramentos, ulceração e coceira no local da nodulação são advertências significativas pois estão diretamente relacionadas aos efeitos da degranulação de mastócitos.

Uma vez chegando-se ao diagnóstico de MCT através do exame citopatológico, é interessante que se faça a graduação citológica conforme o sistema proposto por CAMUS et al. (2016) e em seguida a impregnação pelo nitrato de prata para a determinação do índice AgNOR.

Com as informações citológicas obtidas, é necessário estadiar o paciente conforme as diretrizes da OMS. É imprescindível inspecionar o paciente em busca de outras nodulações, investigação de linfonodos e pesquisa de metástases. Também é indispensável a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos para examinar presença de mastocitemia e função e lesão hepática especialmente, pois o fígado é um dos órgãos com tendência a metástase de MCT.

Finalmente, com essa rotina de abordagem pode ser eleito o melhor planejamento terapêutico para cada paciente com MCT, seja optando-se pela excisão cirúrgica e/ou com terapias paliativas e complementares.

Roteiro sugerido para avaliação do paciente canino com suspeita de Mastocitoma

a) Aspecto clínico: qualquer nodulação em qualquer localização anatômica pode ser mastocitoma.

b) Anamnese: atentar para sinais de degranulação de mastócitos.

c) Exame citopatológico com graduação e índice AgNOR.

d) Estadiamento conforme OMS.

e) Exames complementares – painel hematológico e bioquímico.

f) Abordagem: cirúrgica, cirúrgica e terapia complementar, paliativa.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O manejo dos pacientes com mastocitoma ainda é um desafio para os clínicos de pequenos animais. A abordagem terapêutica mais apropriada é alcançada pela avaliação multifatorial do paciente, portanto é importante a utilização de um roteiro que inclui métodos auxiliares de diagnóstico e prognóstico, permitindo um melhor resultado.

A utilização da técnica de demonstração das AgNOR's em amostras citológicas para determinar o índice proliferativo do tumor tem grandes vantagens no sentido de fornecer o suporte para que a abordagem escolhida tenha melhores resultados, pois é um método de execução rápida e simples, passível de ser realizado antes mesmo de um procedimento cirúrgico.

O roteiro de abordagem do paciente deve ser bem definido e envolve o aspecto clínico, achados de anamnese e exames complementares, especialmente o citopatológico com a determinação do índice AgNOR.

REFERÊNCIAS

- AUSTEN, K.F.; BOYCE, J.A. Mast cell lineage development and phenotypic regulation. **Leukemia Research**, v.25, p.511–518, 2001.
- BLACKWOOD, L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Vet Comp Oncol**, v.10, p.1-29, 2012.
- BOOKBINDER, P.F.; BUTT M.T.; HARVEY H.J. Determination of the number of mast cells in lymph node, bone marrow, and buffy coat cytologic specimens from dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.200, n.11, p.1648–1650, 1992.
- BOSTOCK, D.E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**. v.142, p.1–19, 1986.
- 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, M.S. 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, R.M.G. C-kit as a prognostic and therapeutic marker in canine cutaneous mast cell tumours: from laboratory to clinic. **Vet. Journal**. v.205, p.5-10, 2015.
- 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.
- CROCKER J. et al. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**. v.158, n.3, p.185-188, 1989.
- HERGT, F. et. al. Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens. **Veterinary Clinical Pathology**. v.45, n.3, p.477-483, 2016.
- 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.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4^o 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.

O'KEEFE, D.A. Systemic mastocytosis in 16 dogs. **J Vet Intern Med.** v.1, p.75–80, 1987.

OLIVEIRA, M.T. et al. Canine and feline cutaneous mast cell tumour: a comprehensive review of treatments and outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine.** v.41, 2020.

OWEN, L.N. TNM classification of tumours in domestic animals. 1st ed. Geneva: **World Health Organization.** 1980.

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.

PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.**, v.18, p.5-14, 1986.

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.

ROBINSON, W.P. Intramuscular mast cell tumors in 7 dogs. **Can. Vet. J.** v.58, n.9, p.931-935, 2017.

ROGERS, K.S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.** v.26, n.1, p.87-102, 1996.

RUSSEL, D.S. et al. Characterizing microscopical invasion patterns in canine mast cell tumours and soft tissue sarcomas. **J. Comp. Path.** v.157, p. 231-240, 2017.

SABATTINI, S. et al. Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3? **Veterinary Pathology.** v.52, n.1, p.70-73, 2015.

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

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.

SOUZA, T.M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural,** v.36, n.2, p.555-560, 2006.

STREFEZZI, R.F. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. **J Vet Diagn Invest.** v.21, n.6, p. 821-825, 2009.

TAKEUCHI, Y. 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, 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. **Vet Pathol**, v. 48, n.1, p. 169-181, 2011.

VAZCURADO, A.P.; GUERRA, J.L.; DIAS, R.A. Estudo quantitativo e morfológico das regiões organizadoras de nucléolo coradas pela prata (AgNORs) em neoplasias benignas e malignas da glândula mamária da espécie canina. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, São Paulo, v. 45, n.3, p.206-210, 2008.

WEBSTER, J.D. 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 Vet Res**, v. 4, n. 32, p. 1-8, 2008.

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