

## Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos

[Canine cutaneous mast cell tumor. Study of 45 cases]

R.R. Rech<sup>1</sup>, D.L. Graça<sup>2\*</sup>, G.D. Kommers<sup>2</sup>, E.S.V. Sallis<sup>1</sup>, M.B. Raffi<sup>1</sup>, S.L. Garmatz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aluna de Pós-graduação em Patologia Veterinária – UFSM  
<sup>2</sup>Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria  
Faixa de Camobi, km 9 – Prédio 20  
Campus Universitário  
97105-900 - Santa Maria, RS

### RESUMO

Quarenta e cinco mastocitomas cutâneos caninos foram graduados histologicamente com o uso de hematoxilina-eosina. Foram empregados os métodos azul de toluidina e região organizadora nucleolar argirofílica (AgNOR) para, respectivamente, evidenciar os grânulos citoplasmáticos e avaliar o índice de proliferação celular. Diversas características histológicas foram observadas, como distribuição das células na pele, tamanho, forma, aspecto de citoplasma e núcleo, quantidade de estroma, presença de eosinófilos e alterações associadas. Com base nessas características, 37,8% dos mastocitomas foram classificados como grau I, 51,1% como grau II e 11,1% como grau III. A média geral de AgNOR nos mastocitomas foi de 1,9 (1,2 a 4,3) e as médias para os graus I, II e III foram, respectivamente, de 1,5, 1,85 e 3,25. A técnica de AgNOR mostrou ser de fácil execução, custo acessível e confiável como meio auxiliar para estimar um prognóstico mais objetivo para os mastocitomas.

Palavras-chave: cão, mastocitoma, AgNOR

### ABSTRACT

*Forty-five cutaneous canine mast cell tumors were graded histologically on haematoxylin and eosin-stained sections. Toluidine blue and AgNOR methods were employed to enhance the intracytoplasmic granules and to assess cell proliferation, respectively. From these 45 samples histological features were observed as cell distribution, size, shape, nuclear and cytoplasmic appearance, amount of stroma, presence of eosinophils and some associated changes. Based on those features, 37.8% of the mast cell tumors were classified as grade I, 51.1% as grade II and 11.1% as grade III. General AgNOR mean value was 1.9 (range 1.2-4.3) whereas the means for grades I, II and III were, respectively, 1.2, 1.85 and 3.25. The AgNOR method proved to be feasible, inexpensive and a reliable tool to predict a more accurate prognosis for mast cell tumors.*

*Keywords: dog, mast cell tumor, AgNOR*

---

Recebido para publicação em 6 de março de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 17 de dezembro de 2003

\*Autor para correspondência

E-mail: dlgraca@smail.ufsm.br

## INTRODUÇÃO

Mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo, de origem hematopoética e longa vida, que mantêm a capacidade de proliferar após a maturação (Zappulla et al., 2002). O achado característico de mastócitos maduros é a presença de grânulos citoplasmáticos que contêm substâncias biologicamente ativas, como histamina e heparina (Metcalf et al., 1997).

Em cães, as principais patologias relacionadas com os mastócitos são as reações de hipersensibilidade tipo I, local e sistêmica (Tizard, 1998) e os mastocitomas (Scott et al., 1996).

Mastocitoma é a neoplasia cutânea mais freqüente do cão, compreende 7 a 21% dos tumores cutâneos caninos e 11 a 27% das neoplasias malignas (Vail, 1996). Ocorre principalmente em cães com idade média de 8-9 anos (Vail, 1996), e não existe aparente predileção por sexo (Scott et al., 1996). As raças mais predispostas são Boxer, Boston Terrier, Bull Terrier, Labrador Retriever, Fox Terrier, Beagle e Schnauzer (Patnaik et al., 1984; Vail, 1996). Contudo, recentes levantamentos demonstram que cães sem raça definida e das raças Cocker Spaniel, Pit Bull Terrier e Shar-Pei também são predispostos aos mastocitomas (Miller, 1995).

A causa dos mastocitomas não está completamente elucidada, mas recentemente se indicou que há mutações no ponto do gene *c-kit*, que codifica o domínio justamembrana do receptor tirosina-quinase do *stem cell factor* (SCF), em mastócitos neoplásicos de cães (Reguera et al., 2000). A principal mutação encontrada foi duplicação que causa fosforilação constitutiva do receptor, sem a necessidade da ligação com SCF. Isso explica o crescimento descontrolado dos tumores e a relação positiva das duplicações com a malignidade do mastocitoma (Zemke et al., 2002).

O diagnóstico definitivo é realizado por preparações citológicas e histológicas. Para um prognóstico acurado, é necessário avaliar o grau histológico pelo método de rotina da hematoxilina-eosina (HE), com auxílio de colorações especiais como azul de toluidina e região organizadora nucleolar argirofílica

(AgNOR) (Simões et al., 1994). A técnica de AgNOR é útil para marcar o DNA ribossomal e seus níveis de transcrição, permitindo visualizar o nucléolo e estudar a variação do tamanho do nucléolo e o 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, pior é o prognóstico (Bostock et al., 1989).

Os objetivos deste estudo foram classificar 45 mastocitomas de acordo com o grau histológico e determinar a média de AgNOR para cada grau.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram aleatoriamente selecionados 45 mastocitomas cutâneos diagnosticados no setor de patologia veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, para realização de três métodos histoquímicos (HE, azul de toluidina e AgNOR) com o objetivo, respectivamente, de avaliar o grau histológico, a presença de grânulos metacromáticos e as AgNOR.

Para avaliar o grau histológico, foi obtida uma secção de 5µm de espessura de cada tumor e corada com HE (Culling et al., 1985). Cada mastocitoma foi graduado de acordo com os critérios propostos por Patnaik et al. (1984). Esses critérios incluem quantidade de citoplasma, forma e diferenciação celular, coloração e forma do núcleo, número de nucléolos, número de figuras mitóticas e outras alterações, como edema e necrose. Esses dados permitem diferenciar os mastocitomas em três graus: grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) e grau III (pouco diferenciado).

A técnica azul de toluidina permite visualizar grânulos citoplasmáticos metacromáticos em mastócitos (Culling et al., 1985). Cortes de 5µm de espessura de cada mastocitoma foram desparafinados e hidratados em água destilada e posteriormente imersos em solução de toluidina a 0,1% por 1 a 2 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água destilada, desidratadas, clarificadas e montadas (Culling et al., 1985).

Para realizar a técnica de AgNOR (argiophilic nucleolar organizer region), foi obtido um corte de 5µm de espessura de cada mastocitoma. Os cortes foram desparafinados e hidratados em água deionizada e posteriormente corados em uma solução de gelatina a 2% e ácido fórmico a 1% em água deionizada e solução de nitrato de prata a 50% na proporção de 1:2. As lâminas ficaram imersas nessa solução durante 45min em temperatura ambiente. Foram lavadas em água deionizada por 1min, desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Bostock et al., 1989; Simões et al., 1994; Kravis et al., 1996). Para definir a frequência de AgNOR, foram contados os pontos pretos no interior dos núcleos em 100 mastócitos tumorais, em campos aleatórios e representativos de maior aumento (1000X). Um campo representativo é definido como uma área do tumor de pelo menos 10 células tumorais entre a junção normal e as células neoplásicas. A frequência foi obtida dividindo-se o número de AgNOR por 100 (Kravis et al., 1996).

Para a variável AgNOR utilizou-se estatística descritiva (média e desvio padrão). Para avaliar a diferença entre as médias de AgNOR nos três graus, utilizaram-se a análise da variância (teste F) e o teste de Tukey. Foi utilizado o pacote estatístico *SAS for Windows* versão 6.11 (User's..., 1997).

## RESULTADOS

Dezessete mastocitomas foram classificados como grau I (37,8%); 23 como grau II (51,1%) e 5 como grau III (11,1%). As características histológicas dos mastocitomas, distribuídas por grau, são apresentadas na Tab. 1. A presença de cápsula fibrosa incompleta foi detectada em poucos cortes, independentemente do grau histológico do tumor. A distribuição mais freqüente das células nos tumores de grau I foi do tipo misto (64,7%), enquanto nos de grau II foi do tipo difusa (65,3%). A distribuição menos comum, independentemente do grau, compreendeu ninhos e cordões (6,6%).

Nos três graus de mastocitomas foi mais freqüente a quantidade moderada de estroma (48,8%).

O tamanho das células neoplásicas foi predominantemente uniforme no grau I (94,1%). A anisocitose estava presente em 65,3% dos

mastocitomas de grau II e em 60% dos de grau III. Anisocitose associada a células multinucleadas foi detectada em 40% dos tumores de grau III. Células redondas ou ovais predominaram no grau I (94,1%); em todos os mastocitomas de grau III as células eram pleomórficas. O citoplasma era abundante em 58,8% dos tumores de grau I e moderado em 56,5% e 80% nos graus II e III, respectivamente. O citoplasma foi escasso em 39,2% nos tumores de grau II e em 20% nos de grau III.

O método azul de toluidina permitiu observar captação diferenciada do corante nas células neoplásicas de diferentes graus. Os grânulos das células dos tumores de grau I coraram metacromaticamente em 64,7% dos casos; os das células de grau II apresentaram metacromasia variada em 100% dos casos; os das células de grau III apresentaram somente discreta a moderada metacromasia. Houve diferença significativa na metacromasia das células entre as classificações discreta, moderada e acentuada ( $P<0,001$ ).

Nos tumores de grau I predominaram os núcleos redondos a ovais (64,7%). Nos tumores de grau II, foram observadas anisocariose (52,2%) e células redondas a ovais (47,8%), e nos de grau III, somente se observou anisocariose (100%). Os núcleos apresentaram aspecto vesicular predominantemente nos tumores de grau II e III, 65,2% e 80,0%, respectivamente. No grau I, predominaram os núcleos homogêneos basofílicos.

Na maioria das células dos tumores de grau I (64,7%), não foi possível a visualização de nucléolos. Nos tumores de grau II, só foi possível a visualização de um nucléolo (56,5%) por célula, e nos de grau III, 80% das células mostraram um ou mais nucléolos.

As regiões organizadoras nucleolares argiophilicas coraram-se, intranuclearmente, como pontos pretos ou marrom-escuros (Fig. 1). A média ( $\pm$  DP) de contagem de AgNOR em 100 células, nos tumores de grau I, foi de  $1,5\pm 0,19$ , nos tumores de grau II, foi de  $1,85\pm 0,9$ , e nos de grau III,  $3,25\pm 0,6$  (Fig. 2). A contagem geral de AgNOR variou de 1,2 a 4,3. A média geral ( $\pm$  DP) foi  $1,9\pm 0,7$ . Quando comparados pelo teste de Tukey, as médias de AgNOR dos graus I e II não foram significativamente diferentes ( $P>0,05$ ).

Tabela 1. Características histológicas de 45 mastocitomas cutâneos caninos classificados por grau

Achado histológico	Grau						Total	
	I		II		III		n	%
	n	%	n	%	n	%		
<b>Distribuição</b>								
Derme superficial	4	23,2	3	13,0	1	20,0	8	17,8
Derme profunda	8	47,0	7	30,5	1	20,0	16	35,5
Subcutâneo	2	11,8	2	8,7	1	20,0	5	11,2
Múltipla	3	17,7	11	47,8	2	40,0	16	35,5
<b>Padrão</b>								
Difuso	5	29,4	15	65,3	1	20	21	46,6
Cordões	0	0	1	4,3	1	20	2	4,4
Ninhos	1	5,9	0	0	0	0	1	2,2
Tapete	0	0	4	17,7	2	40	6	13,4
Misto	11	64,7	3	13	1	20	15	33,4
<b>Tamanho da célula</b>								
Uniforme	16	94,1	5	21,7	0	0	21	46,6
Anisocitose	1	5,9	15	65,3	3	60	19	42,3
Anisocitose + céls. multinucleadas	0	0	3	13	2	40	5	11,1
<b>Forma da célula</b>								
Redondo a oval	16	94,1	10	43,5	0	0	26	57,7
Pleomórfico	1	5,9	13	56,5	5	100	19	42,3
<b>Citoplasma</b>								
Abundante	10	58,8	1	4,3	0	0	11	24,5
Escasso	0	0	9	39,2	1	20	10	22,2
Moderado	7	41,2	13	56,5	4	80	24	53,3
<b>Núcleo</b>								
Uniforme	6	35,3	0	0	0	0	6	13,4
Anisocariose	0	0	12	52,2	5	100	17	37,4
Redondo a oval	11	64,7	11	47,8	0	0	22	48,8
Vesicular	2	11,8	15	65,2	4	80	21	46,7
Homogêneo basofílico	12	70,5	4	17,4	0	0	16	35,5
Cromatina condensada	3	17,7	4	17,4	1	20	8	17,8
Mitose	ausente	-	1/cma	-	4/cma	-	-	-
<b>Nucléolo</b>								
não visível	11	64,7	9	39,2	1	20	21	46,7
1	5	29,4	13	56,5	2	40	20	44,4
>1	1	5,9	1	4,3	2	40	4	8,9
<b>Estroma</b>								
Pouco	3	17,7	10	43,5	2	40	15	33,4
Moderado	8	47	11	47,8	3	60	22	48,8
Abundante	6	35,3	2	8,7	0	0	8	17,8
<b>Eosinófilos</b>								
Ausente	2	11,8	3	13	0	0	5	11,1
<50 CMA	7	41,2	9	39,2	2	40	18	40,1
>50 CMA	8	47	11	47,8	3	60	22	48,8
<b>Outras alterações*</b>								
Necrose (N)	3	-	10	-	2	-	15	-
Hemorragia (H)	0	-	5	-	1	-	6	-
Edema (E)	5	-	5	-	2	-	12	-
<b>Azul de Toluidina</b>								
+ (discreta metacromasia)	0	0	8	34,8	2	40	10	22,2
++ (moderada)	6	35,3	8	34,8	3	60	17	37,8
+++ (acentuada)	11	64,7	7	30,4	0	0	18	40,0

\* N, H, E ocorrem isoladas ou em conjunto. CMA = campo de maior aumento.

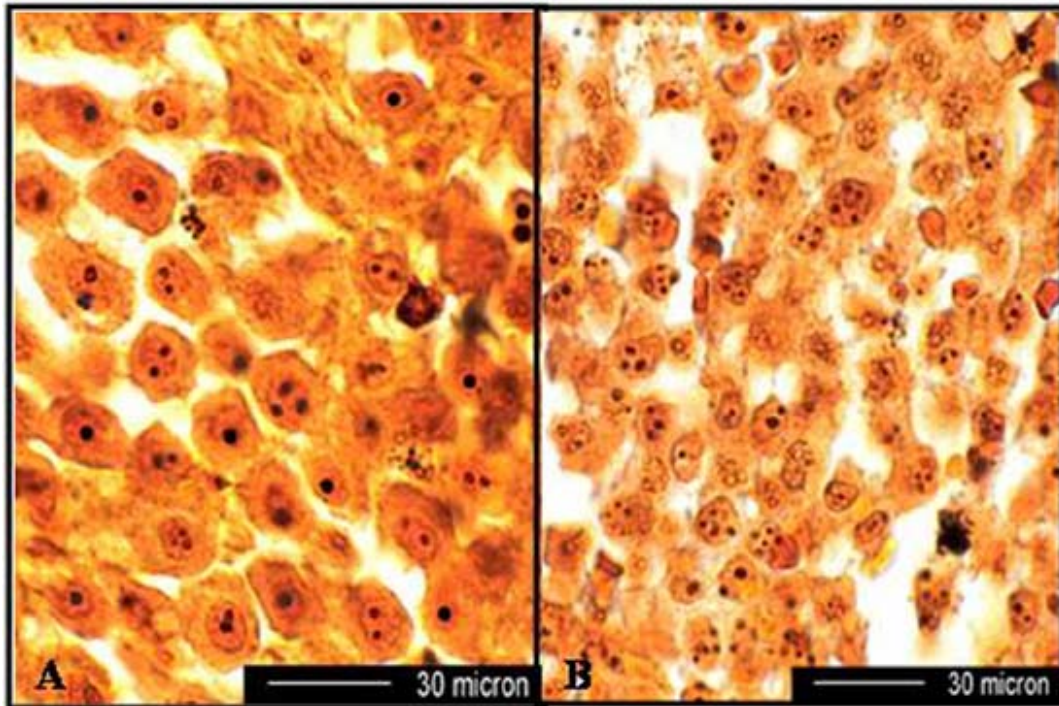


Figura 1. Mastocitoma cutâneo canino. Os pontos pretos representam as regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR). A. Mastocitoma de grau I (média AgNOR = 1,6). B. Mastocitoma de grau III (média AgNOR = 4,2). Barra = 30 $\mu$ m.

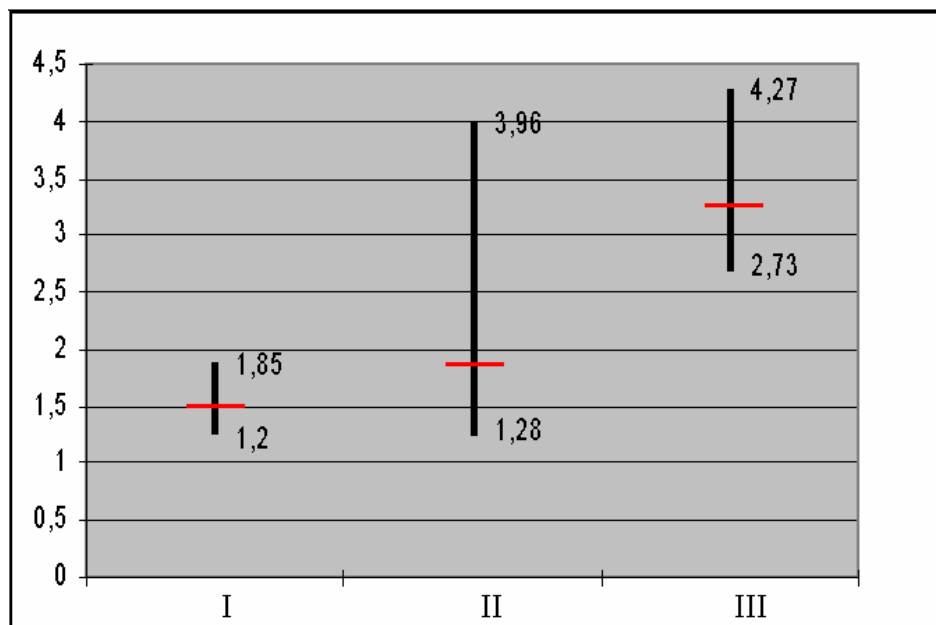


Figura 2. Associação entre o grau histológico e a frequência de AgNOR de 45 mastocitomas cutâneos em cães. As linhas horizontais (vermelhas) representam a média de AgNOR em cada grau.

A presença de figuras mitóticas não foi detectada nos tumores de grau I; foram detectadas uma e quatro mitoses/CMA (campo de maior aumento), respectivamente, nos tumores de grau II e III.

A presença de eosinófilos foi marcada em todos os graus (I: 47 %; II: 47,8% e III: 60%).

Outras alterações teciduais, como necrose, edema e hemorragia estavam relacionadas com as neoplasias. Essas alterações ocorreram em graus variados frequentemente associadas, sendo mais abundantes nos mastocitomas de grau II e III. Fibrose e infiltrado linfocitário também foram detectados nas lesões.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Tem sido relatada grande variação na porcentagem dos mastocitomas para cada um dos três graus histológicos (Vail, 1996). A porcentagem para cada grau foi similar à observada por Patnaik et al. (1984), que relataram 36% dos mastocitomas de grau I, 43% de grau II e 20% de grau III.

O grau histológico é um parâmetro importante para determinar o prognóstico e a escolha do tratamento pelo clínico (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Os achados histológicos deste trabalho (Tab. 1) foram característicos e similares aos de investigações anteriores (Patnaik et al., 1984; Simões et al., 1994). Nos mastocitomas de grau I, predominaram células uniformes, redondas a ovais, com citoplasma abundante, núcleo redondo a oval, aspecto homogêneo basofílico, nucléolo não-visível e ausência de figuras mitóticas. Nos mastocitomas de grau II, as células frequentemente apresentaram anisocitose, pleomorfismo ou uniformidade; com citoplasma moderado a escasso; núcleo com anisocariose ou redondo a oval, aspecto predominantemente vesicular com um nucléolo visível e uma figura mitótica/CMA. Nos mastocitomas de grau III, todas as células apresentaram anisocitose, anisocariose e pleomorfismo, por vezes associadas a células multinucleadas. Um ou mais nucléolos foram visíveis com média de quatro figuras mitóticas/CMA. Os mesmos critérios são usados atualmente com resultados semelhantes na distribuição dos graus (Goldschmidt e Hendrick, 2002).

Outras alterações, como necrose, hemorragia e edema foram mais abundantes em mastocitomas de grau III. Eosinófilos isolados ou agrupados estavam presentes em todos os graus dos mastocitomas diagnosticados (Tab. 1), mas é importante notar que estiveram presentes em 100% dos de grau III, enquanto estiveram ausentes em, respectivamente, 11,8% e 13% nos de graus I e II. Segundo Goldschmidt e Hendrick (2002), a presença de eosinófilos pode auxiliar no diagnóstico de mastocitomas pouco diferenciados, para evitar o diagnóstico de tumor de células redondas, sem especificação da célula de origem. A IL-5 (interleucina 5), produzida por mastócitos e pelos próprios eosinófilos tem, também, papel fundamental na atração dessas últimas células para o local da lesão (Lalani et al., 1999).

Nos mastocitomas, os eosinófilos contribuem para a formação do estroma e na angiogênese, como observado em tumores mamários em humanos (Chénier e Doré, 1998). Neste trabalho, os eosinófilos observados nos mastocitomas foram associados com necrose e hemorragia, confirmando a responsabilidade atribuída a eles pelos efeitos deletérios nos tecidos infiltrados (Lukacs, 2001). Em tumores cutâneos de cães, como histiocitomas, a P-selectina não está envolvida, e os eosinófilos não são relatados (Chénier e Doré, 1998).

Mastocitomas bem diferenciados são fáceis de diagnosticar em preparações histológicas de rotina (HE). Contudo, mastocitomas pouco diferenciados podem ser confundidos com outros tumores de células redondas (Yager e Wilcock, 1994). O método histoquímico azul de toluidina é importante, pois auxilia na confirmação do diagnóstico e, muitas vezes, permite diferenciar mastocitomas pouco diferenciados de outros tumores de células redondas. Nos mastocitomas, a interação dos corantes básicos com os grânulos citoplasmáticos tem relação positiva com o grau de diferenciação celular (Simões e Schoning, 1994). Isso ocorre porque há uma diminuição da sulfatação dos grânulos em mastócitos neoplásicos, tornando-os menos metacromáticos (Klatt et al., 1983). A captação diferenciada da metacromasia, nos três graus de mastocitomas, também foi observada neste estudo. Em mastocitomas bem diferenciados, predominou acentuada metacromasia, enquanto nos mastocitomas pouco diferenciados a

metacromasia foi menos evidente ou predominou a ortocromasia.

Apesar do sistema de graduação histológica seguir diversas características histológicas pré-definidas, muitas vezes a classificação é subjetiva, pois patologistas podem determinar diferentes graus para o mesmo tumor. Essa subjetividade é mais acentuada em mastocitomas de diferenciação intermediária (grau II). O prognóstico é mais difícil de prever, e as mortes relatadas nesses animais variam entre 20 e 50% (Bostock et al., 1989). É descrito que uma proporção dos mastocitomas de grau II possui comportamento biológico de mastocitomas de grau I e outros, de mastocitomas de grau III (Séguin et al., 2001). Nesses casos, deve-se levar em consideração o índice mitótico e a frequência de AgNOR que mede o índice de proliferação celular (Simoes et al., 1994). A frequência de AgNOR em biópsias e aspirados de agulha fina de mastocitomas é uma técnica que permite objetividade e, conseqüentemente, mais precisão no prognóstico (Kravis et al., 1996; Goldschmidt e Hendrick, 2002).

Bostock et al. (1989) descreveram, pela primeira vez, a técnica de AgNOR em mastocitomas caninos e relataram valores de 1,5, 3,2 e 6,3 para os mastocitomas de grau I, II e III, respectivamente. A média geral de AgNOR, nos mastocitomas pesquisados, foi de 1,9 (variação de 1,2 a 4,3), semelhante à média de 2,38 (variação de 1,22 a 4,13) em biópsias descrita por Kravis et al. (1996).

Nos mastocitomas de grau II, os valores de AgNOR oscilaram entre 1,28 e 3,96 e se sobrepuseram aos valores de AgNOR dos graus I e III (Fig. 2), pelo amplo comportamento biológico (Séguin et al., 2001). A baixa frequência de AgNOR, em relação à descrita por Bostock et al. (1989), pode ter ocorrido pelo fato de que os mastocitomas de grau III aqui analisados apresentaram menor número de figuras mitóticas (4/CMA), quando comparadas com o apresentado por Patnaik et al. (1984) e Meuten (2002), que mencionaram média de 3 a 6, e oito figuras mitóticas/CMA, respectivamente, para os mastocitomas de grau III.

Avaliação quantitativa de AgNOR, à semelhança do relatado em estudo sobre hiperplasia

tireoideana (Serakides et al., 1999), permitiu, mais do que o índice mitótico, a correlação entre grau histológico e prognóstico (Kravis et al., 1996), já que essa contagem revela o estágio do ciclo celular. Um aumento no número de AgNOR seria resultado de proliferação celular com aumento na transcrição e aumento do conteúdo celular de DNA (Serakides et al., 1999), o que ocorre em células que proliferam mais ativamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOSTOCK, D.E.; CROCKER, J.; HARRIS, K. et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. *Br. J. Cancer*, v.59, p.915-918, 1989.
- CHÉNIER, S.; DORÉ, M. P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet. Pathol.*, v.35, p.85-93, 1998.
- CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. (Eds.). *Cellular pathology technique*. 4.ed. London: Butterworths, 1985. 642 p.
- GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). *Tumors in domestic animals*. 4.ed. Ames: Iowa State, 2002. Cap.3, p.105-109.
- KLATT, E.C.; LUKES, R.J.; MEYER, P.R. Benign and malignant mast cell proliferations: diagnosis and separation using a pH-dependent toluidine blue stain in tissue section. *Cancer*, v.51, p.1119-1124, 1983.
- KRAVIS, L.D.; VAIL, D.M.; KISSEBERT, W.C. 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.
- LALANI, T.; SIMMONS, R.K.; AHMED, A.R. Biology of IL-5 in health and disease. *Ann. Allerg Asthma Immunol.*, v.82, p.317-333, 1999.
- LUKACS, N.W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature*, v.1, p.108-116, 2001.

- METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. *Physiol. Rev.*, v.77, p.1033-1079, 1997.
- MEUTEN, D.J. Appendix: Diagnostic schemes and algorithms. In: \_\_\_\_\_. *Tumors in domestic animals*. 4.ed. Ames: Iowa State, 2002. p.755-769.
- MILLER, D.M. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, p.360-363, 1995.
- PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MacEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.*, v.21, p.469-474, 1984.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P. 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.
- REGUERA, M.J.; RABANAL, R.M.; PUIGDEMONT, A. et al. Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am. J. Dermatol.*, v.22, p.49-54, 2000.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. (Eds.). *Dermatologia de pequenos animais*. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. Cap.19. p.926-1054.
- SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N.F.; BREGAZZI, V.S. et al. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.218, p.1120-1123, 2001.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; SANTOS, R.L. et al. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. *Vet. Pathol.*, v.36, p.574-582, 1999.
- SIMÕES, J.P.C.; SCHONING, P. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.6, p.458-465, 1994.
- SIMÕES, J.C.P.; SCHONING, P.; BUTINE, M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.*, v.31, p.637-647, 1994.
- TIZARD, I.R. (Ed). *Imunologia veterinária: uma introdução*. 5.ed. São Paulo: Roca, 1998. 545p.
- USER'S guide: on line doc. Version 8. Cary, NC: SAS Institute, 1997.
- VAIL, D.M. Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (Eds.). *Small animal clinical oncology*. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996. 589p. Cap.16, p.192-210.
- YAGER, J.A.; WILCOCK, B.P. *Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors*. London: Mosby-Year Book, 1994. 302p.
- ZAPPULLA, J.P.; AROCK, M.; MARS, L.T. et al. Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J. Neuroimmunol.*, v.131, p.5-20, 2002.
- ZEMKE, D.; YAMINI, B.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Vet. Pathol.*, v.39, p.529-535, 2002.