

Caracterización de las Regiones Organizadoras Nucleolares coloreadas con Plata (AgNORs) en tumores cutáneos caninos

Gloria E Giraldo¹, MV, MSc; Diego A Aranzazu¹, MV, Esp; Berardo de J Rodríguez¹, MV, Esp; Mónica M Pérez¹, MV; María C Ramírez¹, MV.

¹Grupo de Investigación en Patología Animal, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.
geg@epm.net.co*

(Recibido: 11 de marzo, 2002; aceptado: 2 abril, 2003)

Resumen

Se utiliza una técnica de coloración con plata para visualizar las Regiones Organizadoras Nucleolares (AgNORs). La evaluación cuantitativa y cualitativa de estas regiones representa en la actualidad un marcador de actividad proliferativa en células tumorales. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar las AgNORs en algunos tipos de tumores cutáneos caninos, para lo cual se evaluaron 28 mastocitomas, 18 carcinomas espinocelulares y siete epitelomas basocelulares, procedentes del archivo de Patología Animal y del Consultorio Veterinario de la Universidad de Antioquia, y de otros consultorios de la ciudad de Medellín, Colombia. Las muestras bloqueadas en parafina se cortaron a cuatro micras, y se colorearon con Hematoxilina-Eosina y Giemsa para diagnosticar y clasificar los mastocitomas. Se utilizó otra serie de cortes coloreados con plata para evaluar morfológicamente las AgNORs utilizando un Sistema Automático Analizador de Imágenes (SAAI). Se evaluaron los parámetros: área nuclear, área AgNORs/célula, número de AgNORs/célula, y distribución AgNORs en la célula. Para determinar el número de células a evaluar se utilizó el estudio de variación de la inestabilidad de los valores medios, con relación al tamaño de la muestra; se obtuvo un mínimo representativo de 20 células por caso para los mastocitomas y los carcinomas espinocelulares, y de 30 células por caso, para los tumores basocelulares. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) y se compararon las medias por el test de Fischer (F) empleando un nivel de significancia de $p < 0.05$. La coloración AgNORs fue factible en los tumores evaluados para lo cual se necesitaron de 30 minutos en el período de incubación. El análisis estadístico mostró que los mastocitomas grado II poseen un área nuclear menor estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Existe además, diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en el número y en el área de las AgNORs entre los tres grados histopatológicos de este tumor. La coloración de AgNORs reveló dos poblaciones celulares en los mastocitomas, que difieren con la clasificación gradativa utilizada en la actualidad.

Palabras clave: basocelular, espinocelular, marcador tumoral, mastocitoma, neoplasia.

Introducción

Los tumores de piel y el tejido subcutáneo son las neoplasias de mayor frecuencia en los animales domésticos. La proporción entre los tumores malignos y benignos en la piel es menor que para otras áreas

del organismo. Los tumores benignos más frecuentes son los papilomas y lipomas y el maligno de mayor frecuencia es el carcinoma espinocelular (22).

El mastocitoma es uno de los tumores de piel más frecuente en los caninos; se ha estimado que representa

el 6% de todos los tumores en esta especie (11) y el 13% de los tumores de la piel (16). El mastocitoma es un tumor originado a partir de células mastocíticas, las cuales son componentes normales del tejido conectivo que poseen gránulos citoplasmáticos ricos en heparina, histamina y factor quimiotáctico eosinófilo (15). Por la dificultad para diferenciar histopatológicamente la benignidad de la malignidad en este neoplasma se ha determinado un sistema de clasificación por grados de I a III, según el grado de diferenciación, siendo el tumor de menor grado el más diferenciado (15).

El carcinoma espinocelular es uno de los tumores más comunes entre las especies animales, siendo la especie canina la más afectada. Las razas Scottish Terrier, Pequinés, Poodle, Boxer y Bull Terriers, son las más predisuestas (18). Este tumor se origina a partir de las células escamosas de la epidermis, aunque puede invadir la dermis y tejido subcutáneo (22) (véase Figura 1).

El tumor basocelular se caracteriza porque las células tienen núcleo ovoide y un citoplasma relativamente pequeño. Ocasionalmente puede contener células esparcidas y con núcleo alargado. Los patrones histológicos incluyen: sólido, acintado, quístico y medusoide (18). La raza Cocker Spaniel tiene alta predisposición a desarrollar este tipo de tumor (13). Entre machos y hembras, los primeros sufren en mayor proporción el tumor (7).

Las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs) son definidas como secciones de cromosomas metafásicos, donde se localizan copias organizadas de genes rRNA, necesarias para la producción final de ribosomas (2). A través de la coloración con la plata una serie de proteínas ácidas asociadas a las NORs y correlacionadas directamente con actividad transicional y proliferativa de las células, se hacen evidentes al microscopio óptico como puntos oscuros distribuidos por el núcleo y nucléolo en muestras histológicas y citológicas (4). Las proteínas argirófilas incluyen: RNA polimerasa I, una proteína C23 (nucleolina) y la proteína B23 (3).

Las NORs coloreadas con la plata (AgNORs) representan un marcador histoquímico económico, sencillo y eficiente de la proliferación celular y de malignidad (4).

El propósito de esta investigación fue evaluar cualitativa y cuantitativamente las AgNORs en el mastocitoma, el carcinoma espinocelular y el tumor basocelular de la piel en los caninos y comparar estos

datos con los hallazgos histopatológicos obtenidos a través de la coloración de Hematoxilina-Eosina, con respecto a la diferenciación o atipia celular. Adicionalmente, establecer parámetros histoquímicos de benignidad y malignidad que permitan al patólogo establecer diagnósticos y pronósticos más precisos.

Materiales y métodos

Para este estudio se seleccionaron 28 mastocitomas, 18 carcinomas espinocelulares y siete tumores basocelulares de caninos, recopilados desde el año de 1984 hasta febrero de 2000, procedentes del archivo de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad de Antioquia, y de muestras frescas obtenidas en el Consultorio Veterinario de la misma Universidad y en otros consultorios de la ciudad de Medellín.

Coloración Hematoxilina-Eosina y Giemsa

Los bloques fueron cortados a cuatro micras de espesor y coloreados por el método de Hematoxilina y Eosina (12) para establecer su diagnóstico. El diagnóstico diferencial de los mastocitomas se realizó mediante la técnica de coloración Giemsa (12).

Coloración Argéntica

Los tumores fueron coloreados con plata mediante la técnica descrita por Ploton *et al* (17), y modificada por Aubele *et al* (1). Para estos tipos de tumores se estandarizaron algunos pasos de la coloración ya que de acuerdo con algunos autores (5), dichos pasos deben ser definidos para cada tipo de tumor. Con el objetivo de mejorar la fijación y la preservación de la morfología tisular, se utilizó un tiempo de 3 segundos en un microondas comercial (p.e. Samsung electronics, Korea) sin control de temperatura (9). Además para la incubación las placas fueron llevadas a baño maría (Indulab, Bogotá) que sirvió de cámara húmeda a una temperatura de 39°C.

Recuento y análisis morfométrico

En la determinación de la muestra mínima de las células para evaluar en el SAAI, definido así previamente en la página 1, se utilizó la técnica de estudio de variación de inestabilidad de valores medios con relación al tamaño de la muestra que los originó (6).

Los parámetros evaluados en la totalidad de las muestras coloreadas con la plata fueron: 1) número de AgNORs/célula (muestra mínima 20 células/placa (caso) en total distribuidas en cinco campos para los mastocitomas y carcinomas espinocelulares (14) y de 30 células/placa (caso) en cinco campos para el tumor basocelular), 2) área nuclear/célula 3) área AgNORs

total/célula. Estos análisis se realizaron usando el programa Image-Pro plus version 4.0, Media Cybernetics. Las imágenes se capturaron a través de un microscopio óptico Leica DMLB con objetivo de 100x con aceite de inmersión, conectado a una cámara Sony SCC-C374 color video y enviadas a la computadora (Real Tech computer Pentium II series).

El conteo y la medición de las áreas AgNORs se realizó en forma semiautomática, manipulando el histograma de color. La medición de las áreas nucleares fue totalmente manual, delimitando directamente los bordes o límites de los núcleos.

Análisis Cualitativo

El parámetro de distribución de AgNORs en las células se determinó así: D_1 = AgNOR en nucléolo, D_2 = AgNORs en núcleo y nucléolo y D_3 = AgNORs en núcleo. Estas observaciones fueron hechas a través del monitor del SAAI (véase Figura 2).

Análisis Estadístico

Análisis cuantitativo. Los resultados obtenidos en él (SAAI) de los tres tipos tumorales se sometieron inicialmente a un análisis estadístico de tipo descriptivo, en el que se utilizó la media como medida de tendencia central y como medida de dispersión la desviación estándar (SD). La comparación de los parámetros AgNORs para los mastocitomas se hizo mediante el ANOVA, para lo cual se tuvo en cuenta el nivel de significancia estadística con un $p < 0.05$, evaluado por el test de Fischer (F). Como los datos obtenidos no presentaron una distribución normal fue necesario realizar una transformación logarítmica, que permitiera la comparación de las medias mediante el ANOVA (21). El programa estadístico utilizado fue el Statgraphics version 3.1 plus.

Los resultados de los parámetros de distribución se llevaron a una valoración porcentual para su respectivo análisis (3).

Resultados

La coloración de Hematoxilina-Eosina (HE) permitió establecer el diagnóstico de los tumores analizados, estos fueron en total 28 mastocitomas, 18 carcinomas espinocelulares y siete tumores basocelulares de caninos (véase Tabla 1).

La coloración de Giemsa hizo posible clasificar los mastocitomas, encontrando: Diez tumores grado I, nueve grado II y nueve grado III (véanse Tabla 1 y Figura 3).

Parámetros cualitativos

Para todos los tipos tumorales, la coloración argéntica necesitó un tiempo total de incubación de 30 minutos, observándose las AgNORs como puntos negros bien definidos que contrastaron con el resto de la célula (véase Figura 4).

La distribución D_3 , en la que las AgNORs aparecen difundidas por todo el núcleo predominó en los carcinomas espinocelulares y basocelulares; en los mastocitomas se presentó un predominio D_2 con las AgNORs presentes en núcleo y nucléolo (véase Tabla 1).

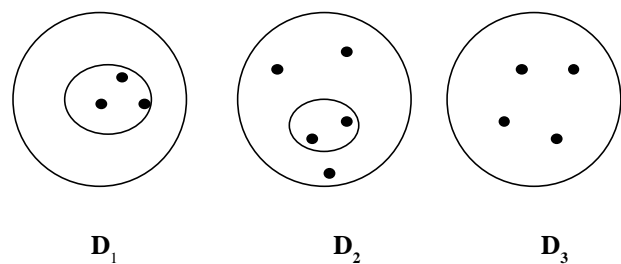


Figura 1. Distribución de las AgNORs en las células neoplásicas según localización nuclear y/o nucleolar.

Parámetros cuantitativos

Las mediciones cuantitativas (área nuclear, área y número de AgNORs) para las células de tumores cutáneos basocelular y espinocelular se presentan como datos no transformados (véase Tabla 2). Las comparaciones estadísticas entre los grados histopatológicos de los mastocitomas se llevaron a cabo luego de la transformación logarítmica (véase Tabla 3).

Tabla 1. Distribución de AgNORs en tumores cutáneos caninos

Tipo de tumor	Número casos	Total células	Distribución %		
			1	2	3
Mastocitomas					
Grado I	10	200	32.50	44.00	23.50
Grado II	9	180	26.67	51.67	21.67
Grado III	9	180	16.11	56.67	27.22
C.E.C.	18	360	5.51	28.65	65.84
T. Basocelular	7	210	9.05	35.24	55.71

C.E.C.: Carcinoma Espinocelular

Los mastocitomas grado II poseen una área nuclear menor estadísticamente significativa ($p < 0.05$), cuando se comparan con los mastocitomas grado I y III.

(véase Tabla 3). La transformación logarítmica de los datos correspondientes al área nuclear mostró dos poblaciones celulares al momento de utilizar el histograma de frecuencia (véase Figura 5). Los tres grados histológicos de mastocitomas se diferencian estadísticamente ($p < 0.05$) en el área y el número de AgNORs/célula (véase Tabla 3).

Tabla 2. Parámetros nucleares y de AgNORs para tumores cutáneos caninos (Datos no transformados)

Tipo de tumor	Área nuclear (um ²)		Área AgNORs (um ²)		Número AgNORs	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Mastocitomas ^a	36.57	76.07	2.36	5.56	3.23	2.01
Grado I	44.78	78.49	2.20	4.84	2.82	1.86
Grado II	11.08	3.91	1.30	0.71	3.18	1.78
Grado III	52.94	101.05	3.88	8.11	3.75	2.28
C.E.C.	14.60	6.02	1.46	1.07	3.95	2.01
Tumor Basocelular	12.91	3.62	1.00	0.55	3.76	1.75

^aIncluye los tres tipos tumorales

C.E.C.: Carcinoma Espinocelular

SD: Desviación estándar

Discusión

La totalidad de las muestras analizadas colorearon adecuadamente de acuerdo con el protocolo determinado para este estudio, teniendo en cuenta que se hicieron ajustes al protocolo general descrito por Ploton *et al* (17).

El tiempo de incubación óptimo para identificar las AgNORs en todos los tumores del presente estudio fue de 30 minutos; tiempo que se determinó luego de analizar en qué momento se visualizaban las AgNORs como puntos individuales y oscuros; iguales resultados fueron reportados por Derenzini y Ploton (4), que consideran necesario 30 minutos como tiempo de incubación para obtener una coloración satisfactoria. Sin embargo para Queiroz (19), y Aubele *et al* (1) un tiempo de 15 minutos es suficiente para colorear las AgNORs.

En el procesamiento de las muestras no se presentó ningún problema con la coloración al utilizar tejidos archivados desde 1984 y muestras frescas de 2000, lo que confirma lo reportado por otros autores (2,5,10), quienes resaltan la viabilidad de la coloración AgNORs al ser utilizada en material de archivo.

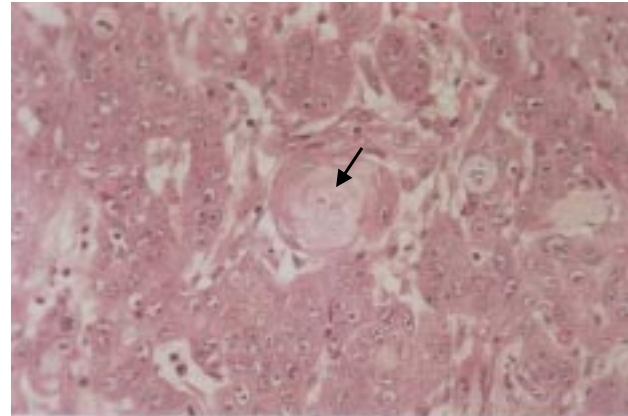


Figura 2. Carcinoma espinocelular bien diferenciado. Obsérvese el inicio de una formación de un centro de queratina (flecha). H-E, 400X.

La prueba de variación de inestabilidad de valores medios para este trabajo, estimó como apropiado el conteo de 20 a 30 células según el tipo de tumor. Varios autores reportan un conteo de 20 a 200 células, y aunque la mayoría de ellos utilizan 100, este número es inútil según Simoes *et al* (20). Para estos autores la evaluación de 100 y 200 células está altamente correlacionadas ($r = 0.96$), lo que indica una baja variación entre las observaciones (20). Los métodos estadísticos demuestran que en el número establecido de células a contar, las mediciones alcanzan su estabilidad estadística, por lo cual no se justifica realizar un número mayor de mediciones, ya que el dato obtenido no se va a modificar.

Tabla 3. Parámetros nucleares y de AgNORs para mastocitomas (Datos transformados a logaritmo)

Tipo de tumor	Área nuclear (um ²)		Área AgNORs (um ²)		Número AgNORs	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Mastocitomas ^a	2.7	1.03	-0.09	1.11	3.23	2.01
Grado I	2.85	1.18	-0.08	1.10	2.82	1.86
Grado II	2.34	0.33	0.23	0.78	3.18	1.78
Grado III	2.90	1.22	0.20	1.33	3.75	2.28

^aIncluye los tres tipos tumorales

SD: Desviación estándar

En los tres grados tumorales de los mastocitomas la mayor distribución de las AgNORs se encontró en el núcleo y el nucléolo (D₂), de los cuáles el grado III obtuvo el porcentaje más alto, correspondiente al mastocitoma de mayor indiferenciación celular según el sistema de grados definido por Patnaik *et al*, citado por O'keefe (15). Lo que está de acuerdo con lo

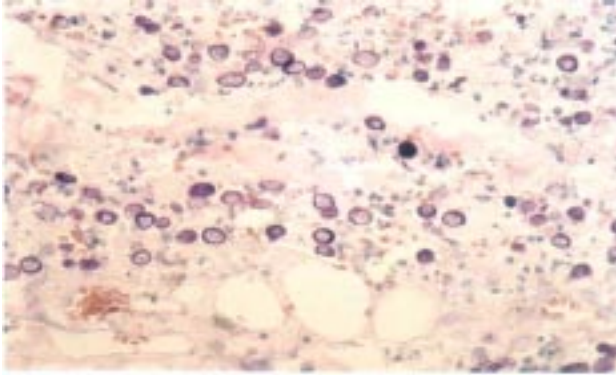


Figura 3. Mastocitoma canino grado I. Giemsa 400X.

reportado por Derenzini y Treré (5) quienes observaron que algunos tumores malignos tenían mayor cantidad de AgNORs distribuidos en el núcleo y el nucléolo.

El tumor basocelular y el carcinoma espinocelular obtuvieron una distribución D_3 , que corresponde a las AgNORs presentes en el núcleo. De acuerdo con Crocker (1992) existe una importante relación entre el grado de malignidad y el grado de dispersión de las AgNORs en la célula, y sugiere que la ubicación de éstas sólo en el núcleo es común en células altamente malignas.

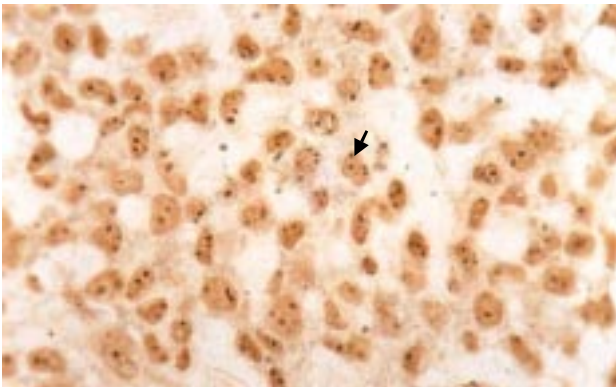


Figura 4. Mastocitoma canino grado I. Las AgNORs aparecen dispersas en el núcleo como puntos oscuros bien definidos e individuales (flecha). Coloración de AgNORs, 1000X.

Los mastocitomas grado II, presentan tanto una área nuclear como área AgNORs/célula menor que los grados I y III. El ANOVA mostró diferencia estadística significativa con relación al área y número de AgNORs para los tres grados; sin embargo los grados I y III mantienen una relación proporcional entre área nuclear y área AgNORs. Además de que ambos grados presentan diferencia estadística significativa con el grado II, la diferencia numérica de las

mediciones es muy evidente. Lo anterior, podría explicar las dos poblaciones celulares que aparecen en el histograma de frecuencia para el área nuclear (véase Figura 5), donde de acuerdo con los hallazgos obtenidos a través de la coloración de AgNORs, los mastocitomas grado I y III corresponden a un mismo grupo neoplásico, mientras que los grados II representan un grupo independiente. La clasificación gradativa de los mastocitomas según su diferenciación mediante la coloración Giemsa presenta dificultades debido a que las células neoplásicas exhiben características de los diversos grados tumorales en forma simultánea (18). La coloración AgNORs, se presenta en este trabajo como una nueva propuesta para ayudar al patólogo a definir claramente el pronóstico de este tumor; especialmente si se piensa que el aumento en el área nuclear está relacionado directamente con una mayor síntesis de RNA ribosomal para mantener la demanda proteica del tumor. Esta relación se hace evidente con la evaluación de las AgNORs (2,5,17).

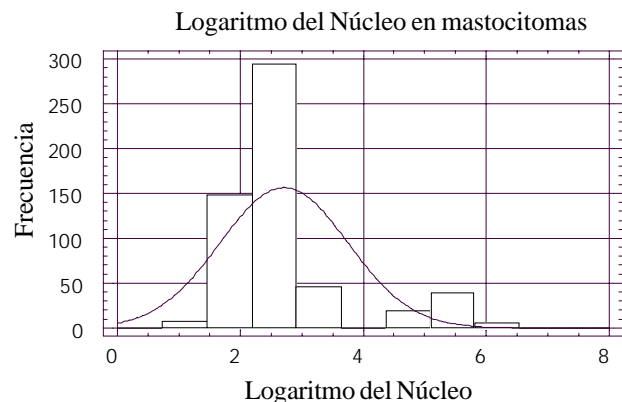


Figura 5. Histograma de frecuencia de Distribución del área nuclear transformada estadísticamente en mastocitomas caninos.

En esta investigación el número de AgNORs por célula para los mastocitomas en general fue de 3.23, presentándose un número mayor 3.75 en los tumores grado III. De acuerdo con Simoes *et al* (20), quienes relacionaron el número de AgNORs en los mastocitomas caninos con el pronóstico clínico del tumor, un número menor a 2.25 AgNORs por célula significa un período mayor de supervivencia, aunque los autores no establecieron este parámetro para cada grado tumoral.

De acuerdo con el Committee on AgNORs quantification de European Society of Pathology (1) se considera que el parámetro área total de AgNORs

por célula es el más importante en el momento de utilizar la técnica AgNORs para definir un pronóstico.

La media del área encontrada para los carcinomas espinocelulares en este estudio fue de $1.46 \mu\text{m}^2$, correspondiente al promedio de los reportados por Hirsch *et al* (8), donde la media del área AgNORs estuvo entre 1 y $3 \mu\text{m}^2$, quienes encontraron que las AgNORs en células de tejido maligno son poco uniformes en tamaño y forma. El número de AgNORs por célula en esta investigación fue de 3.95; autores como Crocker *et al* (3), encontraron de 1.7 a 4.0 dependiendo del grado de diferenciación.

La media del número de AgNORs por célula encontrada en los tumores basocelulares de este estudio fue de 3.76 que es comparativamente mayor a la hallada por Queiroz (19), donde se observó una media de 2.63, el autor también reporta un tamaño relativamente uniforme, de las AgNORs, formando uno, dos o tres nucléolos. Es de anotar que la cuantificación de las AgNORs en el presente trabajo

se llevó a cabo en el SAAI, mientras que las observaciones realizadas por Queiroz (19) fueron utilizando microscopio óptico. El programa Image-Pro plus version 4.0, Media Cybernetics, utilizado en este trabajo facilitó la manipulación de las imágenes lo cual en su momento permitió la separación de los puntos en forma individual lo que a su vez favoreció un conteo más preciso.

En el presente trabajo no fue posible confrontar estadísticamente los parámetros AgNORs de los tumores espinocelulares de acuerdo con su grado de diferenciación y los epitelomas basocelulares de acuerdo con su clasificación morfológica, por que el tamaño muestral en ambos casos no lo permitió.

Esta investigación demostró que la coloración AgNORs es una técnica útil en la evaluación de la actividad proliferativa de algunos tumores cutáneos caninos. La coloración permite además establecer una clasificación de los mastocitomas diferente a la actualmente utilizada, lo que a su vez establece pautas para nuevas investigaciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y personas quienes ayudaron a la realización de esta investigación: Comité para el desarrollo y la investigación (Codi) de la Universidad de Antioquia; Ofelia Tobón, Lida C. Alvarez, Anderson Garzón, Gustavo García, Angel Giraldo, Guillermo Correa.

Summary

Nucleolar organized regions in canine cutaneous tumors

A silver stain technique is used to identify the Nucleolar Organizer Regions (AgNORs). Nowadays, the quantitative and qualitative evaluation of these regions is a marker to the proliferative activity in tumor cells. The purpose of this study was to characterize AgNORs in some kind of canine skin tumors. There were evaluated 28 mast cell tumors, 18 squamous cell tumors and seven basal cell tumors from the animal pathology archive and from the veterinarian clinic of the University of Antioquia as well as other local clinic in the city of Medellín, Colombia. The samples were embedded in paraffin and cutted to four microns and stained with Hematoxylin-Eosin to check the diagnostic and Giemsa stained to classify the mast cell tumors. To evaluate morphometrically the AgNORs in the automatic image analyzer (AIA) other series of these samples were stained with silver nitrate. The following parameters were evaluated: nuclear area, AgNORs area/cell, AgNORs number/cell, and AgNORs distribution in the cell. The study of the variation from the instability of the average values was used in direct relation with sample size in order to determinate the number of cells to be evaluated; yielding a total of 20 cells in each case for the mast cell tumors and for the squamous cell tumors, moreover a total of 30 cells in each case for the basal cell tumors. The data was statistically analyzed using the variance analysis and by comparing the medians by the Fischer (F) test, revealing significant level of $p < 0.05$ value. The AgNORs stain is viable in the evaluated tumors for what 30 minutes were needed for the incubation period. The statistical significant analysis ($p < 0.05$) shows that the grade II mast cell tumors have a smaller nuclear area. Furthermore it shows significant difference ($p > 0.05$) in the number and the area of the AgNORs between the three histopathological levels of this tumor. The stained AgNORs revealed two cellular layers in the mast cell tumors that differ from the grade classification that is used today.

Key words: *basal cell tumor, mast cell tumor, neoplasia, squamous cell carcinoma, tumoral marker.*

Referencias

1. Aubele M, Biesterfel S, Derenzini M, *et al.* Guidelines of AgNOR quantitation. *Zentra Für Pathol* 1994; 140:107-108.
2. Crocker J. Nucleolar organizer regions and fibrillar centres In: Herrington cs, JO'D. (ed) *Diagnostic molecular pathology: a practical approach* oxford. Irl Press. Oxford university Press. 1992; 1:221-238.
3. Crocker J. Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158:185-188.
4. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Revi Interna Experim Pathol* 1991; 32:149-192.
5. Derenzini M, Threré D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J Pathol* 1991; 165:337-342.
6. Giraldo MGE. Regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata (AgNORs) em linfossarcoma de bovinos adultos. *Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais*, 1998. 108p.
7. Head KW. *Skin Diseases: Neoplastic diseases.* *Vet. Rec.* 1953; 65:926-929.
8. Hirsch SM, *et al.* Nucleolar Organizer Regions in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1992; 102:39-44.
9. Jackson P, Lanani EN and Boutsen J. Microwave-Stimulated immunogold silver staining. *Histoc J* 1988; 20:353-358.
10. Linder LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions(AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41:439-445.
11. Lombard LS, Molony JB and Rickard CG. Transmissible canine mastocytoma. *Ann NY Acad Sci* 1963; 108:1086-1105.
12. Luna LG. *Manual of histologic staining method of The Armed Forces Institute of Pathology.* 3rd, New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
13. Nielsen SW, and Cole CR. Cutaneous epithelial neoplasms of the dog. A report of 153 cases. *Amer J Vet Res* 1960; 21:931-948.
14. Nyska A, Zusman I, Klein T, *et al.* Assessment of the nucleolar organizer regions by automated image analysis in benign and malignant colonic tumours and adjacent tissues in rats. *J comp Pathol* 1995; 113:45-50.
15. O'keefe DA. Canine mast cell tumors. *Vet Clin N Am Sm Anim Pract* 1990; 20:1105-1115.
16. Orkin M, and Schwartzman RM. A comparative study of canine and human dermatology. II cutaneous tumors: The mast cell and canine mastocytoma. *J invest Derm* 1959; 32:451-466.
17. 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* 1986; 18:5-14.
18. Pulley LT, and Stannard AA. Tumors of the skin and soft tissues. In Moulton JW. *Tumors in domestic animals*, 3 ed, California, University of California Press, 1990; 23-82.
19. Queiroz PdeR. *Caracterização Das Regiões Organizadoras de nucléolo em tumor de células basais, carcinoma de células escamosas e histiocitoma de cães utilizando impregnação pela prata (coloração de AgNOR).* *Dissertação (Mestrado) universidade Federal de Minas Gerais*, 1996. 55p.
20. Simoes JPC, Schoning P, Butine M. Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of the three methods. *Vet Pathol* 1994; 31:637-647.
21. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods* 8ed, Iowa: Iowa State University Press/Ames, 1989; 282-296.
22. Theilen GW, Madewell BR. *Veterinary cancer medicine* 2 de Philadelphia: Lea & Febiger 1979. 436p.