



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

Gustavo Bonetto

Definição do *status* de margem cirúrgica em mastocitoma cutâneo canino por meio de citologia por *imprint*, avaliação de fragmentos por congelamento e exame histopatológico convencional

Curitibanos, Santa Catarina
2025

Gustavo Bonetto

Definição do *status* de margem Cirúrgica em mastocitoma cutâneo canino por meio de citologia por *imprint*, avaliação de fragmentos por congelamento e exame histopatológico convencional

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Terapias Convencionais, Integrativas e Inovadoras.

Orientador: Prof. Rogério Luizari Guedes, Dr.
Coorientador: Prof. Adriano Tony Ramos, Dr.

Curitibanos, Santa Catarina

2025

Bonetto, Gustavo

Definição do status de margem Cirúrgica em mastocitoma cutâneo canino por meio de citologia por imprint, avaliação de fragmentos por congelamento e exame histopatológico convencional / Gustavo Bonetto ; orientador, Rogério Luizari Guedes, coorientador, Adriano Tony Ramos, 2025.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa, Curitibanos, 2025.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2. oncologia veterinária. 3. diagnóstico intraoperatório. 4. tumor de células redondas. I. Guedes, Rogério Luizari. II. Ramos, Adriano Tony. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. IV. Título.

Gustavo Bonetto

Definição do *status* de margem Cirúrgica em mastocitoma cutâneo canino por meio de citologia por *imprint*, avaliação de fragmentos por congelamento e exame histopatológico convencional

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 01/08/2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Joice Lara Maia Faria, Dra.

Instituição: Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia

Prof. Conrado de Oliveira Gamba, Dr.

Instituição: Laboratório Vertá – Passo Fundo/RS

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Mestre em Terapias convencionais, integrativas e inovadoras

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Rogério Luizari Guedes, Dr.

Orientador

Curitibanos, 2025

Dedico este trabalho ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os novos amigos que encontrei pelo caminho e aos que já estavam aqui quando o mestrado começou. Aos alunos e profissionais da UFSC que trabalharam junto comigo, mesmo diante de todas as adversidades, para execução dessa dissertação. Em especial ao Prof. Adriano, Ronaldo, Felipe Soldado, Maria Laura, Profa. Vanessa e ao meu orientador, Prof. Rogério. Aos meus familiares, que me apoiam sempre.

RESUMO

Este estudo avaliou o desempenho de técnicas rápidas, citologia por *imprint* e histopatologia por congelamento, na definição do *status* de margens cirúrgicas em mastocitoma cutâneo canino, utilizando como referência a histopatologia convencional. Foram aplicadas duas colorações: hematoxilina e eosina/Panótico Rápido (PR) e azul de toluidina (AT), analisando-se sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia e regressão logística. Na análise consolidada, a associação de congelamento com azul de toluidina (AT_B) apresentou desempenho máximo, com 100% de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia. Na citologia por *imprint*, tanto com azul de toluidina (AT_B *imprint*) quanto com panótico rápido (PR_B *imprint*), a sensibilidade foi de 100% e o VPN de 100%, mas com especificidade reduzida (14,29%). Na avaliação individualizada, o congelamento com azul de toluidina (AT_A) manteve sensibilidade elevada (93,02%) e acurácia superior (73,33%) em comparação ao panótico rápido. Embora realizado em ambiente laboratorial controlado e com número amostral reduzido, o estudo sugere que o uso combinado de técnicas rápidas, especialmente a histopatologia por congelamento, associado à coloração por azul de toluidina, pode representar uma estratégia promissora para a avaliação transoperatória de margens em mastocitoma canino. Estudos futuros, com casuística ampliada e aplicação em tempo real, são necessários para validar a eficácia e a aplicabilidade clínica dessas abordagens.

Palavras-chave: Oncologia veterinária; diagnóstico intraoperatório; tumor de células redondas.

ABSTRACT

This study evaluated the performance of rapid diagnostic techniques, imprint cytology and frozen section histopathology aiming to define surgical margin status in canine cutaneous mast cell tumors, using conventional histopathology technique as reference. As well as two staining methods: hematoxylin and eosin/Panoptic Rapid (PR) and toluidine blue (AT), through sensitivity, specificity, predictive values, accuracy and logistic regression analyses. As result, the combination of frozen section with toluidine blue (AT_B) achieved maximum performance, with 100% sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy. For imprint cytology, both toluidine blue (AT_B imprint) and Panoptic Rapid (PR_B imprint) reached 100% sensitivity and 100% negative predictive value, but with reduced specificity (14.29%). In individualized analysis, frozen section with toluidine blue (AT_A) kept high sensitivity (93.02%) and high accuracy (73.33%) compared to Panoptic Rapid. Despite being conducted in a controlled laboratory environment with a limited sample size, this study suggests that the use of rapid diagnostic techniques, particularly frozen section histopathology, combined with toluidine blue staining, may represent a promising strategy for intraoperative margin assessment in canine mast cell tumors. Further studies with larger sample sizes and real-time intraoperative application are needed to validate the clinical applicability of these methods.

Keywords: Veterinary oncology; intraoperative diagnosis; round cell neoplasm.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Procedimentos realizados no processamento de amostras. A: mensuração da nodulação. B: demarcação de margens macroscópicas com caneta permanente. Linha vermelha: base da nodulação. Linha azul: margens macroscópicas de 2cm a 3cm. C: identificação de margens com pontos de sutura. D: Identificação de margens cirúrgicas com tinta nanquim..... 28
- Figura 2: Procedimentos realizados no processamento de amostras. A: confecção de lâmina de citologia por técnica de compressão direta (*imprint*). B: Clivagem de margens laterais para avaliação de fragmentos por congelamento..... 29
- Figura 3: Procedimentos realizados no processamento de amostras transcirúrgicas. Congelamento de fragmento tecidual com nitrogênio líquido 30
- Figura 4: Procedimentos realizados no processamento de amostras. Confecção de lâminas por congelamento. 32
- Figura 5: Avaliação microscópica de lâmina histológica transcirúrgica por congelamento com lente objetiva de 40x. Coloração Azul de Toluidina. Seta vermelha indica mastócitos infiltrados em margem. O "X" branco indica delimitação de margem por tinta de nanquim..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número total de lâminas confeccionadas por nódulo considerando a técnica de processamento e a coloração utilizada.....	36
Tabela 2: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV) e acurácia das técnicas avaliadas para definição de margens cirúrgicas em mastocitomas cutâneos caninos.	36
Tabela 3: Regressão logística para as técnicas PR.	38
Tabela 4: Regressão logística para as técnicas AT.....	38
Tabela 5: Análises descritivas adicionais (tamanho e grau histológico).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Azul de Toluidina
AT_A	Azul de Toluidina - Avaliação individual de cada margem cirúrgica lateral
AT B	Azul de Toluidina - Abordagem composta (todas as margens avaliadas em conjunto)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CR	Coloração de Romanowsky
HE	Hematoxilina e Eosina
PR	Panótico Rápido
PR_A	Panótico Rápido - Avaliação individual de cada margem cirúrgica lateral
PR_B	Panótico Rápido - Abordagem composta (qualquer margem positiva)
HPF	Campo de Maior Aumento (High Power Field)
KIT	Proto-oncogene c-KIT (Receptor de Tirosina Quinase)
Ki-67	Antígeno nuclear de proliferação celular
LABOPAVE	Laboratório de Patologia Veterinária
LAClin	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
MCT	Mastocitoma Cutâneo
NPV	Negative Predictive Value (Valor preditivo negativo)
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PR	Panótico Rápido
PPV	Positive Predictive Value (Valor preditivo positivo)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	HIPÓTESE	14
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivo Geral	14
1.2.2	Objetivos Específicos	14
1.3	JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ONCOLOGIA VETERINÁRIA E NEOPLASIAS CUTÂNEAS	16
2.2	MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO	17
2.3	CIRURGIA ONCOLÓGICA E MARGENS CIRÚRGICAS	19
2.4	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS E MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DEFINIÇÃO DO <i>STATUS</i> DE MARGEM	21
2.4.1	Histopatologia convencional: fixação em formalina 10% e conservação em bloco de parafina	21
2.4.2	Histopatologia transoperatória por congelamento	22
2.4.3	Avaliação citopatológica transoperatória	22
2.4.4	Colorações para citologia e histologia	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	SELEÇÃO DE ANIMAIS.....	25
3.2	PLANEJAMENTO CIRÚRGICO E COLETA DE AMOSTRAS	26
3.3	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	30
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5	CONCLUSÃO	41

1 INTRODUÇÃO

O avanço da medicina veterinária nas últimas décadas tem promovido melhorias significativas no diagnóstico e no tratamento de diferentes enfermidades, incluindo as neoplasias (Withrow; Vail; Page, 2013). Entre os tumores cutâneos mais prevalentes em cães, destaca-se o mastocitoma cutâneo (MCT), cuja apresentação clínica e comportamento biológico são bastante variáveis, representando um desafio tanto diagnóstico quanto terapêutico (Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022).

A excisão cirúrgica com margens adequadas continua sendo a principal estratégia terapêutica, com potencial curativo para grande parte dos pacientes (Oliveira et al., 2020). Entretanto, a definição intraoperatória do status dessas margens ainda representa um obstáculo na rotina oncológica veterinária (Foster et al., 2020).

Na medicina humana, técnicas de avaliação transoperatória, como a citologia por imprint e a histopatologia por congelamento, são amplamente utilizadas para orientar decisões cirúrgicas em tempo real. Essas metodologias permitem identificar a presença de células tumorais nas bordas da ressecção e, quando necessário, indicar a ampliação imediata das margens. Esse processo aumenta as chances de obtenção de margens livres e reduz o risco de recidiva local, com impacto direto no controle da doença (Jaafar, 2006; Tamanuki et al., 2021).

Na medicina veterinária, contudo, tais estratégias ainda são pouco exploradas e carecem de validação científica, sobretudo em neoplasias de células redondas como o MCT. Estudos pioneiros, como o de Whitehair et al. (1993), demonstraram a aplicabilidade da histopatologia por congelamento em cães, enquanto Milovancev et al. (2016) avaliaram a citologia por imprint em mastocitomas e sarcomas cutâneos. Ambos relataram variação considerável na acurácia diagnóstica, reforçando a necessidade de padronização e de novos estudos com delineamento robusto.

Além das limitações técnicas, como a formação de artefatos durante o congelamento, a menor definição morfológica e o tempo restrito para análise, há também a dificuldade de diferenciar mastócitos neoplásicos de mastócitos inflamatórios ou residentes da derme. Essa semelhança pode comprometer a acurácia da avaliação rápida de margens (Sridharan; Shankar, 2012; Foster et al., 2020). Nesse cenário, a padronização de critérios diagnósticos intraoperatórios é essencial para reduzir a variabilidade entre observadores e proporcionar maior segurança na tomada

de decisão cirúrgica, beneficiando diretamente o prognóstico dos pacientes (Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022).

1.1 HIPÓTESE

Considerando que o presente estudo avaliou diferentes combinações de técnicas diagnósticas rápidas, citologia por *imprint* e histopatologia por congelamento, associadas a duas colorações (panótico rápido e azul de toluidina), foi formulada a seguinte hipótese:

H_0 (hipótese nula): Nenhuma das técnicas rápidas avaliadas, independentemente da coloração utilizada, apresenta desempenho diagnóstico semelhante ao da histopatologia convencional na avaliação de margens cirúrgicas em cães com mastocitoma cutâneo.

H_1 (hipótese alternativa): Ao menos uma das técnicas rápidas avaliadas apresenta desempenho diagnóstico semelhante ao da histopatologia convencional na avaliação de margens cirúrgicas em cães com mastocitoma cutâneo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar a eficiência das técnicas transoperatórias de citologia por *imprint* e análise histopatológica de fragmentos por congelamento perante à técnica de histopatologia convencional na avaliação de margens cirúrgicas de pacientes caninos acometidos por mastocitoma cutâneo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da técnica de citologia por *imprint* na avaliação de margens cirúrgicas de mastocitoma cutâneo, em comparação com a histopatologia convencional.

- b) Avaliar a sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN da técnica de histopatologia por congelamento na avaliação de margens cirúrgicas de mastocitoma cutâneo, em comparação com a histopatologia convencional.
- c) Avaliar o desempenho diagnóstico das colorações de hematoxilina e eosina/panótico rápido e azul de toluidina aplicadas às diferentes técnicas, identificando sua influência na sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos métodos testados.

1.3 JUSTIFICATIVA

O mastocitoma cutâneo (MCT) é a neoplasia maligna de pele mais comum em cães. A cirurgia é a principal modalidade terapêutica e pode ter caráter curativo (De Nardiet al., 2022; Oliveira et al., 2020). Nesse cenário, a avaliação das margens cirúrgicas é fundamental, pois margens livres estão associadas a menor risco de recidiva local e melhor prognóstico (Ozaki et al., 2007; Horta et al., 2018).

A definição intraoperatória do status das margens representa um desafio na rotina oncológica veterinária. Técnicas rápidas de avaliação, como a histopatologia por congelação e a citologia por imprint, podem oferecer informações imediatas ao cirurgião, orientando a ampliação das margens quando necessário e aumentando as chances de controle local da doença (Jaafar, 2006; Tamanuki et al., 2021).

Apesar do grande número de publicações sobre o MCT, sua abordagem diagnóstica e terapêutica continua desafiadora. A ampla variabilidade de apresentação clínica e o comportamento biológico heterogêneo dificultam a previsibilidade da evolução da doença (Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022). Isso torna ainda mais relevante a padronização de métodos rápidos que auxiliem na avaliação das margens cirúrgicas.

Na medicina humana, a histopatologia por congelação já é consolidada. Estudos em carcinomas cutâneos mostraram acurácia de 97,7% quando comparada ao exame convencional em parafina (Castley et al., 2013). Outro trabalho demonstrou que, em 29% dos casos de neoplasias cutâneas não melanocíticas, a ressecção completa foi obtida apenas graças ao uso da técnica no transoperatório (Nimazoglu et al., 2016). A citologia por imprint também é utilizada para avaliação de linfonodos em câncer de mama, com sensibilidade próxima a 85% (Pétursson et al., 2018). Esses resultados comprovam o impacto clínico das técnicas rápidas no sucesso terapêutico.

Na medicina veterinária, entretanto, os estudos ainda são limitados. Whitehair et al. (1993) relataram a utilização da congelação em cães, enquanto Milovancev et al. (2016) avaliaram a citologia por imprint em mastocitomas e sarcomas cutâneos. Ambos confirmaram a viabilidade dos métodos, mas também evidenciaram variação importante na acurácia. Esses achados reforçam a necessidade de novas pesquisas que validem e padronizem métodos rápidos para uso intraoperatório em oncologia veterinária, especialmente em tumores de células redondas como o mastocitoma cutâneo

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ONCOLOGIA VETERINÁRIA E NEOPLASIAS CUTÂNEAS

O número de cães em residências no Brasil tem crescido de forma significativa nos últimos anos. De acordo com um estudo divulgado pelo instituto Datafolha em novembro de 2023, 61% da população brasileira, com mais de 16 anos, possui pelo menos um animal de estimação, o que equivale a mais de 30 milhões de lares com um pet. Dentre esses animais, 48% são cães.

O aumento da população canina, associado a aumento da expectativa de vida dos animais, resulta em uma maior frequência no diagnóstico de diversas enfermidades, incluindo doenças oncológicas (Rafalko et al., 2023). Um estudo que avaliou as principais causas de morte em uma população de mais de 70.000 cães, identificou enfermidades oncológicas e distúrbios neurológicos como as principais causas de óbito em animais adultos (Flemig et al., 2011).

Dentro deste cenário de crescente incidência oncológica, destaca-se a alta frequência das neoplasias cutâneas, que representam parcela expressiva das afecções tumorais diagnosticadas na espécie canina. Um estudo retrospectivo que avaliou a incidência de câncer em uma população superior a 100 mil animais, identificou que a pele foi o sítio anatômico mais frequentemente acometido, correspondendo a 37,05% dos casos (Gruntzig et al., 2015).

2.2 MASTOCITOMA CUTÂNEO CANINO

Entre as neoplasias cutâneas em cães, o mastocitoma cutâneo (MCT) é uma das mais prevalentes, com incidência que pode superar 20% dos tumores de pele (De Nardi et al., 2002; Meirelles et al., 2010; De Nardi et al., 2022). Sua apresentação clínica é variável, o que torna o manejo diagnóstico e terapêutico complexo (De Nardi et al., 2022).

A etiologia do MCT não é completamente esclarecida. Processos inflamatórios crônicos, exposição a agentes irritativos e mutações no gene c-KIT, que codifica o receptor de tirosina quinase, já foram associados ao desenvolvimento da doença (London et al., 1999; Turin et al., 2006; Vail et al., 2013). Algumas raças apresentam maior predisposição, como Boxer, Labrador Retriever, American Staffordshire e Golden Retriever (Smiech et al., 2019).

Macroscopicamente, os tumores não seguem um padrão único. Podem variar desde nódulos de superfície lisa, móveis e não ulcerados, até lesões irregulares, eritematosas, ulceradas e com sinais de degranulação mastocitária (Murphy et al., 2006). A localização também influencia no prognóstico: lesões no plano nasal e na bolsa escrotal estão frequentemente relacionadas a piores desfechos (Horta et al., 2018).

O comportamento biológico do MCT é heterogêneo e está associado ao grau histológico. O sistema de Patnaik et al. (1984) classifica os tumores em graus I, II e III, enquanto o sistema de Kiupel et al. (2011) os divide em alto e baixo grau. Ambos demonstram que tumores de alto grau apresentam maior risco de recidiva e metástase, enquanto os de baixo grau tendem a ter evolução clínica mais favorável.

Os sinais clínicos sistêmicos estão relacionados à degranulação mastocitária, que pode ocorrer de forma espontânea ou durante a manipulação do tumor. A liberação de mediadores como histamina, heparina e proteases pode causar eritema, edema e formação de pápulas próximas à lesão, além de manifestações sistêmicas como vômito, diarreia, hipotensão e até colapso circulatório (Thamm; Vail, 2007; Daleck; De Nardi, 2016; De Nardi et al., 2022).

O diagnóstico inicial geralmente é feito por citopatologia, técnica que apresenta sensibilidade superior a 90% para detecção de MCT (Baker-Gabby et al., 2003; Blackwood et al., 2012). Além disso, pode auxiliar na graduação tumoral: Camus et al. (2016) observaram sensibilidade de 88% e especificidade de 94% para distinguir MCT

de alto e baixo grau em comparação à histopatologia. Apesar disso, a histopatologia convencional continua sendo indispensável, pois permite avaliar graduação tumoral, infiltração em tecidos profundos, invasão angiolinfática e status das margens cirúrgicas, dados fundamentais para a conduta clínica (De Nardi et al., 2022).

A imuno-histoquímica também é utilizada no estadiamento. O **Ki-67**, marcador de proliferação celular, quando positivo em ≥ 23 células em 5 campos de grande aumento (HPF), está associado a pior prognóstico (Kiupel et al., 2004). Já o **c-KIT** apresenta três padrões de expressão: membranoso (KIT 1), citoplasmático focal (KIT 2) e citoplasmático difuso (KIT 3). Os padrões KIT 2 e KIT 3 indicam evolução clínica mais agressiva (Turin et al., 2006; Webster et al., 2007).

Diversos fatores prognósticos negativos foram descritos, incluindo: graduação histológica III (Patnaik et al., 1984) ou alto grau (Kiupel et al., 2011), nódulos maiores que 3 cm (Hahn et al., 2004), margens cirúrgicas comprometidas (Ozaki et al., 2007), presença de ≥ 7 mitoses em 10 HPF (Elston et al., 2009) e ocorrência de recidiva local ou metástases linfáticas e sistêmicas (Horta et al., 2018).

A excisão cirúrgica permanece como tratamento de escolha para a maioria dos pacientes (Oliveira et al., 2020). Em casos específicos, terapias complementares podem ser necessárias. A eletroquimioterapia (EQT) é indicada para tumores < 3 cm não ressecáveis, em leito cirúrgico quando margens adequadas não são obtidas ou em cicatrizes com margens comprometidas (Spugnini et al., 2019; De Nardi et al., 2022).

A radioterapia também tem papel relevante, sendo empregada em casos não passíveis de ressecção completa, como terapia adjuvante em margens comprometidas, em protocolos de citorredução pré-operatória ou em abordagem paliativa para redução tumoral e controle da dor (Manson et al., 2021).

A quimioterapia sistêmica é recomendada para pacientes com alto risco de metástase. Estudos demonstraram benefícios de protocolos baseados em vimblastina e prednisolona (Hayes et al., 2007), assim como no uso de inibidores de tirosina quinase, principalmente o fosfato de toceranib (Olsen et al., 2018). O Consenso Brasileiro de Mastocitoma (De Nardi et al., 2022) endossa essas evidências, reforçando a importância da quimioterapia em tumores de alto grau, recidivantes ou com risco elevado de disseminação.

Dada a grande variabilidade clínica e biológica do MCT, cada paciente deve ser avaliado individualmente, considerando fatores clínicos, histopatológicos e

moleculares, bem como o contexto do animal, para a definição da conduta terapêutica mais adequada (Oliveira et al., 2020).

2.3 CIRURGIA ONCOLÓGICA E MARGENS CIRÚRGICAS

Os procedimentos cirúrgicos fazem parte da grande maioria dos protocolos de tratamento para tumores sólidos. Em muitos casos, especialmente em estágios iniciais e em neoplasias de baixo potencial de agressividade, a cirurgia pode proporcionar a cura (Osborne, 2007; Kleeff; Ronellenfitch, 2021). Para que esse objetivo seja alcançado, é fundamental obter margens cirúrgicas livres, pois o comprometimento marginal está diretamente associado ao risco de recidiva local (Simpson et al., 2004; Weisse et al., 2002).

No caso do mastocitoma cutâneo canino (MCT), a avaliação das margens cirúrgicas é amplamente discutida na literatura, ainda sem consenso definitivo. Diversas classificações foram propostas ao longo dos anos, tanto para análise macroscópica quanto microscópica, o que reflete a complexidade em se definir de maneira objetiva o que constitui uma margem comprometida ou adequada (Pratschke et al., 2013; Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022).

Do ponto de vista macroscópico, diferentes estratégias são descritas. Uma abordagem conservadora recomenda margens laterais proporcionais ao maior diâmetro do nódulo para tumores com menos de 4 cm, associadas à inclusão de uma fáscia muscular como margem profunda. Para lesões com mais de 4 cm, sugere-se uma margem fixa de 4 cm (Pratschke et al., 2013; Chu et al., 2020; Itoh et al., 2021). Outra linha de conduta considera a graduação histológica como base para o planejamento, propondo margens de 2 cm para MCTs de grau I e II e de 4 cm para tumores de grau III (Withrow et al., 2013; Pratschke et al., 2013). Em busca de uniformidade, o II Consenso Brasileiro de Mastocitoma em Cães recomenda margens laterais de 3 cm e pelo menos uma fáscia muscular em profundidade para garantir maior controle local da doença (De Nardi et al., 2022).

Na análise microscópica, também há múltiplos critérios. Uma classificação frequente divide as margens em comprometidas, quando células neoplásicas estão na borda do fragmento; exíguas, quando essas células estão a menos de 3 a 5 mm da margem; e livres, quando não se observam células tumorais além desse limite (Murphy et al., 2004; Moreira, 2018). Nesse contexto, Horta et al. (2018) sugerem que

margens inferiores a 3 mm sejam interpretadas com cautela, podendo ser consideradas potencialmente comprometidas, especialmente em tumores de comportamento mais agressivo. Além disso, a classificação R, amplamente empregada na oncologia humana, define R0 como margens livres (macro e microscopicamente), R1 como comprometimento microscópico e R2 como comprometimento macroscópico (Tunn et al., 2009).

Um desafio adicional para o patologista é a diferenciação entre mastócitos neoplásicos e mastócitos inflamatórios ou residentes da derme, o que pode gerar dificuldade na definição objetiva do status marginal e contribuir para a variabilidade entre observadores (De Nardi et al., 2022).

Muito além de tentar estabelecer uma distância fixa para considerar uma margem cirúrgica como adequada em pacientes com MCT, estudos recentes têm buscado compreender o real impacto do status de margem sobre as taxas de recidiva local. A simples presença de células neoplásicas na borda do fragmento cirúrgico nem sempre reflete a probabilidade de recorrência clínica, sobretudo quando desconsiderados outros fatores relacionados ao tumor e ao paciente (Donnelly et al., 2013; Karbe et al., 2021). Esse cenário reforça que, embora o status de margem seja um parâmetro fundamental, ele deve ser interpretado em conjunto com variáveis biológicas e clínicas para uma melhor definição prognóstica.

Donnelly et al. (2013) avaliaram 90 casos de MCT, de baixo e alto grau, utilizando margens laterais de 2 a 3 cm associadas a uma fáscia muscular em profundidade. Apesar de todos os pacientes apresentarem margens histológicas livres ou exíguas, a taxa de recidiva foi de 36% nos tumores de alto grau, contra apenas 4% nos de baixo grau. Esse resultado evidencia que a agressividade tumoral exerce influência prognóstica maior do que a simples medida das margens.

Em situações em que o exame histopatológico indica comprometimento marginal, a ampliação cirúrgica pode ser recomendada. Karbe et al. (2021) relataram que, em 85 pacientes submetidos à reexcisão da cicatriz, 27% apresentaram mastócitos residuais na nova amostra. No entanto, essa positividade não se correlacionou diretamente com recidiva clínica, sugerindo que o status marginal, embora relevante, não deve ser analisado isoladamente. Esse conjunto de evidências sustenta a necessidade de métodos diagnósticos mais precisos e padronizados para avaliação intraoperatória, capazes de integrar os achados histológicos às características biológicas do tumor e do paciente.

De fato, a associação de diversos fatores prognósticos é essencial no planejamento terapêutico de pacientes com MCT. A graduação histológica, índice mitótico, localização anatômica, características macroscópicas da lesão, presença de mutações no gene c-KIT, comorbidades do paciente e resposta inflamatória local são variáveis que impactam diretamente na definição das margens cirúrgicas e na necessidade de tratamentos adjuvantes (Horta et al., 2018; Scarpa et al., 2012; Sledge; Webster; Kiupel, 2016; De Nardi et al., 2022)

2.4 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS E MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DEFINIÇÃO DO *STATUS* DE MARGEM

A avaliação do status das margens cirúrgicas é etapa crítica no manejo do mastocitoma cutâneo canino (MCT), pois orienta a necessidade de tratamentos adicionais e influencia diretamente o prognóstico (Horta et al., 2018; De Nardi et al., 2022). Nesta seção são descritos os métodos empregados para essa avaliação, com foco na histopatologia convencional, considerada o padrão-ouro, e em técnicas rápidas como a histopatologia por congelamento e a citologia por imprint, que buscam fornecer informações transoperatórias ao cirurgião (Jaafar, 2006; Whitehair et al., 1993; Milovancev et al., 2016). A análise comparativa entre esses métodos é o objetivo central deste estudo.

2.4.1 Histopatologia convencional: fixação em formalina 10% e conservação em bloco de parafina

A histopatologia com fixação em formalina 10% e inclusão em parafina é amplamente reconhecida como o padrão-ouro na avaliação de margens cirúrgicas (Jaafar, 2006; Horta et al., 2018). O método permite análise detalhada da arquitetura tecidual, graduação histológica, invasão angiolinfática e comprometimento marginal, fornecendo subsídios robustos para decisões terapêuticas.

Entretanto, trata-se de uma técnica demorada, que inviabiliza a tomada de decisão durante o transoperatório. Essa limitação abre espaço para métodos rápidos, capazes de auxiliar o cirurgião na definição da dose cirúrgica em tempo real.

2.4.2 Histopatologia transoperatória por congelamento

A histopatologia por congelamento é uma técnica consolidada na medicina humana, sendo empregada para avaliação intraoperatória de margens em diferentes neoplasias, como câncer de mama e tumores cutâneos não melanocíticos (Castley et al., 2013; Nimazoglu et al., 2016). Apresenta alta acurácia quando comparada à análise convencional, além de permitir a ampliação imediata da ressecção quando necessário.

Na medicina veterinária, embora ainda pouco explorada, alguns estudos já investigaram sua aplicabilidade. Whitehair et al. (1993) avaliaram o método em cães e relataram viabilidade, mas com variação na acurácia. De forma semelhante, Horta et al. (2018) reforçam que a padronização ainda é necessária para sua incorporação sistemática na rotina. Essas evidências demonstram o potencial da técnica como ferramenta complementar, cuja performance necessita de validação em estudos experimentais como o presente.

2.4.3 Avaliação citopatológica transoperatória

A citologia por imprint é um método rápido, de baixo custo e fácil execução, que permite a avaliação celular de fragmentos de margem cirúrgica durante o transoperatório. Na medicina humana, é utilizada principalmente na avaliação de linfonodos sentinela em câncer de mama, com sensibilidade de até 85% (Pétursson et al., 2018).

Em cães, Milovancev et al. (2016) investigaram a técnica em mastocitomas e sarcomas cutâneos, evidenciando resultados promissores, mas com variações de sensibilidade e especificidade. Apesar das limitações, o método pode auxiliar na decisão cirúrgica, especialmente em serviços com restrição de acesso à histopatologia por congelamento.

2.4.4 Colorações para citologia e histologia

A escolha da coloração influencia diretamente a qualidade da avaliação microscópica, especialmente na interpretação de mastócitos em amostras de margem cirúrgica. O hematoxilina-eosina (HE) permanece como referência para análise histopatológica detalhada, permitindo avaliação da arquitetura tecidual e das características nucleares (Prophet et al., 1992). Já o Panótico Rápido e o azul de toluidina se destacam pela agilidade e pela capacidade de evidenciar granulações citoplasmáticas, recursos particularmente úteis em contextos que demandam respostas imediatas (Bancroft; Gamble, 2008; Horta et al., 2018). Dessa forma, compreender as aplicações e limitações dessas técnicas é essencial para aprimorar a definição do status de margens e auxiliar na tomada de decisão cirúrgica.

2.4.4.1 *Coloração de Panótico Rápido*

A coloração de panótico rápido (PR) é uma variação da coloração de Romanowsky (CR). A técnica foi originalmente desenvolvida por Dmitri Romanowsky em 1891, tendo como base os preceitos descritos por Paul Erlich no final do século XIX (Krafts e Pambuccian, 2011).

O PR surgiu como resposta à necessidade de uma técnica laboratorial mais rápida e prática. Seu processo utiliza uma combinação de três elementos: um fixador (metanol), um corante basofílico (azul de metileno/azure B) e um corante acidofílico (eosina Y ou B). As lâminas são imersas em cada solução por aproximadamente 10 segundos, completando todo o processo de coloração em menos de um minuto (Krafts e Pambuccian, 2011).

Apesar de sua rapidez e praticidade, sendo amplamente utilizada na rotina citopatológica e hematológica, a coloração de PR apresenta limitações, principalmente na definição de detalhes de estruturas nucleares e na diferenciação de alguns tipos celulares específicos em análises histológicas (Krafts e Pambuccian, 2011).

2.4.4.2 Coloração Azul de Toluidina

O azul de toluidina (AT) é um corante metacromático pertencente à família das tiazinas, utilizado tanto *in vivo* quanto em avaliações citológicas e histopatológicas. O corante AT foi descoberto por William Henry Perking em 1856, inicialmente utilizado em processos industriais. Após a introdução das técnicas de coloração vital por Paul Erlich em 1885, passou a ser empregado na medicina (Sridharan e Shankar, 2012).

Para compreender o funcionamento do AT, é preciso entender o conceito de metacromasia, que é a capacidade de um corante tecidual alterar sua coloração original ao entrar em contato com determinadas estruturas. No caso do AT ao entrar em contato com RNA e DNA assume coloração azul, enquanto ao entrar em contato com mastócitos, pode assumir tonalidade voltadas à púrpura e roxo (Sridharan e Shankar, 2012).

A alteração da coloração original, azul, para tonalidades púrpuras ao interagir com mastócitos, se dá, pois, essas células contêm substâncias como heparina e histamina, componentes celulares ricos em grupos sulfato, quando o AT se liga a esse componente altera sua coloração (Sridharan e Shankar, 2012).

Por essas características o AT é amplamente utilizado na oncologia veterinária para o diagnóstico do mastocitoma cutâneo canino. Além disso, por ser um método simples e rápido, com tempo médio de coloração de 20 segundos, também é utilizado em técnicas de avaliação patológica transoperatória auxiliando na delimitação de margens tumorais e diagnóstico intraoperatório (Sridharan e Shankar, 2012).

2.4.4.3 Coloração de Hematoxilina e Eosina

A hematoxilina é um corante derivado da árvore *Haematoxylum campechianum*, nativa da América Central. Há relatos de que seus extratos eram utilizados por maias e astecas para o tingimento de tecidos e com propósitos medicinais. No século XVI, com a colonização espanhola, essa tintura foi levada a Europa, onde disseminou-se e foi muito valorizada (Hidalgo e Oviedo, 2019).

Seu uso na patologia teve início após a introdução dos corantes sintéticos feita por Paul Ehrlich, no final do século XIX. A combinação com a Eosina, um corante

ácido, foi uma etapa crucial para que essa combinação se consolidasse como o método mais utilizado na histopatologia até os dias de hoje (Hidalgo e Oviedo, 2019).

Cada uma das duas colorações possui afinidade por estruturas distintas. Estruturas como retículo endoplasmático rugoso, núcleo e ribossomos se relacionam a hematoxilina, se corando em tons de azul e roxo. Por sua vez, citoplasma rico em proteínas, fibras musculares e mitocôndria tem maior afinidade pela eosina, sendo marcadas por tons da cor rosa e vermelha. Existem ainda algumas células conhecidas como anfófilas, que tem atração por ambos corantes, possuindo coloração roxa intermediária, como exemplo podemos citar os miofibroblastos, plasmócitos e algumas células tumorais (Chan, 2014).

Apesar de simples, a técnica de coloração HE possui mais etapas que as técnicas anteriormente descritas, levando mais tempo para ser executada. Esse fato implica em limitações de sua utilização durante o período transoperatório, sendo normalmente utilizada para a confirmação dos diagnósticos gerados pelo patologista durante a cirurgia (Hidalgo e Oviedo, 2019).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus de Curitibanos. A execução do projeto contou com a colaboração dos serviços de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, Laboratório de Patologia Veterinária (LABOPAVE) e Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LAClin) da instituição.

A pesquisa foi conduzida em conformidade com os princípios de bem estar animal e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo nº 1499220124.

3.1 SELEÇÃO DE ANIMAIS

Foram incluídos no estudo pacientes caninos atendidos pelo serviço de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da UFSC, que apresentavam queixa relacionada a nodulações cutâneas.

Após identificação da nodulação, foram realizados os seguintes procedimentos: mensuração com auxílio de paquímetro, avaliação mobilidade,

presença de ulceração, eritema de tecido cutâneo adjacente, dor à manipulação, consistência, regularidade das margens e aspecto da superfície nodular. Além disso, cada paciente foi submetido a uma avaliação física completa, exames laboratoriais e estadiamento oncológico, utilizando radiografia torácica e ultrassonografia abdominal.

Após a avaliação macroscópica, foi realizada a coleta de material para análise citopatológica de triagem, por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), realizada tanto pela técnica de aspiração quanto pela técnica de capilaridade. Utilizou-se agulha hipodérmica 25 mm x 7 mm, que era introduzida na nodulação com movimentos em leque para obtenção do material, posteriormente instilado sobre lâminas de microscopia para análise citopatológica.

Foram incluídas no estudo apenas nodulações cutâneas com avaliação citopatológica sugestiva de mastocitoma cutâneo. A amostra final foi composta por 15 nodulações provenientes de 11 cães. Foram excluídos os casos em que não houve concordância entre o diagnóstico citopatológico inicial e o resultado da avaliação histopatológica convencional, bem como os pacientes que, por condição clínica ou critérios de estadiamento oncológico, não apresentavam indicação para tratamento cirúrgico.

3.2 PLANEJAMENTO CIRÚRGICO E COLETA DE AMOSTRAS

O planejamento cirúrgico de cada paciente foi realizado de forma individualizada, considerando não apenas as condições clínicas gerais do animal, mas também as características específicas de cada nodulação, tais como tamanho e/ou localização anatômica (Figura 1: A).

De maneira geral, foram adotadas margens cirúrgicas laterais de 3 cm e margens profundas correspondendo a uma fáscia muscular, em consonância com o II Consenso Brasileiro de Mastocitomas em Cães (De NARDI et al., 2022). Entretanto, em situações em que a viabilidade anatômica não permitiu a adoção integral dessa recomendação, optou-se por margens de 2 a 3 cm, conforme descrito por outros autores (CHU et al., 2020; PRATSCHKE et al., 2013; ITOH et al., 2021; DONNELLY et al., 2015) (Figura 1: B). A definição das margens levou em consideração não apenas a natureza presumida da lesão, mas também a viabilidade técnica da ressecção cirúrgica, respeitando as particularidades anatômicas e funcionais de cada região corporal acometida.

Após a exérese completa da nodulação, procedeu-se à identificação das margens laterais da peça cirúrgica, com o objetivo de orientar as posteriores avaliações histopatológicas. Para lesões localizadas em regiões de cabeça, pescoço, tronco e abdômen, as margens foram denominadas como cranial, caudal, lateral esquerda e lateral direita. Em contrapartida, para lesões situadas em membros torácicos ou pélvicos, a nomenclatura utilizada foi cranial, caudal, proximal e distal, respeitando a anatomia regional.

Não foi realizada a avaliação das margens profundas, tendo em vista a dificuldade de padronização desse parâmetro em nível de pesquisa. Tal limitação decorre da variabilidade anatômica entre as diferentes regiões corporais, bem como da ausência de um ponto de referência único e reproduzível que permita uniformidade na delimitação da margem profunda. Dessa forma, optou-se por restringir a análise às margens laterais, garantindo maior consistência metodológica e comparabilidade entre os casos.

A identificação das margens foi realizada durante o procedimento cirúrgico, pelo cirurgião responsável, por meio da aplicação de pontos de sutura isolados, obedecendo a um padrão previamente estabelecido: um ponto isolado simples indicava a margem cranial, enquanto dois pontos isolados simples identificavam a margem lateral direita ou a margem proximal, conforme localização da nodulação (Figura 1: C).



Figura 1: Procedimentos realizados no processamento de amostras. A: mensuração da nodulação. B: demarcação de margens macroscópicas com caneta permanente. Linha vermelha: base da nodulação. Linha azul: margens macroscópicas de 2cm a 3cm. C: identificação de margens com pontos de sutura. D: Identificação de margens cirúrgicas com tinta nanquim. **Fonte:** Elaboração própria.

Após a ressecção cirúrgica e identificação das margens, o primeiro procedimento realizado consistiu na coleta de material para avaliação citopatológica das margens. Utilizou-se a técnica de compressão direta (*imprint*), na qual uma lâmina de microscopia é pressionada mecanicamente contra o tecido fresco, promovendo a transferência de células para a superfície da lâmina. Foram confeccionadas duas lâminas por margem lateral, totalizando oito lâminas citológicas por nodulação (Figura 2: A).



Figura 2: Procedimentos realizados no processamento de amostras. A: confecção de lâmina de citologia por técnica de compressão direta (*imprint*). B: Clivagem de margens laterais para avaliação de fragmentos por congelamento. **Fonte:** Elaboração própria.

Em seguida procedeu-se a demarcação das margens com corante nanquim, utilizando uma haste flexível embebida no corante, que era cuidadosamente aplicado ao redor da peça anatômica. Após cerca de 30 segundos, o excesso de tinta era removido com solução de ácido acético, preservando a delimitação das bordas (Figura 1: D).

Na sequência, realizou-se a clivagem das margens para avaliação histopatológica por congelamento. Com auxílio de uma lâmina de bisturi número 24, foi coletado um fragmento de aproximadamente 30mm de comprimento e 3mm de espessura de cada uma das margens laterais (Figura 2: B). O restante da peça anatômica foi acondicionado em frasco contendo solução de formalina a 10%, para posterior processamento histológico convencional.

Os fragmentos teciduais obtidos foram posicionados sobre um suporte de madeira (Figura 3: A) e submersos em solução criopreservadora a base de N-hexano por aproximadamente um minuto (Figura 3: B). Em seguida, foram envoltos em papel alumínio, identificados e armazenados temporariamente em um botijão de nitrogênio líquido (Figura 3: C e D). Posteriormente, os tecidos foram transportados e acondicionados em um ultracongelador, a uma temperatura de -80°C , até o momento do processamento da técnica de histologia por congelamento.



Figura 3: Procedimentos realizados no processamento de amostras transcirúrgicas. Congelamento de fragmento tecidual com nitrogênio líquido. **Fonte:** Elaboração própria.

3.3 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Apesar das amostras citológicas e para histopatologia por congelamento terem sido coletadas imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, por questões logísticas, o processamento laboratorial e a leitura das lâminas não ocorreram em tempo real (transoperatório). A confecção e análise das lâminas foram realizadas após a conclusão de todas as intervenções cirúrgicas, garantindo controle e padronização de todos os processos.

As amostras citológicas obtidas pela técnica de impressão direta (imprint) foram coradas utilizando dois métodos distintos: panótico rápido e azul de toluidina. Para cada peça cirúrgica subdividida em quatro margens, foram confeccionadas duas lâminas por margem, sendo uma corada com panótico rápido e outra com azul de toluidina, totalizando oito lâminas citológicas por nódulo.

Na coloração com panótico rápido, as lâminas foram imersas sequencialmente em três soluções, com função fixadora (metanol), corante basofílico (azul de metileno)

e corante eosinofílico (eosina), segundo metodologia descrita por Krafts e Pambuccian (2011). Já a coloração com azul de toluidina foi realizada conforme Sridharan e Shankar (2012), visando evidenciar os grânulos metacromáticos característicos dos mastócitos.

Para a histopatologia por congelamento, os fragmentos foram fixados em suporte de madeira com cola branca, congelados com jato de nitrogênio (Figura 4: A) e submetidos à microtomia, obtendo-se cortes histológicos entre 7 e 10 μm de espessura (Figura 4: B) (Jaafar, 2006; Scouten; Cunningham, 2006; Tamanuki et al., 2021). As secções foram transferidas para água destilada, recolhidas com lâminas de microscopia e coradas pelos mesmos protocolos empregados na citologia por *imprint* (Figura 4: C e D). Ao final, cada peça originou oito lâminas histológicas provenientes da técnica de congelamento (Tabela 1).

Tabela 1: Número total de lâminas confeccionadas por nódulo considerando a técnica de processamento e a coloração utilizada.

Método	Margens Analisadas	Lâminas por Margem	Tipo de Coloração	Total de Lâminas
Citopatologia (<i>Imprint</i>)	4	2	Panótico Rápido + Azul de Toluidina	8
Congelamento	4	2	Panótico Rápido + Azul de Toluidina	8
Histopatologia Convencional	4	2	HE + Azul de Toluidina	8
Total por Nódulo	-	-	-	24

Cada nódulo submetido ao estudo originou um total de 24 lâminas, sendo oito provenientes da citopatologia por *imprint*, oito da histopatologia por congelamento e oito da histopatologia convencional. Em todas as técnicas, foram avaliadas quatro margens cirúrgicas, com duas lâminas por margem, submetidas a diferentes métodos de coloração (panótico rápido, azul de toluidina e hematoxilina e eosina). **Fonte:** Elaboração própria.

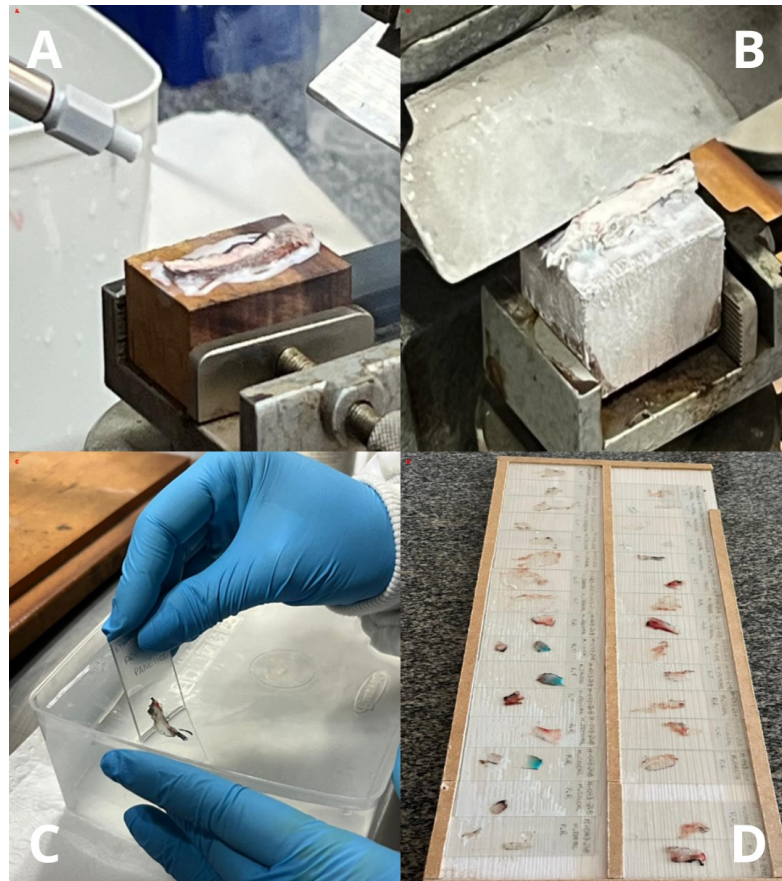


Figura 4: Procedimentos realizados no processamento de amostras. Confeção de lâminas por congelamento. **Fonte:** Elaboração própria.

Os fragmentos remanescentes foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados segundo os protocolos convencionais de histopatologia descritos por Dorigan (2012) e Kamstock et al. (2011), incluindo desidratação em álcoois graduados, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia rotativa, com cortes de 4 a 5 μm , posteriormente corados por Hematoxilina e Eosina (Chan, 2014) e também por azul de toluidina (Sridharan; Shankar, 2012).

As amostras foram avaliadas em microscópio óptico, e as margens cirúrgicas foram classificadas em livres ou comprometidas, considerando comprometidas aquelas em que mastócitos isolados ou em agrupamentos (clusters) foram observados a menos de 3 mm da borda da lesão (Figura: 5).

O diagnóstico definitivo dos mastocitomas e a graduação histológica foram realizados com base no sistema de dois níveis (alto e baixo grau) proposto por Kiupel et al. (2011), em razão de sua maior reprodutibilidade e menor subjetividade. A

classificação de Patnaik et al. (1984), embora histórica, não foi utilizada neste estudo por apresentar elevada variabilidade interobservador e dificuldades de padronização entre patologistas, limitações já destacadas em trabalhos recentes.

As análises citológicas foram processadas e interpretadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da UFSC. A técnica de histopatologia por congelamento foi realizada por um único patologista, o professor Adriano Tony Ramos (UFSC), garantindo uniformidade na interpretação. Já a avaliação histopatológica convencional foi conduzida pelo Laboratório de Patologia Veterinária da UFSC (LABOPAVE), envolvendo a rotina diagnóstica institucional.

Os dados obtidos nas três técnicas (citologia por imprint, histopatologia por congelamento e histopatologia convencional) foram organizados em planilhas e posteriormente submetidos à análise estatística. A histopatologia convencional foi considerada o padrão-ouro para comparação dos resultados.

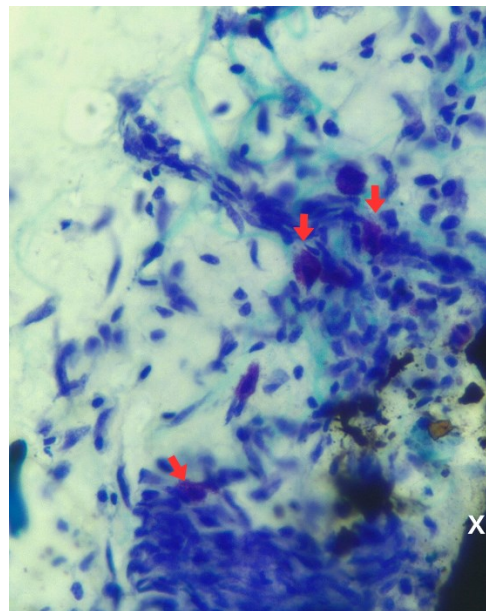


Figura 5: Avaliação microscópica de lâmina histológica transcirúrgica por congelamento com lente objetiva de 40x. Coloração Azul de Toluidina. Seta vermelha indica mastócitos infiltrados em margem. O “X” branco indica delimitação de margem por tintura de nanquim. **Fonte:** Elaboração própria.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi conduzida considerando a histopatologia convencional como método de referência (padrão-ouro), com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico das técnicas de citologia por *imprint* e histopatologia por congelamento na definição do *status* de margens cirúrgicas em mastocitoma cutâneo canino.

Inicialmente, foram calculadas as medidas de desempenho diagnóstico: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. Essas métricas permitiram quantificar a capacidade das técnicas avaliadas em identificar corretamente margens cirúrgicas comprometidas e livres, possibilitando a comparação direta com o padrão-ouro (Rogers et al., 2020; Lorant et al., 2022).

A sensibilidade foi definida como a proporção de margens verdadeiramente comprometidas corretamente identificadas pelas técnicas avaliadas (Brink, 2021), enquanto a especificidade correspondeu à proporção de margens verdadeiramente livres corretamente classificadas. Os valores preditivos (VPP e VPN) estimaram, respectivamente, a probabilidade de que um resultado positivo ou negativo fosse verdadeiro (Guo et al., 2021). A acurácia representou a proporção total de classificações corretas em relação ao total de observações (Wang et al., 2022; Lorant et al., 2022).

As técnicas foram analisadas sob duas abordagens distintas. Na primeira, denominada avaliação individualizada (PR_A e AT_A), cada margem cirúrgica lateral foi considerada separadamente, de modo que o resultado diagnóstico refletia a condição específica daquela margem. Na segunda, denominada abordagem composta (PR_B e AT_B), o paciente foi considerado positivo para comprometimento de margem quando ao menos uma das quatro margens avaliadas apresentava presença de mastócitos. Assim, mesmo que apenas uma margem estivesse comprometida, todo o caso era classificado como positivo. Essa estratégia buscou simular um cenário clínico real, no qual a detecção de qualquer margem comprometida já influencia a conduta cirúrgica. Por consequência, a abordagem composta tende a apresentar maior sensibilidade na identificação de casos positivos, ainda que à custa de uma possível redução da especificidade.

Para verificar a existência de associação estatística entre os métodos testados e o padrão-ouro, aplicou-se o teste do qui-quadrado (χ^2), apropriado para a natureza não paramétrica das variáveis, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Chen et al., 2023).

Adicionalmente, foram realizadas regressões logísticas com o objetivo de verificar a associação entre os resultados das técnicas avaliadas e as do padrão-ouro. Os modelos incluíram como variáveis independentes os procedimentos de *imprint* e congelamento associados aos corantes hematoxilina-eosina/Panótico Rápido (PR) e

azul de toluidina (AT), sendo a presença de margem comprometida (segundo a histopatologia convencional) considerada como variável dependente binária (Zhang et al., 2023).

Todas as análises foram realizadas com o software R (R Core Team, 2025), que oferece ampla gama de funções para testes de hipótese e modelagens de regressão aplicados à análise de dados diagnósticos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o desempenho de diferentes métodos diagnósticos aplicáveis no contexto transoperatório para definição do status de margens cirúrgicas em MCT, comparando-os com a histopatologia convencional (padrão-ouro). As técnicas avaliadas incluíram a citologia por *imprint* e a avaliação histopatológica de fragmentos por congelamento, ambas submetidas a duas opções de coloração: Panótico Rápido (PR) e azul de toluidina (AT). A análise estatística contemplou as principais métricas de desempenho diagnóstico: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. Além disso, foram aplicados modelos de regressão logística com caráter exploratório, buscando avaliar a associação entre os resultados das técnicas rápidas e o diagnóstico definitivo, de modo a estimar sua aplicabilidade clínica

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos. O congelamento associado ao azul de toluidina na abordagem consolidada (AT_B) alcançou 100% em todas as métricas (sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia), sendo o método de melhor desempenho. No *imprint*, tanto com panótico rápido (PR_B) quanto com azul de toluidina (AT_B), a sensibilidade foi de 100% e o VPN também de 100%, mas a especificidade permaneceu baixa (14,3%). Já na análise individualizada, observou-se desempenho mais variável: o congelamento com azul de toluidina (AT_A) apresentou sensibilidade de 93,0% e acurácia de 73,3%, enquanto o congelamento com panótico rápido (PR_A) mostrou sensibilidade de 76,2% e acurácia de 61,7%. Esses resultados reforçam o potencial do azul de toluidina em maximizar a sensibilidade, embora a baixa especificidade limite a interpretação dos achados.

Tabela 2: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV), valor preditivo negativo (NPV) e acurácia das técnicas avaliadas para definição de margens cirúrgicas em mastocitomas cutâneos caninos.

Técnica	Procedimento	n	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
PR_A	<i>Imprint</i>	60	80,00	26,67	26,67	80,00	40,00
PR_A	Congelamento	60	76,19	27,78	71,11	33,33	61,67
PR_B	<i>Imprint</i>	15	100,00	14,29	57,14	100,00	60,00
PR_B	Congelamento	15	92,31	0,00	85,71	0,00	80,00
AT_A	<i>Imprint</i>	60	94,12	13,95	30,19	85,71	36,67
AT_A	Congelamento	60	93,02	23,53	75,47	57,14	73,33
AT_B	<i>Imprint</i>	15	100,00	14,29	57,14	100,00	60,00
AT_B	Congelamento	15	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

PR: Corante a base de hematoxilina e eosina; AT Corante a base de azul de toluidina; _A: avaliação individual de cada margem cirúrgica lateral; _B: abordagem composta em caso de qualquer uma das margens avaliadas nele apresentasse comprometimento. n: número de observações utilizadas por técnica. Para PR_A e AT_A, cada uma das 4 margens laterais de 15 nódulos foi considerada (n=60). Para PR_B e AT_B, utilizou-se abordagem composta por nódulo (n=15). Fonte: Elaboração própria.

Observou-se que a aplicação da abordagem consolidada de análise (abordagem B), na qual qualquer margem positiva culminava na classificação global do paciente como positivo, resultou em aumento da sensibilidade para todas as técnicas avaliadas. Contudo, a especificidade se manteve reduzida em diversas combinações, como no imprint com PR_B (14,3%) e no imprint com AT_B (14,3%).

Na avaliação por congelamento individualizado, o desempenho variou de acordo com a coloração. A associação com azul de toluidina (AT_A) apresentou sensibilidade de 93,0%, especificidade de 23,5%, VPP de 75,5% e VPN de 57,1%. Já o congelamento com panótico rápido (PR_A) obteve sensibilidade de 76,2%, especificidade de 27,8% e VPN de 33,3%. Esses dados demonstram que o azul de toluidina proporciona maior contraste e melhor visualização de mastócitos, mesmo em cortes de qualidade técnica limitada.

De modo geral, a associação entre a técnica de congelamento e o azul de toluidina mostrou maior consistência diagnóstica, enquanto o panótico rápido apresentou desempenho inferior, tanto no imprint quanto no congelamento.

Cabe ressaltar que a baixa especificidade observada não decorreu de diferenças de amostragem entre as técnicas, mas da própria estrutura da amostra. Como todas as margens foram classificadas como comprometidas pela histopatologia convencional, não houve casos verdadeiramente negativos. A ausência de negativos

inviabilizou a aferição real da especificidade, resultando em valores matematicamente baixos (Pepe et al., 2003; Lorant et al., 2022).

Os modelos de regressão logística não atingiram significância estatística em nenhum dos cenários testados ($p > 0,05$). A única tendência parcial foi observada no congelamento associado ao azul de toluidina na avaliação individualizada (AT_A), com $p = 0,0881$, sugerindo possível associação com o padrão-ouro. No entanto, o baixo número amostral e a elevada proporção de margens positivas comprometeram a estabilidade dos coeficientes e aumentaram os erros padrão. Assim, a regressão teve caráter apenas exploratório, não confirmatório.

Além da avaliação estatística, é importante considerar os aspectos biológicos e técnicos envolvidos. O azul de toluidina se mostrou mais sensível pela sua afinidade com grânulos mastocitários ricos em heparina e histamina, promovendo coloração metacromática característica (Sridharan e Shankar, 2012; Chandra et al., 2022). Já o panótico rápido, apesar de amplamente utilizado na rotina citológica, apresentou contraste menos eficiente nos cortes de congelamento, dificultando a diferenciação precisa dos mastócitos.

No entanto, tanto na citologia por *imprint* quanto no congelamento, persiste o desafio diagnóstico de distinguir mastócitos neoplásicos de mastócitos inflamatórios ou comensais, presentes na derme. Essa limitação, amplamente discutida por Milovancev et al. (2016), Whitehair et al. (1993) e no II Consenso Brasileiro de Mastocitoma (De Nardi et al., 2022), pode explicar parte da redução de especificidade encontrada.

Na avaliação histopatológica convencional, não foram observadas margens livres em nenhum dos grupos, independentemente do tamanho tumoral ou do grau histológico. Esse achado pode estar relacionado ao padrão infiltrativo microscópico do mastocitoma e à dificuldade em distinguir mastócitos neoplásicos de inflamatórios, levando a uma superestimação do comprometimento marginal. Não se pode descartar, contudo, a influência de fatores técnicos do ato cirúrgico, como a dificuldade em obter margens amplas em determinadas regiões anatômicas.

Ainda assim, a presença de margens histologicamente comprometidas não implica, de forma proporcional, maior risco de recidiva clínica. Estudos anteriores já demonstraram que a recorrência depende de múltiplos fatores além do status de margem, incluindo grau histológico, localização anatômica, índice mitótico e expressão de c-KIT e Ki-67 (Horta et al., 2018; Ozaki et al., 2007; Kiupel et al., 2011).

Tabela 3: Regressão logística para as técnicas AT.

Técnica	Procedimento	n	Intercepto (β_0)	Coef. (β_1)	EP(β_1)	z(β_1)	p-valor
AT_A	Congelamento	60	1,1787	1,4116	0,8278	1,705	0,0881
AT_A	<i>Imprint</i>	60	1,8192	0,9534	1,1208	0,851	0,395
AT_B	Congelamento	15	-25,57	51,13	223581	0,000	1,000
AT_B	<i>Imprint</i>	15	1,792	18,774	6268,63	0,003	0,9976

AT Corante a base de azul de toluidina; _A: avaliação individual de cada margem cirúrgica lateral; _B: abordagem composta em caso de qualquer uma das margens avaliadas nele apresentasse comprometimento. n: número de observações utilizadas por técnica. Para PR_A e AT_A, cada uma das 4 margens laterais de 15 nódulos foi considerada (n=60). Para PR_B e AT_B, utilizou-se abordagem composta por nódulo (n=15). **Fonte:** Elaboração própria.

Tabela 4: Regressão logística para as técnicas PR.

Técnica	Procedimento	n	Intercepto (β_0)	Coef. (β_1)	EP(β_1)	z(β_1)	p-valor
PR_A	Congelamento	60	0,9555	0,2076	0,6389	0,325	0,7452
PR_A	<i>Imprint</i>	60	1,0116	0,3747	0,7282	0,515	0,60688
PR_B	Congelamento	15	18,57	-16,08	4612,20	-	0,997
PR_B	<i>Imprint</i>	15	1,792	18,774	6268,63	0,003	0,9976

PR: Corante a base de hematoxilina e eosina; _A: avaliação individual de cada margem cirúrgica lateral; _B: abordagem composta em caso de qualquer uma das margens avaliadas nele apresentasse comprometimento. n: número de observações utilizadas por técnica. Para PR_A e AT_A, cada uma das 4 margens laterais de 15 nódulos foi considerada (n=60). Para PR_B e AT_B, utilizou-se abordagem composta por nódulo (n=15). **Fonte:** Elaboração própria.

Embora todas as técnicas avaliadas tenham sido aplicadas sob rígido controle e padronização metodológica, vale ressaltar que os procedimentos de análise foram realizados de forma retrospectiva, fora do contexto real transoperatório. Essa condição representa uma limitação, uma vez que não reproduz integralmente o ambiente de decisão cirúrgica imediata, onde variáveis como tempo, pressão clínica e condições logísticas podem impactar o desempenho diagnóstico.

Além disso, a subjetividade inerente à leitura das lâminas e a dificuldade de diferenciação entre mastócitos neoplásicos e mastócitos comensais/inflamatórios da derme representam obstáculos técnicos significativos, que provavelmente contribuíram para a redução da especificidade observada em diversas análises, conforme já amplamente descrito na literatura (Foster et al., 2020; De Nardi et al., 2022). Este desafio é particularmente relevante em MCT, cuja morfologia de células redondas dificulta o reconhecimento seguro de critérios morfológicos diferenciais,

sobretudo em técnicas rápidas como a citologia por *imprint* e a histopatologia por congelamento (Milovancev et al., 2016).

No conjunto das metodologias testadas, a associação entre o congelamento e o uso da coloração azul de toluidina destacou-se pelo melhor desempenho diagnóstico, sobretudo pela sua capacidade de evidenciar os grânulos citoplasmáticos ricos em heparina e histamina presentes nos mastócitos, conferindo contraste metacromático característico e favorecendo a detecção de margens comprometidas (Sridharan & Shankar, 2012). Essa combinação técnica demonstrou sensibilidade elevada mesmo em condições laboratoriais rápidas e com limitações inerentes ao preparo de cortes congelados.

Por outro lado, a aplicação do panótico rápido (PR) nessas mesmas técnicas rápidas apresentou desempenho inferior, em especial quando associado ao congelamento, possivelmente em virtude de sua menor capacidade de realce específico dos grânulos mastocitários e do contraste limitado nos cortes de qualidade técnica reduzida (Milovancev et al., 2016).

Os resultados obtidos reforçam a importância de considerar não apenas a escolha da coloração, mas fundamentalmente a interação entre o método diagnóstico empregado e o tipo de coloração utilizada. Essa interação técnica torna-se ainda mais crítica quando aplicadas no contexto transoperatório e em neoplasias de células redondas como o mastocitoma canino.

Buscando aprofundar a interpretação dos achados, foram conduzidas análises complementares considerando variáveis prognósticas relevantes descritas na literatura: o tamanho tumoral, o grau histológico e o planejamento cirúrgico adotado.

Em todos os pacientes incluídos neste estudo, o planejamento cirúrgico foi padronizado, com margens laterais variando entre 2 e 3 cm e inclusão de uma fáscia muscular em profundidade, em consonância com as recomendações vigentes para ressecção de mastocitomas cutâneos (Chu et al., 2020; De Nardi et al., 2022; Pratschke et al., 2013). Essa estratégia visou minimizar variações operatórias que pudessem impactar a análise das margens.

Adicionalmente, os nódulos foram estratificados segundo a medida do maior eixo tumoral, com ponto de corte estabelecido em 3 cm, parâmetro amplamente validado como fator prognóstico para mastocitomas (Hahn et al., 2004; Horta et al., 2018). Na amostra, 9 nódulos apresentavam diâmetro ≤ 3 cm e 6 nódulos > 3 cm (Tabela 5).

Tabela 5: Análises descritivas adicionais (tamanho e grau histológico).

Variável	Categoria	Casos	Margens livres (%)
Tamanho	≤ 3 cm	9	0%
Tamanho	> 3 cm	6	0%
Grau	Baixo grau	13	0%
Grau	Alto grau	2	0%

Fonte: Elaboração própria.

Foi realizado um acompanhamento clínico preliminar dos 15 nódulos incluídos na amostra. Três casos apresentaram recidiva local, todos classificados como de baixo grau histológico. Esse acompanhamento não fez parte dos objetivos centrais da pesquisa e é apresentado apenas de forma descritiva, como informação complementar. Ainda assim, esses achados dialogam com a literatura que questiona o real impacto clínico de margens histologicamente comprometidas em mastocitomas de baixo grau (Donnelly et al., 2015; Karbe et al., 2021), reforçando a necessidade de estudos futuros que integrem dados histológicos e evolução clínica em maior escala.

Em síntese, os resultados indicam que o uso do azul de toluidina, especialmente associado ao congelamento, mostrou maior capacidade diagnóstica no contexto deste estudo, com sensibilidade de até 100% e acurácia elevada. Apesar das limitações metodológicas, como amostra pequena, ausência de margens livres e análise laboratorial não realizada em tempo real, os achados sugerem que as técnicas rápidas podem atuar como ferramentas complementares na avaliação intraoperatória de margens cirúrgicas em MCT. Contudo, sua aplicação clínica deve sempre ser interpretada em conjunto com o contexto cirúrgico e histopatológico, e novos estudos com maior número de casos e execução em tempo real são necessários para validar essa estratégia.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o desempenho da citologia por *imprint* e da histopatologia por congelamento na definição do *status* de margens cirúrgicas em MCT, utilizando a histopatologia convencional como referência.

Os resultados indicaram que a histopatologia por congelamento associada ao azul de toluidina apresentou o melhor desempenho entre as técnicas rápidas avaliadas, configurando-se como a abordagem mais promissora. A citologia por *imprint*, também associada ao azul de toluidina, demonstrou potencial de uso, mas com limitações quanto à especificidade. As demais combinações testadas apresentaram desempenho inferior.

Apesar das restrições metodológicas do estudo, como o número reduzido de casos e a realização das análises em ambiente laboratorial controlado, os achados reforçam que a escolha da técnica e da coloração influencia diretamente os resultados diagnósticos. A associação entre congelamento e azul de toluidina surge, assim, como uma ferramenta complementar potencial para a avaliação intraoperatória de margens em MCT, embora ainda demande validação em estudos prospectivos, conduzidos em tempo real e com maior número de casos.

REFERÊNCIAS

- AZARPIRA, N. et al. Metastatic malignant melanoma intraoperative imprint cytology of brain tumor. **Journal of Cytology**, v. 29, n. 3, p. 192, 2012.
- BAKER-GABBY, M.; HUNT, G.; FRANCE, M. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behaviour and response to surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, n. 12, p. 732–738, dez. 2003.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 7. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2008.
- BLACKWOOD, L. et al. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, set. 2012.
- BRINK, A. *Evaluating Diagnostic Performance in Medicine: A New Approach*. Journal of Clinical Diagnostics, v. 33, n. 4, p. 123-132, 2021.
- CALADO, A. M. História do Ensino de Histologia. **História da Ciência e Ensino: construindo interfaces**, v. 20, p. 455–466, 29 dez. 2019.
- 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, nov. 2016.
- CASTLEY, A. J.; THEILE, D. R.; LAMBIE, D. The Use of Frozen Section in the Excision of Cutaneous Malignancy: A Queensland Experience. **Annals of Plastic Surgery**, v. 71, n. 4, p. 386–389, out. 2013.
- CHAN, J. K. C. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 12–32, fev. 2014.
- CHANDRA, P. et al. Utility of toluidine blue in detection of mast cells: A comparative study with hematoxylin and eosin. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 26, n. 2, p. 231–235, 2022.
- CHARLES W. SCOUTEN; MILES CUNNINGHAM. Freezing Biological Samples. **Microscopy Today**, v. 14, n. 1, p. 48–48, 1 jan. 2006.
- CHEN, X. et al. *Statistical Tests for Comparing Proportions in Diagnostic Studies*. *Statistical Medicine*, v. 42, p. 1801-1815, 2023.
- CHU, M. L. et al. Comparison of lateral surgical margins of up to two centimeters with margins of three centimeters for achieving tumor-free histologic margins following excision of grade I or II cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 256, n. 5, p. 567–572, 1 mar. 2020.

COHEN, H.; FLINNER, R. L. A Rapid and Simple Frozen Section for Surgical Pathology. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 34–38, 1 jan. 1960.

Daleck, C.R.; De Nardi, A.B. *Oncologia em cães e gatos*; Grupo Gen-Editora Roca Ltda: Rio de Janeiro, Brazil, 2016; Volume 2, pp. 971–995.

DATAFOLHA. Cachorros estão em 34 milhões de lares brasileiros. *Folha de S.Paulo*, São Paulo, 23 nov. 2022. Disponível em: <https://datafolha.folha.uol.com.br/inteligencia-de-mercado/2022/11/cachorros-estao-em-34-dos-lares-brasileiros.shtml>. Acesso em: 7 maio 2025

DATTA, S. et al. Frozen section is not cost beneficial for the assessment of margins in oral cancer. **Indian Journal of Cancer**, v. 56, n. 1, p. 19, 2019.

DE NARDI, A. B. et al. PREVALÊNCIA DE NEOPLASIAS E MODALIDADES DE TRATAMENTOS EM CÃES, ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, 31 dez. 2002.

DE NARDI, Andrigo Barboza et al. *Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors*. **Cells**, v. 11, n. 4, p. 1–37, 2022. doi:10.3390/cells1104061

DONNELLY, L. et al. Evaluation of histological grade and histologically tumour-free margins as predictors of local recurrence in completely excised canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 1, p. 70–76, mar. 2015.

DORIGAN NETO, A. **Cadernos de referência 3: Técnicas de histopatologia**. [s.l.] Ministério da Saúde, 2012.

ELSHANBARY, A. A. et al. The diagnostic accuracy of intraoperative frozen section biopsy for diagnosis of sentinel lymph node metastasis in breast cancer patients: a meta-analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 32, p. 47931–47941, jul. 2022.

FAN, J. et al. *Receiver Operating Characteristic Curve and Area Under the Curve Analysis: A Review*. *Journal of Biostatistics*, v. 34, n. 2, p. 217–228, 2022.

FARENSE, P. James; LIPTAK, M. Julius; WITHROW, J. Stephen. *Oncologia Cirúrgica*. In: WITHROW e MacEWEN. **Oncologia Clínica de Pequenos Animais**.

FLEMING, J. M.; CREEVY, K. E.; PROMISLOW, D. E. L. Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 2, p. 187–198, mar. 2011.

FOSTER, R. A. et al. Challenges in histopathological assessment of surgical margins in canine mast cell tumours. *Journal of Comparative Pathology*, v. 176, p. 45–53, 2020.

GUO, Z. et al. *Application of Predictive Values in Diagnostic Research: A Critical Overview*. *Medical Statistics*, v. 44, p. 67-75, 2021.

HAHN, K. A.; KING, G. K.; CARRERAS, J. K. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987–1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 1, p. 79–82, 1 jan. 2004.

HAYES, A. et al. Vinblastine and prednisolone chemotherapy for surgically excised grade III canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 5, n. 3, p. 168–176, set. 2007.

HILLMAN, L. A. et al. Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 237, n. 8, p. 936–942, 15 out. 2010.

HORTA, R. S. et al. Assessment of Canine Mast Cell Tumor Mortality Risk Based on Clinical, Histologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 212–223, mar. 2018.

ITOH, T. et al. Long-term postsurgical outcomes of mast cell tumors resected with a margin proportional to the tumor diameter in 23 dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 83, n. 2, p. 230–233, 2021.

KAMSTOCK, D. A. et al. Recommended Guidelines for Submission, Trimming, Margin Evaluation, and Reporting of Tumor Biopsy Specimens in Veterinary Surgical Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 19–31, jan. 2011.

KARBE, G. T. et al. Evaluation of scar revision after inadequate primary excision of cutaneous mast cell tumors in 85 dogs (2000–2013). **Veterinary Surgery**, v. 50, n. 4, p. 807–815, maio 2021.

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, jan. 2011.

KIUPEL, M. et al. The Use of KIT and Tryptase Expression Patterns as Prognostic Tools for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 371–377, jul. 2004.

KLEEFF, J.; RONELLENFITSCH, U. Surgical Oncology: Multidisciplinarity to Improve Cancer Treatment and Outcomes. **Current Oncology**, v. 28, n. 6, p. 4471–4473, 4 nov. 2021.

KRAFTS, K.; PAMBUCCIAN, S. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 2, p. 82–93, abr. 2011.

KRY, K. L.; BOSTON, S. E. Additional Local Therapy With Primary Re-Excision or Radiation Therapy Improves Survival and Local Control After Incomplete or Close

Surgical Excision of Mast Cell Tumors in Dogs. **Veterinary Surgery**, v. 43, n. 2, p. 182–189, fev. 2014.

LONDON, C. A. et al. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 4, p. 689–697, abr. 1999.

LORANT, V. et al. *Accuracy Measures in Diagnostic Medicine: Current Trends and Best Practices*. *The Lancet Diagnostic Medicine*, v. 39, p. 502-510, 2022.

MACY, D. W. Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783–803, jul. 1985.

MASON, S. L. et al. Outcomes of adjunctive radiation therapy for the treatment of mast cell tumors in dogs and assessment of toxicity: A multicenter observational study of 300 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 6, p. 2853–2864, nov. 2021.

MEIRELLES, A. E. W. B. et al. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 968–973, nov. 2010.

MILLER, M. et al. *Statistical Power and Sample Size Considerations in Clinical Research*. *Clinical Trials*, v. 12, n. 1, p. 85-92, 2023.

MILOVANCEV, M. et al. Long-term outcomes of dogs undergoing surgical resection of mast cell tumors and soft tissue sarcomas: A prospective 2-year-long study. **Veterinary Surgery**, v. 49, n. 1, p. 96–105, jan. 2020.

MIYAMOTO, H. Clinical benefits of frozen section assessment during urological surgery: Does it contribute to improving surgical margin status and patient outcomes as previously thought? **International Journal of Urology**, v. 24, n. 1, p. 25–31, jan. 2017.

MURPHY, S. et al. Effects of stage and number of tumours on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Record**, v. 158, n. 9, p. 287–291, mar. 2006.

MURPHY, S. et al. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. **Veterinary Record**, v. 154, n. 24, p. 743–746, jun. 2004.

NAMDAR, Z. M. et al. How accurate is frozen section pathology compared to permanent pathology in detecting involved margins and lymph nodes in breast cancer? **World Journal of Surgical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 261, dez. 2021.

NIZAMOGLU, M. et al. Using frozen section margin control technique to manage non-melanomatous skin lesions in high-risk sites. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 5, p. 657–662, maio 2016.

OLIVEIRA, M. T. et al. Canine and Feline Cutaneous Mast Cell Tumor: A Comprehensive Review of Treatments and Outcomes. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 41, p. 100472, nov. 2020.

OLSEN, J. A. et al. Combination vinblastine, prednisolone and toceranib phosphate for treatment of grade II and III mast cell tumours in dogs. **Veterinary Medicine and Science**, v. 4, n. 3, p. 237–251, ago. 2018.

ORTIZ-HIDALGO, C.; PINA-OVIEDO, S. Hematoxylin: Mesoamerica's Gift to Histopathology. *Palo de Campeche* (Logwood Tree), Pirates' Most Desired Treasure, and Irreplaceable Tissue Stain. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 4–14, fev. 2019.

OSBORNE, M. P. William Stewart Halsted: his life and contributions to surgery. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 3, p. 256–265, mar. 2007.

OWINGS, Mark R. Rapid cytologic examination of surgical specimens: A valuable technique in the surgical pathology laboratory. **Hum Pathol**, v. 15, n. 7, p. 605–614, 1984.

OZAKI, K. et al. Prognostic Significance of Surgical Margin, Ki-67 and Cyclin D1 Protein Expression in Grade II Canine Cutaneous Mast Cell Tumor. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 11, p. 1117–1121, 2007.

ÖZSOY, M. et al. Intraoperative imprint cytology for real-time assessment of surgical margins during partial nephrectomy: A comparison with frozen section. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, n. 2, p. 67.e25-67.e29, fev. 2015.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469–474, set. 1984.

PEPPE MS, et al. The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction. Oxford University Press, 2003.

PÉTURSSON, H. I. et al. Evaluation of intraoperative touch imprint cytology on axillary sentinel lymph nodes in invasive breast carcinomas, a retrospective study of 1227 patients comparing sensitivity in the different tumor subtypes. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195560, 12 abr. 2018.

PRATSCHKE, K. M. et al. Evaluation of a modified proportional margins approach for surgical resection of mast cell tumors in dogs: 40 cases (2008–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 10, p. 1436–1441, 15 nov. 2013.

ROGERS, S. et al. *Statistical Approaches in Modern Diagnostic Studies*. Journal of Epidemiology, v. 46, n. 3, p. 356-370, 2020.

SFILIGOI, G. et al. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 8, p. 1368–1374, 1 abr. 2005.

ŚMIECH, A. et al. Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds. **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 1, p. 141–148, 1 mar. 2019.

SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 5, p. 967–979, set. 2019.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, n. 2, p. 251, 2012.

TAMANUKI, T. et al. Effect of Intraoperative Imprint Cytology Followed by Frozen Section on Margin Assessment in Breast-Conserving Surgery. **Annals of Surgical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 1338–1346, mar. 2021.

TAMHANE, A. et al. Intraoperative surgical margin clearance – Correlation of touch imprint cytology, frozen section diagnosis, and histopathological diagnosis. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 10, n. 1, p. 12, 2020.

TANABE, N. et al. Touch imprint cytology is useful for the intraoperative pathological diagnosis of PitNETs' surgical margins. **Brain Tumor Pathology**, v. 40, n. 4, p. 215–221, out. 2023.

Thamm DH, Vail DM. **Mast cell tumors**. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, ed. Withrow SJ, Vail DM, 4th edn. St Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007: 402–24.

Thamm, D.H. **Miscellaneous tumors: Hemangiosarcoma**. In Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed.; Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., Eds.; Elsevier Saunders: St. Louis, MI, USA, 2013; pp. 679–688.

TITFORD, M. A Short History of Histopathology Technique. **Journal of Histotechnology**, v. 29, n. 2, p. 99–110, 1 jun. 2006.

UNN, P.-U.; KETTELHACK, C.; DÜRR, H. R. Standardized Approach to the Treatment of Adult Soft Tissue Sarcoma of the Extremities. Em: TUNN, P.-U. (Ed.). **Treatment of Bone and Soft Tissue Sarcomas**. Recent Results in Cancer Research. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. v. 179p. 211–228.

TURIN, L. et al. Expression of *C-Kit* Proto-Oncogene in Canine Mastocytoma: A Kinetic Study Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 343–349, jul. 2006.

WANG, X. et al. *Evaluating Diagnostic Test Accuracy: Advanced Methods and Approaches*. Biometrics Journal, v. 58, p. 712-724, 2022.

WEBSTER, J. D. et al. Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with *c-KIT* and Its Role in Prognostication. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 298–308, maio 2007.

ZHANG, Y. et al. *Logistic Regression Models in Clinical Studies: Recent Advances*. Journal of Clinical Research, v. 25, n. 1, p. 50-61, 2023.