



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DESCRIPCIÓN DE REGIONES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES EN LA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA DEL PERRO**

WLADIMIR OYARCE ULLOA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: RAQUEL CEPEDA CANALES

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DESCRIPCIÓN DE REGIONES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES EN LA HIPERPLASIA PROSTÁTICA
BENIGNA DEL PERRO**

WLADIMIR OYARCE ULLOA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RAQUEL CEPEDA CANALES
PROFESOR CONSEJERO : HÉCTOR ADARMES AHUMADA
PROFESOR CONSEJERO : ESTEFANIA FLORES PAVEZ

SANTIAGO, CHILE
2010

INDICE

INDICE.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	6
1.- La Próstata Canina.....	6
2.- Desordenes Prostáticos.....	8
3.- Hiperplasia Prostática Benigna.....	8
4.- Diagnóstico de la Enfermedad Prostática.....	9
5.- Regiones Organizadoras Nucleolares Argirófilicas (AgNOR).....	10
6.- AgNOR en Próstata.....	13
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODO.....	16
RESULTADOS.....	18
1.- Descripción Histológica de la Próstata Canina.....	18
2.- Morfometría con Análisis de Varianza.....	24
a) Área de puntos AgNOR en la próstata canina.....	24
b) Área de puntos AgNOR en la próstata canina por zona.....	25
c) Área Mallory-Heidenhain en la próstata canina.....	26
d) Área Mallory-Heidenhain en la próstata canina por zona.....	27
3.- Número de Puntos AgNOR con Análisis de Varianza.....	28
a) Número de puntos AgNOR en la próstata canina.....	28
b) Número de puntos AgNOR en la próstata canina por zona.....	29

DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	39
Anexo 1: Técnica Mallory-Heidenhain.....	39
Anexo 2: Técnica AgNOR.....	40
Anexo 3: Análisis de Varianza.....	41
Anexo 3.1) En morfometría.....	41
Anexo 3.2) En Número de puntos AgNOR.....	43

RESUMEN

En este estudio, se realizó una descripción histológica de la hiperplasia prostática benigna (HPB) del canino, en tres zonas (cefálica, media y caudal), a través de la detección de proteínas argirófilas nucleolares (AgNORs). Además se realizó la técnica Mallory-Heidenhain (M-H), para identificar el estroma prostático.

La técnica AgNOR reveló diferencias estadísticamente significativas entre próstatas normales y próstatas con HPB, indicando que el aumento de proteínas argirofilas está asociado al mayor grado de proliferación celular que muestra el tejido hiperplásico. A su vez, la técnica M-H, mostró una disminución significativa del estroma prostático en la HPB, en relación al tejido conectivo de las próstatas controles. Las técnicas aplicadas no mostraron diferencias entre los tres sectores de la próstata estudiados, sugiriendo la homogeneidad del tejido prostático.

La utilización de la técnica AgNOR debe ser considerada como una prueba complementaria al diagnóstico histopatológico.

ABSTRACT

In this study, it was realized a histological description of the benign prostate hyperplasia (BPH) of the canine, in three zones (cephalic, media and caudal) by the detection of nucleolar argyrophilic proteins (AgNORs). Besides, the Mallory-Heidenhain (M-H) technique was performed to identify the prostate stroma.

The AgNOR technique reveals statistically significant differences between normal prostates and prostates with HPB, indicating that the increase of argyrophilic proteins it's associated with the major degree of cellular proliferation that shows the HPB tissue. In turn, the M-H technique showed a significant decrease of the HPB stroma in relation to the connective tissue of the control prostates. Both techniques did not show differences in the three prostate zones studied, suggesting the homogeneity of the prostate tissue.

The use of the AgNOR technique should be considered complementary tests to histopathologic diagnosis.

INTRODUCCION

Las Regiones Organizadoras Nucleolares (NOR) son asas de DNA que se encuentran asociadas íntimamente a un conjunto de nucleoproteínas ácidas específicas, que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica, denominándose entonces Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (AgNOR). Aunque la función exacta de las proteínas NORs es incierta, se ha demostrado su relación con la proliferación celular y se ha sugerido que el número de AgNORs en un núcleo en interfase, puede reflejar el estado de activación y el grado de transformación maligna de ciertos tejidos, así mismo los AgNORs reflejan el grado de proliferación y diferenciación celular.

La técnica AgNOR como herramienta diagnóstica en la evaluación de lesiones malignas, premalignas o benignas, ha sido utilizada ampliamente en medicina humana con resultados interesantes. En medicina veterinaria y en particular en las patologías del perro, se han hecho distintos estudios con respecto a tumores mamarios, tumor venéreo transmisible, linfomas, tumores en piel, entre otros, pero no se ha estudiado la patología prostática por medio de esta herramienta tanto como se ha estudiado en el humano. La importancia de aplicar esta técnica en la hiperplasia prostática benigna del canino, radica en poder contar con una herramienta de apoyo al diagnóstico, considerando que esta es la patología prostática más común, por lo general subdiagnosticada y que actúa como factor predisponente para la aparición de patologías prostáticas más graves.

REVISION BIBLIOGRAFICA

La próstata canina.

La próstata es la mayor y única glándula sexual accesoria en el macho canino. Se encuentra localizada caudal a la vejiga, en el área entre el cuello vesical y el inicio de la uretra intrapélvica. Es considerada un órgano retroperitoneal, excepto en su superficie cráneo–dorsal donde sí es envuelta por peritoneo y al igual que en el hombre, comúnmente desarrolla enfermedades espontáneas a partir de la tercera etapa de vida del individuo (Tello *et al.*, 1995).

Esta glándula es una estructura bilobulada con un surco medio palpable, la cual rodea completamente la uretra intrapélvica a la altura del colículo seminal, y sus conductos penetran la uretra a lo largo de toda su circunferencia (Dragonetti *et al.*, 2005). Presenta un componente glandular o parénquima y otro no glandular o estroma. El parénquima, que corresponde a la mayor parte de la glándula, tiene tres zonas bien definidas: central, transicional y periférica (McNeal, 1988). El componente no glandular está compuesto por el esfínter periprostático, estroma fibromuscular y la cápsula. La próstata del perro se caracteriza, al igual que la del hombre, por ser una estructura dual, comprendida por un cuerpo compacto (*corpus prostatae*) y una región diseminada o difusa (*pars disseminata prostatae*) (García *et al.*, 2000).

Histológicamente, la próstata se clasifica como una glándula exocrina túbulo-alveolar compuesta, según la morfología del adenómero y la complejidad de los conductos excretores. La cápsula que rodea la glándula, esta compuesta por tejido conectivo denso que contiene fibras musculares lisas y estriadas del músculo bulbo uretral y emite tabiques que dividen al parénquima en lobulillos. El epitelio de tipo secretor es cilíndrico o cúbico simple con un núcleo ovalado central, un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado,

un aparato de Golgi supranuclear y abundantes vesículas de secreción con contenido rico en fosfatasa ácida (Dellmann, 1994). En lumen glandular se pueden encontrar concreciones laminares concéntricas llamados cuerpos amiláceos que reaccionan con el yodo (Barsanti, 2008).

La próstata secreta un líquido alcalino claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, una enzima coagulante y una profibrinolisisina. Durante la eyaculación, la cápsula se contrae de manera simultánea con las contracciones del conducto deferente, de manera que el fluido prostático se une al semen. La característica alcalina esencial del líquido prostático es muy importante para la fertilización del óvulo, pues el líquido del conducto deferente es relativamente ácido debido a la presencia de productos terminales del metabolismo de los espermatozoides, y en consecuencia, inhibe la fertilidad de éstos. El espermatozoide, logra su mejor motilidad cuando el pH del medio se eleva hasta 6 – 6.5, en consecuencia, el fluido prostático neutralizaría la acidez de las demás secreciones luego del eyaculado aumentando, considerablemente la motilidad y fertilidad de los espermatozoides (Tello *et al.*, 1995).

Normalmente, la próstata posee una serie de mecanismos de defensa, tales como: la secreción del factor antibacteriano prostático, la presencia de la bicapa lipídica del epitelio prostático, el lavado uretral mecánico que se produce durante la micción, la peristalsis uretral y las propiedades de atrapar bacterias que tiene la superficie de la mucosa uretral (Dragonetti *et al.*, 2005).

Desórdenes prostáticos.

La enfermedad prostática se observa con frecuencia en perros adultos, raramente en animales menores a 4 años de edad. Afecta a todas las razas, aunque se ha visto una mayor prevalencia en las más grandes. Las patologías más frecuentes son: hiperplasia prostática benigna, prostatitis, abscesos, quistes prostáticos y paraprostáticos y cáncer prostático donde el más frecuente es el adenocarcinoma (David y Mondragón 2003).

La signología que presentan estos perros son las típicas del tracto urinario bajo (poliaquiuria, disuria, hematuria) y/o signología del digestivo bajo (tenesmos, constipación, hematoquesia) y además, descargas uretrales hemorrágicas o purulentas. Algunos perros presentan dificultad al caminar producto de alteraciones en los nódulos linfáticos lumbares y en los reproductores es común ver hemospermia, descenso de la libido y de infertilidad en general (Wallace, 2001).

Hiperplasia prostática benigna.

La hiperplasia prostática benigna se presenta en perros adultos enteros y es la patología más frecuente que afecta a esta glándula, pudiendo llegar su incidencia por sobre un 80% en edades avanzadas (mayores de 10 años), pero sólo un pequeño número de pacientes presentan síntomas relacionados con aumento de volumen (Dragonetti *et al.*, 2005). Se ha descrito que la hematuria es el signo más común dada la alta vascularización de la próstata con HPB (Barsanti, 2008).

A medida que avanza la edad del perro, el parénquima prostático comienza a desarrollar un incremento en el número de células epiteliales (hiperplasia), así como un incremento en el tamaño celular (hipertrofia), siendo la hiperplasia celular el evento predominante. Además, la hiperplasia en el canino, afecta en mayor medida a las células

epiteliales, mientras que en humanos el proceso afecta con mayor frecuencia al estroma de la glándula (Paclikova *et al.*, 2006).

En el parénquima se pueden desarrollar quistes asociados con la hiperplasia, los cuales son variables en tamaño y contenido (Romagnoli, 2007). Estos quistes se pueden presentar en toda la glándula, pero son más numerosos en el área peri-uretral (Lobetti, 2007).

La testosterona secretada por los testículos es transformada en las células epiteliales de la próstata en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5-alfa reductasa. La DHT regula el crecimiento de la glándula al unirse a los receptores que se encuentran en la próstata. Con la edad, el número de receptores para la DHT parece incrementarse, al igual que la testosterona que se transforma en DHT; también se produce un desequilibrio en la relación andrógenos-estrógenos, lo que influye en el número y la sensibilidad de los receptores de la DHT. El resultado de esta alteración hormonal, aun no bien comprendida se manifiesta en una hiperplasia e hipertrofia de la glándula (Wallace, 2001).

El ambiente anormal, tanto hormonal como morfológico que presenta la HPB, podría actuar como factor de riesgo para la aparición de otras patologías (Romagnoli, 2007).

Diagnóstico de la enfermedad prostática.

Para evaluar las enfermedades prostáticas se pueden aplicar variados métodos como: la palpación rectal y abdominal, la visualización usando planos radiográficos, la cistouretrografía retrógrada de contraste, el ultrasonido, la cintilografía, el examen citológico de fluido prostático y tejido aspirado, las pruebas de cultivo y sensibilidad bacteriana y el examen histológico de tejido biopsiado (Lobetti, 2007).

El antígeno prostático específico (APE), es una glicoproteína de cadena simple (33-kDa), producida en forma casi exclusiva por el epitelio prostático (Van Cauwelaert y

Azocar, 1999). El APE y la fosfatasa ácida (AcP), son pruebas químicas útiles como complemento en el diagnóstico del cáncer prostático y para valorar la respuesta al tratamiento de este. El APE es útil para humanos, sin embargo, éste no se ha detectado en el suero o el plasma seminal del canino, en tanto que la actividad de AcP no ha mostrado diferencias significativas entre perros normales y aquellos con patologías prostáticas, o entre distintos desórdenes prostáticos (Romagnoli, 2007). El principal producto que es secretado por la próstata canina es el CPSE (arginina esterasa específica de la próstata canina), el cual constituye más del 90% de las proteínas seminales de esta especie. Sin embargo, su exacto rol en las diferentes enfermedades prostáticas aún no se comprende del todo (Gobello *et al.*, 2002).

En un intento de determinar mejor el pronóstico y tener un diagnóstico más preciso y certero de las distintas patologías tumorales, se han estudiado otros factores relacionados con la biología tumoral y su posible relación con el comportamiento evolutivo de la enfermedad. Entre estos, en la última década se han descrito varios antígenos que actúan como marcadores de distintas fases del ciclo celular como son el PCNA, Ki67 y AgNOR (Lohr *et al.*, 1997).

Regiones organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNORs)

El núcleo almacena la información genética y es el centro de control celular. En su interior ocurre la replicación del ADN, la transcripción y el procesamiento del ARN (Cooper, 2002). En las células eucarióticas la cromatina es una región de ADN asociada a proteínas, la mayoría de ellas básicas y pequeñas llamadas histonas. Otras proteínas no histónicas están asociadas a cromosomas, regulando la transcripción, replicación, reparación y recombinación del ADN celular (Watson *et al.*, 2004).

La subestructura que más destaca en el núcleo es el nucleolo, que es el sitio donde ocurre la transcripción y el procesamiento del ARN ribosomal (ARNr), y por último el

ensamblaje de los ribosomas. El tamaño del nucleolo depende de la actividad metabólica de la célula, siendo los nucleolos más grandes en aquellas células donde la síntesis de proteínas es mayor. Después de la división celular, los nucleolos se forman alrededor de las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARNr 5, 8S, 18S y 28S, por lo que se denominan regiones organizadoras nucleolares (NOR)(Cooper, 2002).

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR), son asas de ADN localizados en los tallos de los satélites de los cromosomas acrocéntricos responsables de la transcripción del ARN ribosomal (ARNr) (Palomo *et al.*, 2002). En el canino, las NORs, se ubicarían en las regiones teloméricas de los cromosomas 7, 8, 27 y 38 (Koop *et al.*, 1982). Fueron descritas primero por Heitz en 1931 y luego por McClintock en 1934 como regiones de cromatina débilmente teñidas, alrededor de las cuales, al final de la telofase, los nucleolos vuelven a formarse después de su desaparición durante la mitosis (Derenzini, 2000).

Esas regiones, se encuentran asociadas íntimamente a un conjunto de nucleoproteínas ácidas específicas no histónicas (C₂₃ y B₂₃) altamente fosforiladas, que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica, denominándose entonces regiones organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) (Palomo *et al.*, 2002). Los componentes fundamentales de los NORs, en interfase, son las proteínas AgNOR, como la nucleolina, una fosfoproteína de 105 kDa, la cual tiene un rol importante en la transcripción de ARNr y la nucleofosfamina, o proteína B 23, una fosfoproteína de 38-39 kDa la cual está comprometida en las etapas tardías de la organización de partículas pre-ribosomales. También, se han identificado como proteínas AgNOR las sub-unidades de ARN polimerasa I y UBF (*upstream binding factor*). En ausencia de proteínas AgNOR, no se produce síntesis de ARNr (Derenzini, 2000).

El número y tamaño de los NORs en interfase es muy variable dentro del nucleolo. La relación existente entre la cantidad de AgNOR en interfase y el tiempo de división celular puede explicarse considerando, que las células en proliferación tienen que producir

un complemento ribosomal para las células hijas y, mientras más corto sea el ciclo celular, existirá una mayor biogénesis ribosomal por unidad de tiempo. De esta forma, el número de AgNOR en interfase estaría estrictamente relacionado con la actividad transcripcional de ARNr (Derenzini, 2000).

Las técnicas de impregnación argéntica fueron llevadas a cabo inicialmente por Howel y Black., (1980) y por Ploton *et al.*, (1986). Posteriormente, con técnicas electroforéticas, estas proteínas se identificaron, tanto en interfase (nucleolina y proteína B23) como, en mitosis (subunidades de ARN polimerasa I y factor transcripcional UBF).

Las AgNOR, se visualizan en forma de puntos negros localizados en el núcleo y su número, localización, disposición, intensidad de tinción y morfología han demostrado, en numerosos estudios, tener relación con la actividad transcripcional de la célula y por tanto con la ploidía, así como con la actividad proliferativa tumoral (Palomo *et al.*, 2002). Diferentes parámetros de cuantificación AgNOR (número, tamaño y distribución), han sido objeto de estudio con la finalidad de discriminar entre neoplasias benignas y malignas, tanto en muestras de biopsias como citológicas (Vajdovich *et al.*, 2004).

Una definitiva estandarización de la técnica AgNOR aún no se ha establecido, debido a lo cual, los resultados de estudios de distintos autores sobre el mismo tópico son escasamente comparables. El origen de esta divergencia está relacionada con: el uso de diferentes protocolos en la aplicación de la técnica, así como el uso de distintos procedimientos en la cuantificación de la reacción argirófila (Trere, 2000)

En cuanto a la técnica de la reacción con plata, se ha observado que existen principalmente dos factores determinantes a la hora de evaluar la calidad de la reacción: *i)* el fijador usado para la conservación del tejido, *ii)* la relación inversa que se produce entre tiempo de exposición a la plata de las muestras y la temperatura a la que se realiza (Trere, 2000).

Se han propuesto dos métodos para el análisis cuantitativo de las proteínas AgNOR:

1.- El método de recuento directo de puntos argirófilos, que consiste en la enumeración de cada punto negro por célula directamente al microscopio, enfocando cuidadosamente el área de estudio con la mayor magnificación posible.

2.- El método morfométrico, consiste en la medición automática o semiautomática del área ocupada por las estructuras argirófilas dentro del núcleo celular, con la ayuda de un programa computacional.

Con respecto al método de recuento directo, el morfométrico es más rápido, preciso y objetivo. Su única limitación sería disponer del adecuado equipamiento (Trere, 2000).

AgNOR en próstata.

Esta técnica ha sido utilizada, tanto en tejidos malignos como benignos y en general, el número de AgNORs es mayor en condiciones de malignidad en comparación con tejidos benignos (Cheville *et al.*, 1990). Es así, como se han encontrado diferencias significativas entre el número de AgNOR de la hiperplasia prostática y la neoplasia intraepitelial prostática (Mukherjee *et al.*, 1997). Además, se ha sugerido que la técnica AgNOR podría entregar información acerca del comportamiento biológico del adenocarcinoma prostático (Pavlakis *et al.*, 1992) pudiendo, en algunos casos, ser indicador de la progresión, respuesta al tratamiento y pronóstico del cáncer prostático (Ohki *et al.*, 1996). Sin embargo, la falta de estandarización de la técnica, su baja reproductibilidad y discutible correlación con el pronóstico, limitan el uso del recuento AgNOR en el carcinoma prostático avanzado (Ahiskali *et al.*, 1995).

Cuando se ha detectado un aumento de volumen prostático, se debe realizar una biopsia la que permita discriminar entre diferentes patologías que producen aumento de

tamaño, como son el cáncer, hiperplasia benigna, atrofia inflamatoria e hiperplasia nodular benigna. Sin embargo, la significancia de la biopsia aún no es clara en procesos inflamatorios crónicos no específicos. La cuantificación de parámetros histológicos convencionales asociados con factores biológicos como p53 y AgNOR, ha sido estudiada como potencial herramienta útil para un diagnóstico más claro entre un proceso maligno o benigno. Algunos de estos indicadores son: macronucleolos, mucina intraluminal, cristales intraluminales, micronódulos de colágeno y relación entre volumen glandular y densidad del estroma (Silva *et al.*, 2004).

En el canino la técnica AgNOR se ha utilizado comparando la cantidad promedio de puntos AgNOR por núcleo, entre zonas con distintas alteraciones en el parénquima prostático es así, como se puede inferir que lesiones más malignas como el adenocarcinoma o la neoplasia prostática intraepitelial, poseen un mayor número de puntos AgNOR que lesiones benignas como la hiperplasia y la atrofia epitelial (Silva y Correia, 2003).

En esta memoria se estudió la actividad proliferativa, a través del método AgNOR, de próstatas con HPB en comparación con próstatas controles.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Conocer la actividad proliferativa de la próstata hiperplásica del canino, mediante la identificación de proteínas AgNOR.

Objetivos específicos:

- Describir las características histológicas de la próstata del canino.
- Detectar y cuantificar las proteínas AgNORs de la próstata del canino.
- Detectar y cuantificar el estroma de la próstata del canino.
- Comparar los valores AgNOR y de estroma de las zonas cefálica, media y caudal de la próstata canina.

MATERIAL Y MÉTODO

Se recolectaron próstatas de perros sexualmente maduros fallecidos en clínicas veterinarias y del Departamento de Patología de la Facultad. A través de diagnóstico histopatológico, se seleccionaron cinco próstatas con hiperplasia prostática benigna (HPB) y cinco próstatas normales, las que se utilizaron como controles.

La extracción de las próstatas se realizó en un plazo máximo de 24 horas postmortem, las cuales fueron conservadas en formalina al 10% hasta que fueron preparadas en el laboratorio de Técnica Histológica e Inmunohistoquímica de la Facultad.

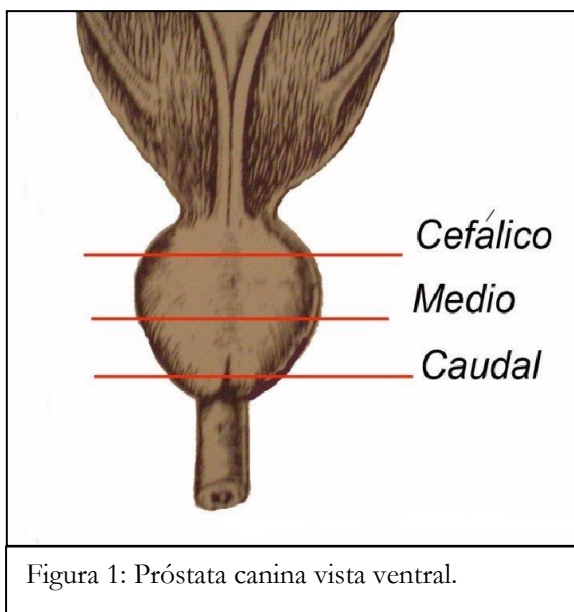


Figura 1: Próstata canina vista ventral.

Las próstatas fueron cortadas transversalmente en tres sectores: caudal, medio y cefálico (Fig. 1). Cada segmento se incluyó en paraplas de acuerdo a las técnicas convencionales (López *et al.*, 1982). Se obtuvieron cortes de 4 μ m de grosor los que fueron montados en portaobjetos albuminados y silanizados.

Los cortes albuminados se tiñeron con:

1) Hematoxilina-Eosina (H-E), para realizar el diagnóstico histopatológico y hacer la descripción histológica general de la glándula normal e hiperplásica y 2) Método Mallory-Heidenhain, para identificar colágeno I del estroma prostático (López *et al.*, 1982) (Anexo 1).

Los cortes montados en portaobjetos silanizados se usaron para: identificar las proteínas AgNOR a través del método de plata según Trere (2000). Los tiempos a utilizar fueron previamente estandarizados en el laboratorio de técnica histológica e inmunohistoquímica de la Facultad (Anexo 2).

Análisis de Resultados.

- 1.- Se realizó una descripción histológica de las próstatas con las técnicas Hematoxilina Eosina y Mallory-Heidenhain.
- 2.- Para la cuantificación de las proteínas AgNORs, se realizó un análisis morfométrico para lo cual se midió el área ocupada por los gránulos argirófilos ubicados en núcleos y nucléolos de las células epiteliales en 5 campos ópticos seleccionados, con el lente de inmersión 100X, en un microscopio Nikon Eclipse E-600 con videocámara digital incorporada (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) y conectado a un computador con software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetic, USA).
 - Además, se realizó un recuento directo de puntos AgNOR en el número total de células epiteliales por campo óptico para lo cual se utilizó el mismo microscopio y aumento.
 - Se realizó un análisis morfométrico en los cortes teñidos con la técnica Mallory-Heidenhain, para medir el área ocupada por las fibras de colágeno tipo I (estroma) en 5 campos ópticos seleccionados, con un aumento de 400X.
- 3.- Se obtuvieron microfotografías digitales y se tabularon los resultados.
- 4.- Análisis Estadístico:
 - Para comparar el área promedio entre las próstatas con HPB v/s normales, y entre los tres sectores de la próstata, se realizó un Análisis de Varianza con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA PRÓSTATA CANINA

Tejido normal: con la tinción H-E se observa como la cápsula prostática emite tabiques de estroma que dividen el parénquima en lóbulillos (**Figura 2**). El parénquima prostático está compuesto por el epitelio secretor de tipo cúbico simple y se presentan de tamaño y configuración uniformes, con núcleos redondos preferentemente en el tercio basal, citoplasma claro y bordes bien delimitados. Los nucleolos son difíciles de observar. El estroma prostático está compuesto por tejido fibromuscular (células musculares lisas y tejido conectivo denso) además de abundantes vasos sanguíneos de pequeño calibre (**Figura 3**).

La técnica Mallory-Heidenhain, revela el estroma glandular en forma de tabiques que se proyectan desde la cápsula hacia el interior del parénquima prostático, conformado por cordones de tejido conectivo de coloración azul y fibras musculares lisas (**Figura 4**). A mayor aumento se puede observar el grosor del tabique de tejido conectivo en relación al parénquima que lo rodea (**Figura 5**).

Con el método AgNOR usando el lente de inmersión, se observa la presencia de uno o dos puntos argirófilos, sólo en algunas de las células epiteliales que conforman el alvéolo glandular (**Figuras 6 y 7**).

Hiperplasia prostática benigna (HPB): se observa con la técnica H-E un aumento en la densidad del parénquima prostático dado por la hiperplasia e hipertrofia del epitelio glandular (**Figura 8**). La luz de los alvéolos se hace más estrecha producto de proyecciones digitiformes o papilares del epitelio glandular. Además se puede encontrar contenido amiláceo en el interior de los alvéolos (**Figura 9**).

Con la técnica Mallory-Heidenhain, se aprecian los tabiques de tejido conectivo de color azul, en menor proporción comparados con el tejido normal, separando un parénquima de alta densidad celular (**Figura 10**). Con un aumento mayor se observan tabiques muy delgados rodeados de un gran número de células epiteliales (**Figura 11**).

Con el método AgNOR se puede observar en todas las células epiteliales un número de dos a tres puntos AgNOR, pudiendo incluso llegar a cuatro y cinco puntos distribuidos uniformemente dentro del núcleo celular (**Figuras 12 y 13**).

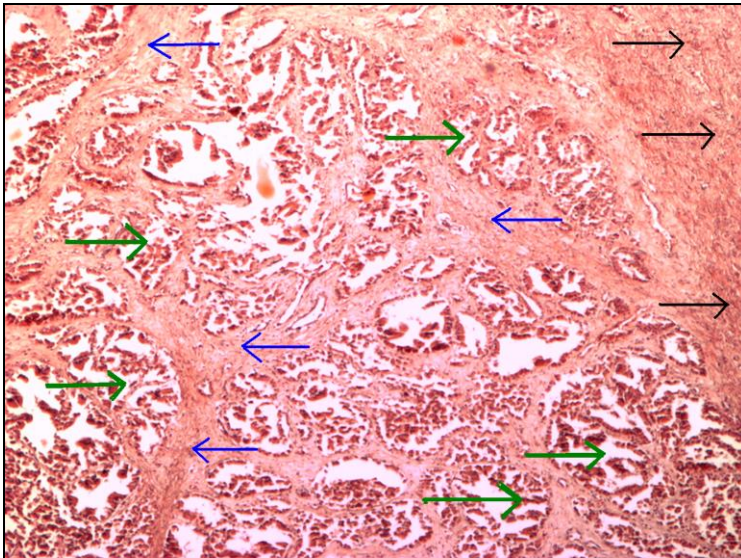


Figura 2: Próstata normal

Método HE 40X.
Cápsula prostática (flechas negras) que emite tabiques de estroma (flechas azules) que dividen el parénquima en

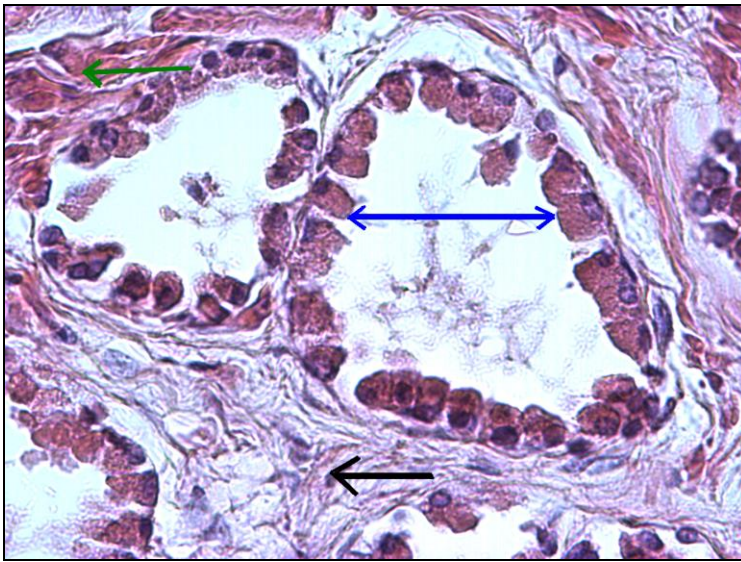


Figura 3: Próstata normal

Método HE 400X.
Alvéolo glandular (flecha azul), células mioepiteliales (flecha verde) y fibras colágenas (flecha negra).

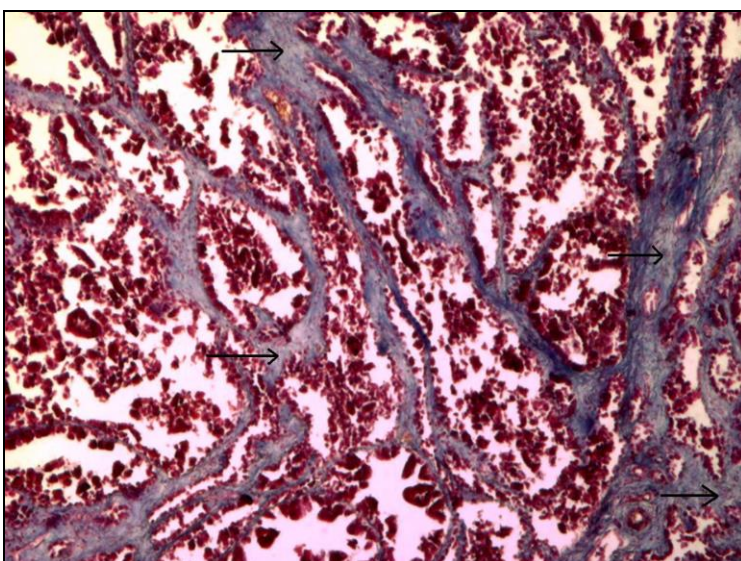


Figura 4: Próstata normal

Método M-H 40X.
Tabiques de estroma formado por fibras colágenas de coloración azul (flechas negras), que dividen el

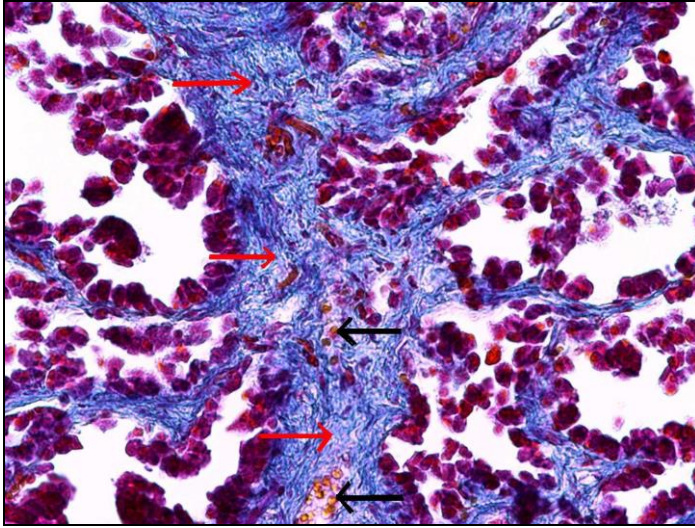


Figura 5: Próstata normal

Método M-H 200X.
 Estroma formado por fibras colágenas de coloración azul (flechas rojas) además de pequeños vasos sanguíneos (flechas negras)

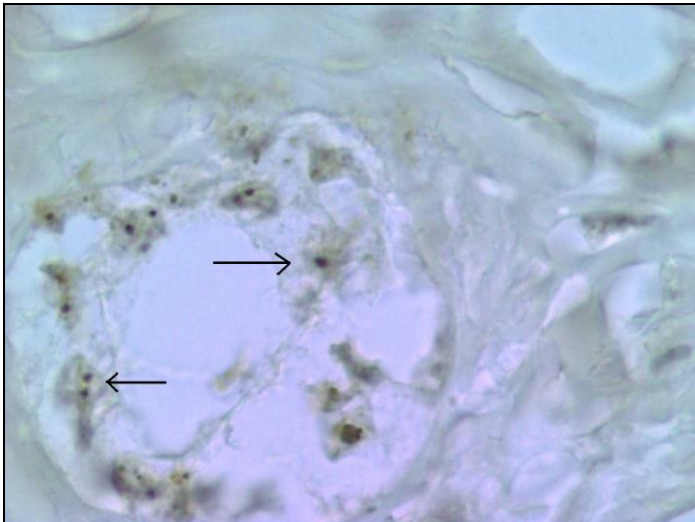


Figura 6: Próstata normal

Método AgNOR Inmersión.
 Puntos argirófilos dentro del núcleo de las células epiteliales (flechas negras).



Figura 7: Próstata normal

Método AgNOR Inmersión.
 Núcleos con 1-2 puntos argirófilos (flechas negras).

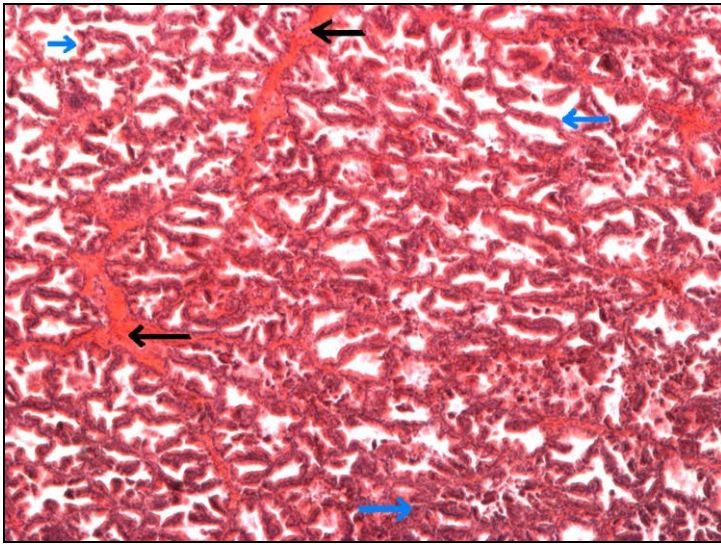


Figura 8: HPB

Método HE 40X.
Parénquima de alta densidad celular. Epitelio glandular (flechas azules), estroma prostático (flechas negras).

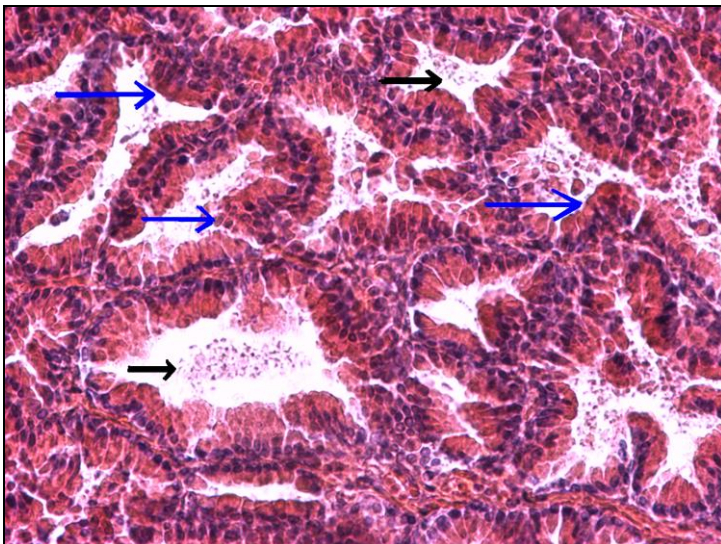


Figura 9: HPB

Método HE 200X.
Parénquima prostático en donde se aprecian las proyecciones digitiformes (flechas azules). Contenido amiláceo (flechas negras).

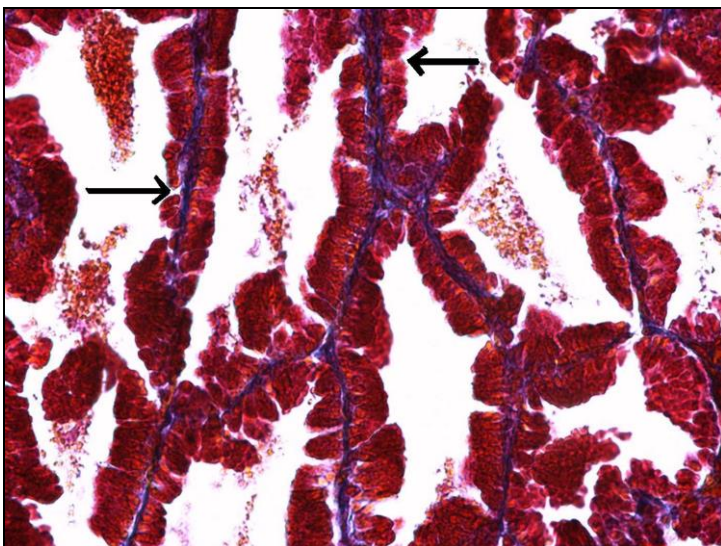


Figura 10: HPB

Método M-H 200X.
Fibras colágenas de coloración azul separando el epitelio glandular (flechas negras).

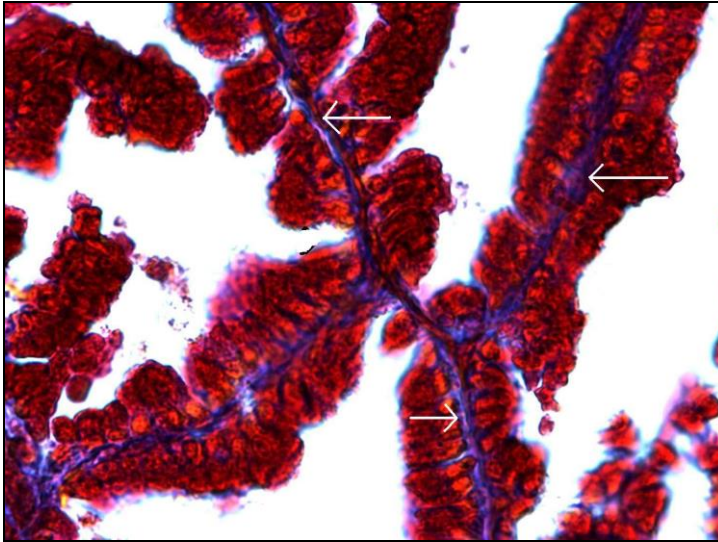


Figura 11: HPB

Método M-H 400X
Cordones de fibras colágenas
de coloración azul (flechas
blancas)

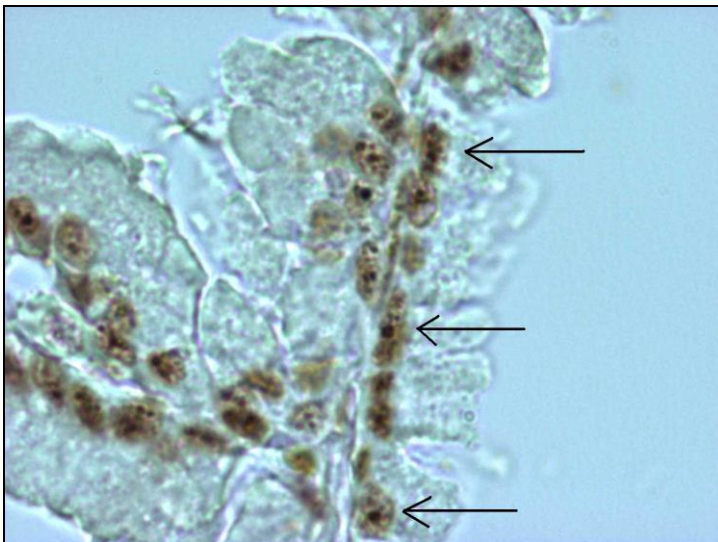


Figura 12: HPB

Método AgNOR Inmersión.
Células epiteliales en cuyos
núcleos se aprecian los puntos
argirófilos (flechas negras).

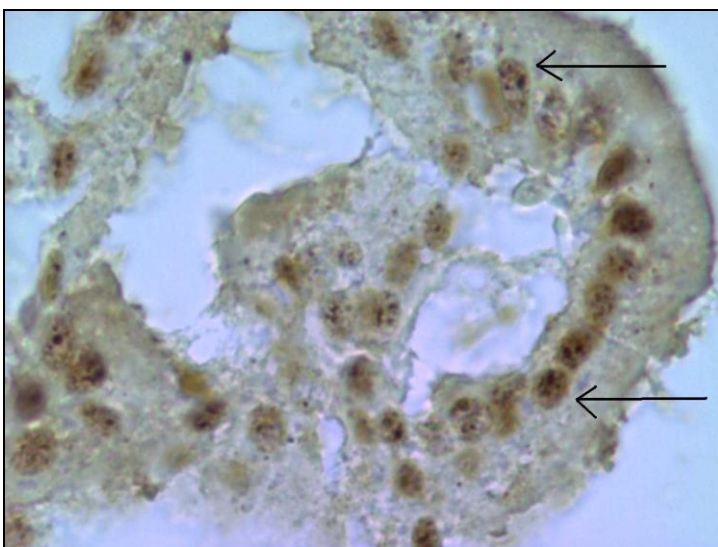


Figura 13: HPB

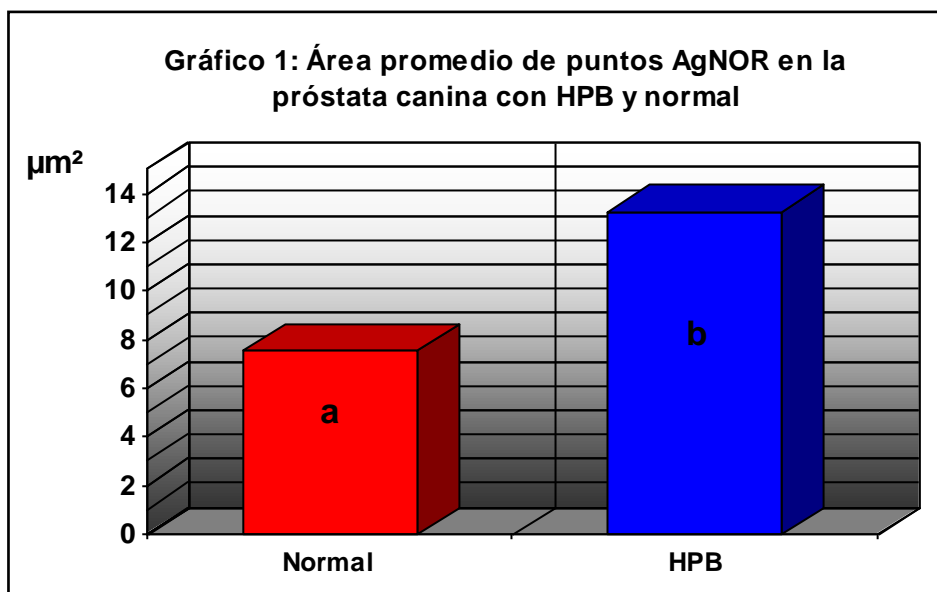
Método AgNOR Inmersión
Núcleos con 4 - 5 puntos
argirófilos (flechas negras).

2.- MORFOMETRÍA CON ANÁLISIS DE VARIANZA (ANEXO 3.1).

a).- Área de puntos AgNOR en la próstata canina con HPB y normal:

El área promedio de puntos AgNOR de las próstatas con hiperplasia prostática benigna (HPB) ($13,25 \pm 3,2 \mu\text{m}^2$) fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) al área de las próstatas normales ($7,56 \pm 2,15 \mu\text{m}^2$) (Tabla 1 y Gráfico 1).

Tabla 1: Área promedio (μm^2) de puntos AgNOR en la próstata canina con HPB y normal.		
N° Próstata	Normal	HPB
1	6,19	13,32
2	8,31	12,99
3	6,87	15,77
4	8,89	11,38
5	-	12,79
Sumatoria	30,26	66,25
Promedio	$7,56 \pm 2,15$ a	$13,25 \pm 3,2$ b

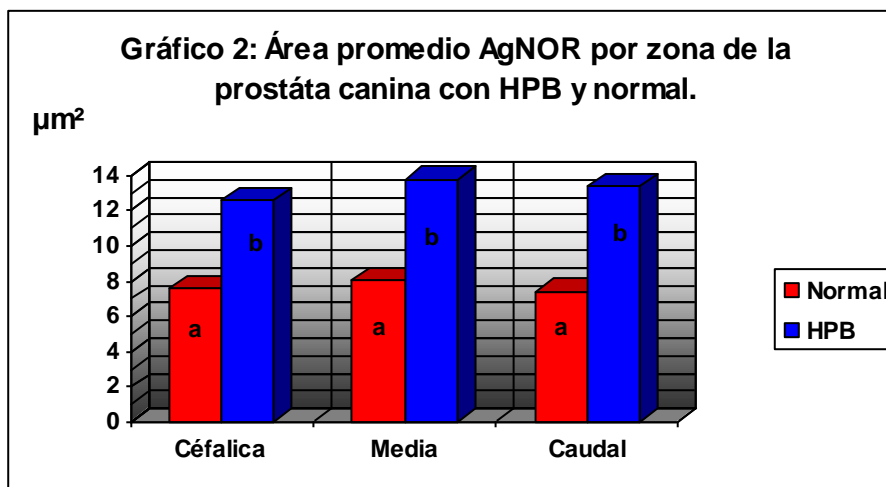


Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

b).- Área de puntos AgNOR por zona en la próstata canina con HPB y normal:

En la tabla y gráfico 2 se muestran los resultados del área de puntos AgNOR (μm^2) en las tres zonas estudiadas (cefálica, media y caudal) de la próstata canina, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), tanto en próstatas con HPB y normales. Sin embargo, sí existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las zonas de las próstatas con HPB en comparación con las zonas de las próstatas normales.

Tabla 2: Área AgNOR promedio (μm^2) por zona de la próstata canina con HPB y normal.				
Próstata	Tipo	Cefálica	Media	Caudal
1	Normal	6,08	6,56	5,92
2	Normal	7,19	8,69	9,04
3	Normal	8,33	7,17	5,11
4	Normal	8,65	9,68	9,39
Sumatoria		30,22	32,1	29,46
Promedio		7,55 ± 1,1 a	8,02 ± 1,24 a	7,36 ± 1,57 a
5	HPB	12,46	15,04	12,48
6	HPB	11,99	13,36	13,61
7	HPB	15,11	17,07	15,13
8	HPB	10,45	11,87	11,82
9	HPB	12,84	11,69	13,85
Sumatoria		62,85	69,03	66,89
Promedio		12,57 ± 1,18 b	13,8 ± 1,49 b	13,37 ± 1,1 b

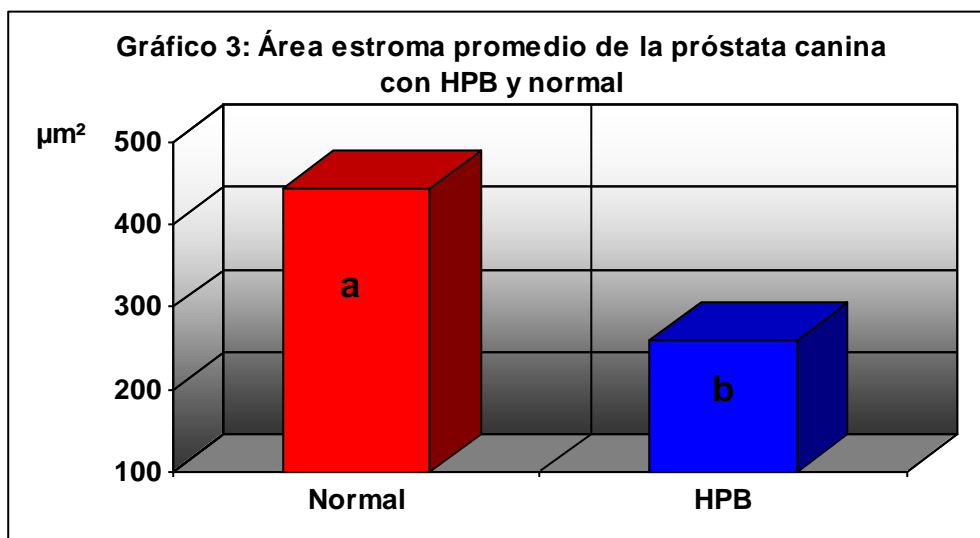


Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

c).- Área Mallory-Heidenhain en la próstata canina con HPB y normal:

Con respecto al área promedio de estroma (μm^2) cuantificada con la técnica Mallory-Heidenhain, los resultados mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre próstatas normales ($444,1 \pm 49,33 \mu\text{m}^2$) y próstatas con HPB ($260,16 \pm 19,42 \mu\text{m}^2$) (Tabla y Gráfico 3).

Tabla 3: Área promedio estroma (μm^2) en la próstata canina con HPB y normal.		
N° Próstata	Normal	HPB
1	408,13	249,24
2	407,37	282,05
3	527,56	233,98
4	432,86	260,38
5	444,59	275,18
Sumatoria	2220,51	1300,83
Promedio	444,1 \pm 49,33 a	260,16 \pm 19,42 b

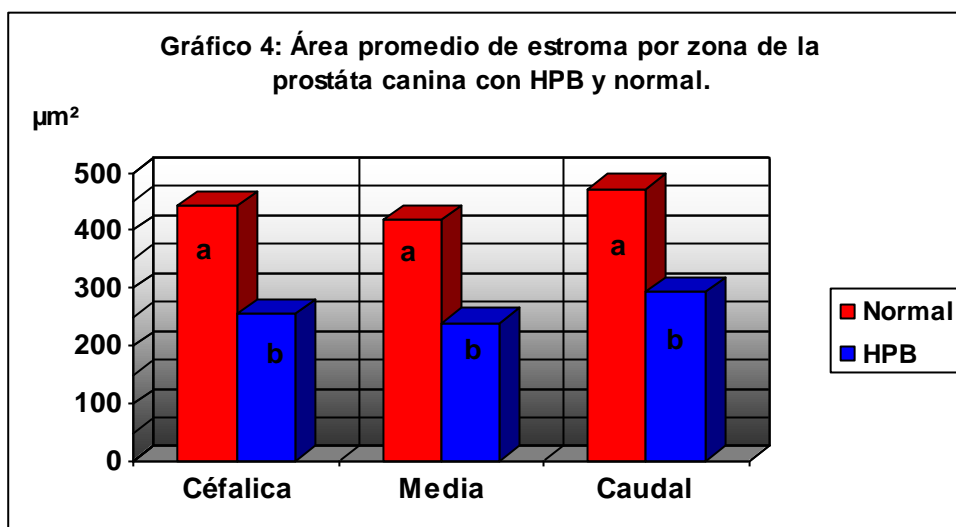


Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

d).- Área Mallory-Heidenhain por zona en la próstata canina con HPB y normal:

En el estudio del área promedio del estroma (μm^2) por zona de la próstata, usando la técnica Mallory-Heidenhain, los resultados no revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), tanto en próstatas con HPB y normales. Sin embargo, sí existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las zonas de las próstatas con HPB en comparación con las zonas de las próstatas normales (Tabla y Grafico 4).

Tabla 4:				
Área promedio estroma (μm^2) por zona de la próstata canina con HPB y normal.				
Próstata	Tipo	Cefálica	Media	Caudal
1	Normal	417,92	398,12	517,75
2	Normal	486,55	365,44	446,59
3	Normal	546,5	402,94	633,25
4	Normal	396,12	450,6	375,41
5	Normal	362,58	474,29	387,52
Sumatoria		2209,67	2091,35	2360,52
Promedio		441,93 \pm 45,86 a	418,27 \pm 51,3 a	472,1 \pm 57,46 a
6	HPB	353,67	136,09	335,78
7	HPB	241,87	243,07	296,21
8	HPB	192,86	262,83	279,58
9	HPB	238,18	265,52	342,46
10	HPB	249,24	287,68	210,8
Sumatoria		1275,82	1195,19	1464,83
Promedio		255,16 \pm 26,38 b	239,03 \pm 22,41 b	292,96 \pm 17,28 b



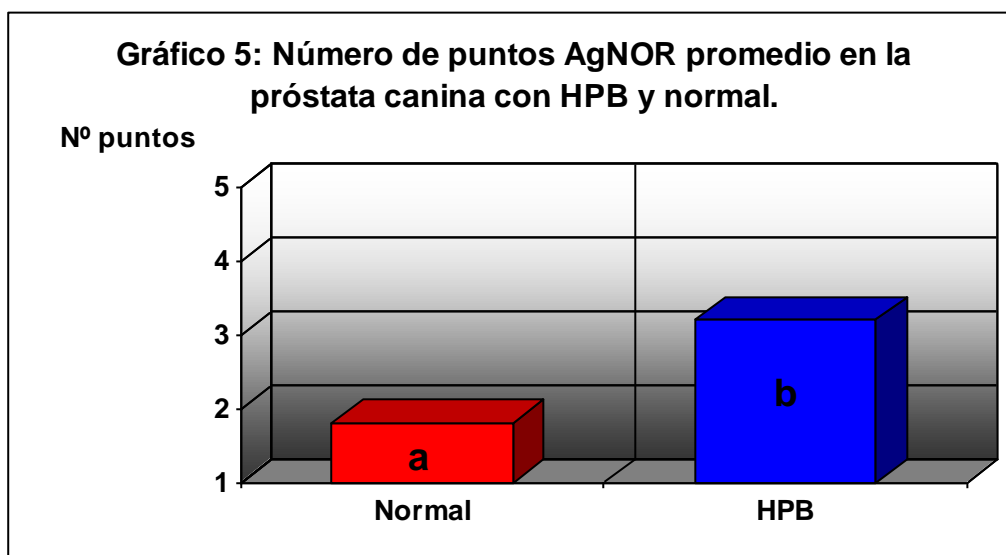
Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

3.- NÚMERO DE PUNTOS AgNOR CON ANÁLISIS DE VARIANZA (ANEXO 3.2).

a).- Número de puntos AgNOR en la próstata canina con HPB y normal:

En la tabla y gráfico 5 se observa que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el número de puntos AgNOR de la próstata normal ($1,81 \pm 0,14$) y la HPB ($3,2 \pm 0,32$).

Tabla 5: Número de puntos AgNOR promedio en la próstata canina.		
Próstata	Normal	Hiperplasia
1	1,94	3,01
2	1,81	3,13
3	1,59	3,2
4	1,92	2,92
5	-	3,78
Sumatoria	7,26	16,04
Promedio	1,81 \pm 0,14 a	3,2 \pm 0,32 b



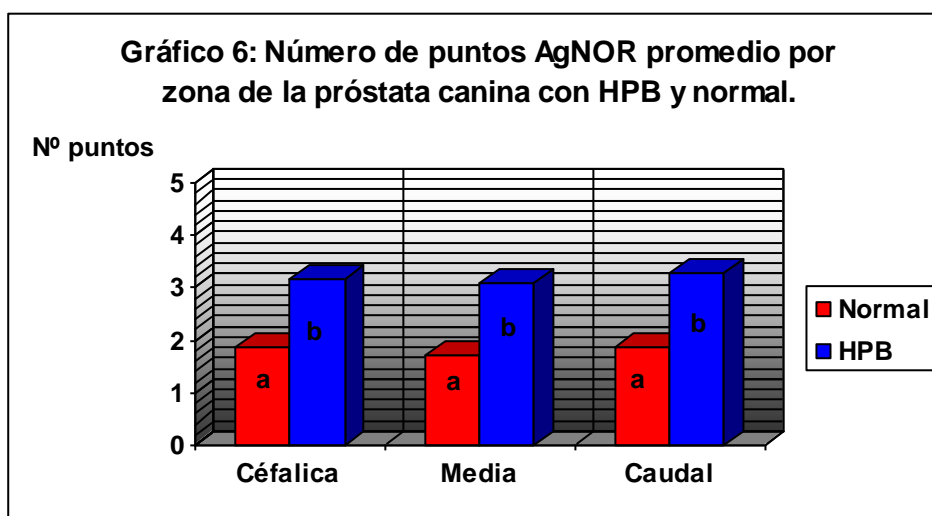
Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

b).- Número de puntos AgNOR por zona en la próstata canina con HPB y normal:

No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el número de puntos AgNOR de las tres zonas estudiadas de la próstata canina, tanto en próstatas con HPB y normales. Sin embargo, sí existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las zonas de las próstatas con HPB en comparación con las zonas de las próstatas normales (Tabla y Gráfico 6).

Tabla 6:
Número de puntos AgNOR promedio por zona de la próstata canina con HPB y normal.

Próstata	Tipo	Cefálica	Media	Caudal
1	Normal	2,13	1,54	2,08
2	Normal	2,06	1,75	1,66
3	Normal	1,5	1,82	1,46
4	Normal	1,85	1,7	2,27
Sumatoria		7,54	6,81	7,47
Promedio		1,88 ± 0,52 a	1,7 ± 0,33 a	1,86 ± 0,64 a
5	HPB	2,86	3,3	2,93
6	HPB	3,28	2,93	3,14
7	HPB	2,75	3,4	3,54
8	HPB	3,23	2,38	2,88
9	HPB	3,76	3,55	3,97
Sumatoria		15,88	15,56	16,46
Promedio		3,17 ± 0,61 b	3,11 ± 0,67 b	3,29 ± 0,68 b



Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

DISCUSIÓN

En esta memoria se estudió la actividad proliferativa de la hiperplasia prostática benigna del canino a través de la detección de proteínas argirófilas nucleolares (AgNORs), además se identificó el estroma prostático por medio de la tinción Mallory-Heindeinmayer.

La HPB se presentaría con mayor frecuencia en perros enteros a partir de la tercera etapa de vida y muchas veces pasaría en forma desapercibida sin mostrar signología clínica, siendo factor predisponente para la aparición de entidades patológicas más severas. El diagnóstico de la patología prostática se dificulta debido a la poca diferenciación clínica de las distintas enfermedades, debiéndose recurrir al uso de métodos diagnósticos complementarios (química sanguínea, imagenología, etc.) para tener mayor certeza e instaurar una terapia adecuada. Sin embargo, para tener el diagnóstico definitivo de HPB es necesario un examen histopatológico a través de una biopsia prostática (Lobetti, 2007).

Según lo expresado por Silva *et al.*, (2004) la mayor parte de la literatura provee de escasos y subjetivos criterios para el análisis histopatológico prostático, debido a lo cual, el método AgNOR aparece como criterio complementario para generar un diagnóstico histopatológico más certero. Como los atributos malignos son altamente dependientes de los cambios graduales, tanto fenotípicos como genéticos, la cuantificación de parámetros histológicos convencionales asociados con factores biológicos, han sido identificados como herramientas útiles para diferenciar entre procesos prostáticos benignos o malignos.

Se ha descrito, que el método AgNOR puede realizarse en muestras citológicas y muestras de biopsia (Vajdovich *et al.*, 2004). En este caso, el estudio se realizó a partir de la escisión completa de 10 próstatas, seleccionando tres cortes transversales de cada una para tener una mejor representación del tejido.

Los resultados del análisis morfométrico revelaron que el área AgNOR en próstatas con HPB ($13,25 \mu\text{m}^2$) es estadísticamente superior al área AgNOR cuantificada

en próstatas normales ($7,56 \mu\text{m}^2$), siendo consistente con lo expresado por Derenzini (2000), el cual señala que la expresión aumentada de proteínas argirófilas estaría en relación con una mayor tasa de proliferación celular. Este resultado es similar a los presentados por Silva *et al.*, (2004) (área normal: $1,26 \mu\text{m}^2$, condición paramaligna: $2,14 \mu\text{m}^2$ y área maligna: $4,47 \mu\text{m}^2$), en un estudio realizado sobre biopsias prostáticas de 136 pacientes humanos, en donde establece el área AgNOR como criterio para la diferenciación histológica de distintas condiciones prostáticas.

A su vez, el área ocupada por tejido conectivo en próstatas con HPB ($260,16 \mu\text{m}^2$), fue estadísticamente inferior al área cuantificada en próstatas normales ($444,1 \mu\text{m}^2$), producto que la presentación de la HPB en el canino se daría casi exclusivamente en el parénquima prostático, como señala Paclikova *et al.*, (2006), no afectando el estroma, como sí sucede en el humano. Cabe destacar que este método de cuantificación del tejido conectivo se logra por medio de la tinción H-M, en la que es posible distinguir nítidamente el tejido conectivo de coloración azul, pudiendo ser análogo al parámetro descrito por Silva *et al.*, (2004) en donde se establece una relación de la densidad del estroma con el volumen glandular usando la tinción H-E.

Respecto a la cuantificación a través del recuento directo de puntos AgNOR, los resultados de esta memoria revelaron una diferencia significativa entre próstatas con HPB (3,2) y próstatas normales (1,81), siendo coherente con lo mostrado en el análisis morfométrico. Este resultado sería concordante con el estudio realizado en humanos por Mukherjee *et al.*, (1997) donde el número de puntos AgNOR por núcleo fue 2,87 en los casos controles normales, y 4,9 en los casos de hiperplasia prostática. Por su parte, Pavlakis *et al.*, (1992) estableció que el recuento AgNOR puede ser beneficioso en discriminar condiciones prostáticas benignas y malignas, siendo 2,95 el recuento AgNOR promedio de los casos de hiperplasia.

Como única referencia de aplicación de la técnica AgNOR en la próstata canina, está el trabajo de Silva y Correia., (2003), donde se encontraron diferencias estadísticas entre zonas neoplásicas (2,16) y zonas hiperplásicas de la misma próstata (1,35). Si bien estos resultados difieren de los descrito en esta memoria, al mostrar un recuento AgNOR promedio en zonas hiperplásicas incluso inferior al de los controles sanos de esta memoria, no deberían tomarse como contradictorios ya que ambos reflejan la diferencia que se da entre tejidos con distinta tasa de proliferación celular, siendo imprescindible para realizar una comparación más acuisiosa, aplicar la técnica a un número significativo de adenocarcinomas prostáticos. Además, se debe tener en consideración lo propuesto por Treere (2000), que indica que el método de recuento directo de los puntos AgNOR podría ser subjetivo y poco reproducible, dada la dificultad de discriminar entre puntos que se encuentran muy próximos o superpuestos.

Las tres zonas estudiadas de la próstata (cefálica, media y caudal), no mostraron diferencias significativas en el análisis morfométrico, tanto del área AgNOR como del área de estroma, ni en el número de puntos AgNOR, lo que establece que no existe una zona con mayor grado de proliferación celular o con mayor tendencia al agrandamiento espontáneo de la próstata. Esto es concordante con que la prostatomegalia de origen benigno es simétrica y homogénea, y que la aparición de irregularidades en su superficie o un agrandamiento desproporcionado tendería a tener relación mayormente con procesos malignos (Tello *et al.*, 1995).

Dado los resultados de esta memoria, en donde se establece una diferencia significativa en la actividad proliferativa entre próstatas con HPB y controles sanos usando el método AgNOR, es aceptable usar esta técnica como criterio complementario al diagnóstico histopatológico de rutina de la enfermedad prostática. Sin embargo, es necesario una mayor cantidad de trabajos que muestren la aplicación de esta técnica en la

patología prostática del canino, sobre todo en procesos malignos como sería el adenocarcinoma.

CONCLUSIONES

1.- La cuantificación de proteínas AgNOR, obtenida por medio del recuento de puntos argirófilos y morfometría, permitió determinar un mayor grado de proliferación celular de las próstatas con HPB, con respecto a próstatas normales.

2.- Las próstatas con HPB, presentaron un área de estroma significativamente menor que las próstatas normales, al aplicar la técnica Mallory- Heidenhain.

3.- La aplicación de las técnicas AgNOR y Mallory- Heidenhain, no evidenció diferencias entre las tres zonas estudiadas de la próstata dentro de cada grupo normal y con HPB, sin embargo, si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las zonas de las próstatas con HPB en comparación con las zonas de las próstatas normales

4.- La técnica AgNOR debería ser considerada como una prueba complementaria al diagnóstico histopatológico.

BIBLIOGRAFÍA

AHISKALI, R; ALICAN, Y; EKICIOGLU, G; KULLU, S; AKDAS, A. 1995. Evaluation of three different AgNOR counting methods in advanced carcinoma of the prostate. *Prostate*. 26(2): 105-110.

BARSANTI, J. 2008. Canine prostatic disease. [en línea] < http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2008/barsanti1_en.pdf?LA=1 > [consulta: 16-6-2009].

CHEVILLE, J; CLAMON, G; ROBINSON, R. 1990. Silver-stained nucleolar organizer regions in the differentiation of prostatic hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* 3(5): 596-598.

COOPER, G.M. 2002. *La célula*. 2 ed. Marban Libros. Madrid, España. 685 pp.

DAVID, F; MONDRAGON, E. 2003. Enfermedad canina prostática. [en línea] < <http://www.ammvepe.com/articulos/prostatica.html> > [consulta: 24-04-2008].

DELLMANN, H. 1994. *Histología veterinaria*. Editorial Acribia. 2ª ed. Zaragoza, España. 398 pp.

DERENZINI, M. 2000. The AgNORs. *Micron* 31:117-120.

DRAGONETTI, A; SOLIS, C; GIORDANO, A. 2005. Prostatitis en el perro. *Analec. Vet.* 25(1): 33-39

GARCIA, F; ESPADA, Y; RUIZ DE GOPEGUI, R; GOMEZ, M; MORALES, C; LOSANTOS, I. 2000 Patología prostática en el perro. [en línea] < <http://www.edicionestecnicasreunidas.com/produccion/prostata.htm> > [consulta: 30-04-2008].

GOBELLO, C; CASTEX, G; CORRADA, Y. 2002. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriog.* 57(4): 1285-1291.

HOWELL, W; BLACK, D. 1980. Controlled silver-staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 36: 1014-1015.

KOPP, E; MAYR, B; SCHIEGER, W. 1982. Nucleolar organizer regions on chromosomes of the domestic dog. *J. Hered.* 73:73.

LOBETTI, R. 2007. Canine prostatic disorders. [en línea]

<http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007/pdf/14_20070320044513_abs.pdf>

[consulta: 15-04-2008].

LOHR, C; TEIFKE, J; FAILING, K; WEISS, E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.* 34: 212-221.

LOPEZ, M; LEYTON, C; GRAF, M. 1982. Técnicas de histología y citología. 2ª ed. Departamento de Biología Celular y Genética Facultad de Medicina Universidad de Chile. Santiago, Chile. 242 pp.

McNEAL, J. 1988. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 12(8): 619-633.

MUKHERJEE, J; MISRA, V; GUPTA, S; GUPTA, A; TANDON, S. 1997. Argyrophilic nucleolar organizer regions in atypical adenomatous hyperplasias, prostatic intraepithelial neoplasias and prostatic neoplasms. *Urol. Int.* 58(2): 75-79.

OHKI, T; AKAKURA, K; UEDA, T; AKIMOTO S; YATANI, R; SHIMAZAKI, J. 1996. Changes in histologic grade and argyrophilic nucleolar organizer regions during progression of prostate cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 26(2): 82-87.

PACLIKOVA, K; KOHOUT, P; VLASIN, M. 2006. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. *Veter. Med.* 51(1): 1-13.

PALOMO, M; PEREZ, J; REGO, M; LOPEZ, M; CAÑIZARES, C. 2002. Evaluación de regiones organizadoras argirófilas (AgNORs) en neoplasias foliculares tiroideas. *Rev. Esp. Patol.* 35(1): 95-100.

PAVLAKIS, K; ALIVIZATOS, G; MITROPOULOS, D; CONSTANTINIDES, C; SKOPELITOU, A; KIT'TAS, C; DIMOPOULOS, C. 1992. Silver-binding nucleolar organizer regions in benign and malignant prostatic lesions. *Urol. Int.* 49(3): 137-140.

PLOTON, D; MENAGER, M; JEANNESSON, P; HIMBER, G; PIGEON, F; ADNET, J. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem.* 8: 5-14.

ROMAGNOLI, S. 2007. The canine prostate: what it does why does it grow so much. [en línea] < <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2007/romagnoli1/chapter.asp?LA=1> > [consulta: 15-04-2008].

SILVA, L; NASCIMENTO, P; ELLINGER, F; LUNA , B; CAPELOZZI, V; ANTONANGELO, L. 2004. Quantitation of conventional histologic parameters and biologic factors in prostatic needle biopsy are useful to distinguish paramalignant from malignant disease. *Path. Res. And Pract.* 200: 599-608.

SILVA, J; CORREIA, J. 2003. A case of low- grade canine prostate adenocarcinoma: AgNOR study. RPCV 98(547): 139-143.

TELLO, L; CHOVAN, N; MUÑOZ, L. 1995. La enfermedad prostática del perro y su diagnóstico ecotomográfico. Monogr. Med. Vet. 17, N° 1-2.

TREERE, D. 2000. AgNOR staining and quantification. Micron 31: 127-131.

VAN CAUWELAERT, R; AZOCAR, G. 1999. Novedades en técnicas de diagnóstico de patología prostática. Rev. Chi. Cir. 51(2): 116-119.

VAJDOVICH, P; PSADER, R; TOTH, A; PERGE, E. 2004. Use of the Argyrophilic nucleolar region method for citologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. Vet. Pathol. 41:338-345.

WALLACE, M. 2001. Diagnosis and medical management of canine prostatic disease.

[en línea] <

<http://www.vin.com/VINDBPub/SearchPB/Proceedings/PR05000/PR00441.htm> >

[consulta: 26-04-2008].

WATSON, J.D; BAKER, T.A; BELL, S.P; GANN, A; LEVINE, M; LOSICK, R. 2004. Molecular biology of the gene. 5 ed. Pearson Education. San Francisco, USA. 755pp.

Anexo 1: Técnica Mallory-Heidenhain (López *et al.*, 1982).

1.- Solución a): agua destilada	200 ml
ácido fosfotungstico	1 g
orange G	2 g
azul de anilina hidrosoluble	1 g
Fucsina acida	3 g

2.- Procedimiento:

2.1.- desparafinar e hidratar hasta agua destilada.

2.2.- teñir en solución a) durante 5 min.

2.3.- lavar con agua corriente durante 3-5 seg.

2.4.- deshidratación rápida, aclarar y montar.

3.- Resultados: fibras colágenas azules

 núcleos rojos

 eritrocitos amarillos

Anexo 2: Técnica AgNOR según Trere (2000) estandarizada en el Laboratorio de Histología de la Facultad.

1.- Desparafinar los cortes histológicos:

- 1.1.- Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes en forma descendente.
- 1.2.- Lavado en agua destilada.

2.- Pretratamiento de los cortes con calor de microondas:

- 2.1.- Colocar las muestras en solución buffer citrato 0,01M a pH=6.0 en compartimiento interno de vaso de recuperación, rellenar con agua destilada el compartimiento externo.
- 2.2.- Irradiar en horno microondas a máxima potencia: 3 pulsos de 5 min c/u.
- 2.3.- Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- 2.4.- Lavado con agua destilada y agua desionizada.

3.- Preparación y aplicación de la solución de trabajo:

- 3.1.- Preparar solución de nitrato de plata al 50%.
- 3.2.- Preparar solución de ácido fórmico al 1%. Luego agregar gelatina hasta un 2%.
- 3.3.- Preparar la solución de trabajo (en el momento de uso) mezclando 2 partes de la solución de nitrato de plata con 1 parte de la solución de gelatina en ácido fórmico.
- 3.4.- Aplicar la solución de trabajo sobre las muestras y dejarlas entre 25 a 30 min en oscuridad a temperatura ambiente.
- 3.5.- Enjuagar con agua desionizada.

4.- Fijación de las muestras:

- 4.1.- Fijación con tiosulfato de sodio al 5 % por 5 min.
- 4.2.- Realizar 2 lavados en agua destilada.

5.- Deshidratar, aclarar y montar:

- 5.1.- Deshidratar las muestras en alcoholes de 96% (1 lavado), y de 100% (3 lavados) por 5 min. c/u.
- 5.2.- Aclarar en xiloles (3 lavados) por 5 min. en c/u.
- 5.3.- Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex).

Anexo 3: Análisis de Varianza

3.1) En morfometría.

a) Área de puntos AgNOR (HPB y normales).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área AgNOR	9	0,83	0,80	13,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	71,82	1	71,82	33,93	0,0006
tipo	71,82	1	71,82	33,93	0,0006
Error	14,82	7	2,12		
Total	86,64	8			

b) Área de puntos AgNOR por zona (cefálica, media, caudal).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área AgNOR	27	0,77	0,74	15,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	212,73	3	70,91	25,47	<0,0001
tipo	209,10	1	209,10	75,12	<0,0001
zona	3,63	2	1,81	0,65	0,5308
Error	64,03	23	2,78		
Total	276,76	26			

c) Área Mallory-Heidenhain (hiperplasias y normales).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área M-H	10	0,88	0,87	10,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	84581,13	1	84581,13	60,18	0,0001
tipo	84581,13	1	84581,13	60,18	0,0001
Error	11244,54	8	1405,57		
Total	95825,67	9			

d) Área Mallory-Heidenhain por zona (cefálica, media, caudal).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área M-H	30	0,70	0,66	18,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	262500,06	3	87500,02	19,89	<0,0001
zona	14844,77	2	7422,39	1,69	0,2047
tipo	247655,28	1	247655,28	56,30	<0,0001
Error	114372,44	26	4398,94		
Total	376872,49	29			

3.2 En Número de puntos AgNOR.

a) Número de puntos AgNOR (hiperplasias y normales).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
puntos AgNOR	9	0,89	0,87	10,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,31	1	4,31	56,66	0,0001
tipo	4,31	1	4,31	56,66	0,0001
Error	0,53	7	0,08		
Total	4,84	8			

b) Número de puntos AgNOR por zona (cefálica, media, caudal).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
puntos AgNOR	27	0,79	0,77	14,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12,47	3	4,16	29,28	<0,0001
tipo	12,30	1	12,30	86,61	<0,0001
zona	0,17	2	0,09	0,61	0,5501
Error	3,27	23	0,14		
Total	15,74	26			