



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



**“REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES
COMO INDICADORES DE PRONÓSTICO
EN TUMORES DE CÉLULAS REDONDAS DEL CANINO”**

DANIEL HUMBERTO VARGAS GONZÁLEZ

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

PROFESOR GUÍA: RAQUEL CEPEDA CANALES
FINANCIAMIENTO: PROYECTO FIV 4602004
SANTIAGO – CHILE
2008

INDICE

INDICE.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.- Núcleo y Proteínas Nucleares.....	6
2.- Nucléolo y Regiones Organizadoras Nucleolares.....	6
3.- AgNOR y Pronóstico Tumoral.....	6
4.- Evaluación morfométrica nuclear.....	8
5.- Proliferación celular.....	9
5.1.- Recuento de figuras mitóticas.....	10
5.2.- Métodos inmunohistoquímicos.....	10
5.2 a) PCNA.....	10
5.2 b) Ki-67.....	10
5.3.- Método AgNOR.....	11
6.- Tumores de Células Redondas del Canino.....	12
6.1.- Histiocitoma.....	12
6.2.- Mastocitoma.....	13
6.3.- Tumor Venéreo Transmisible (TVT).....	15
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODO.....	18
RESULTADOS.....	21
1.- DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES.....	21

2.- COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.....	31
3.- MORFOMETRÍA CON ANÁLISIS DE VARIANZA	31
a) Área AT en mastocitomas.....	31
b) Área PCNA en mastocitomas.....	33
c) Área Ki-67 en histiocitoma y TVT.....	34
d) Área de puntos AgNOR en mastocitomas, histiocitoma y TVT.....	35
4.- OTROS INDICADORES CON ANÁLISIS DE VARIANZA.....	36
a) N° de puntos AgNOR en mastocitomas, histiocitoma y TVT.....	36
b) Localizacion de puntos AgNOR. en mastocitomas, histiocitoma y TVT.....	38
c) Distribucion de puntos AgNOR . en mastocitomas, histiocitoma y TVT.....	39
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	56
ANEXO 1: Técnica Azul de Toluidina (AT).....	56
ANEXO 2: Técnica AgNOR.....	57
ANEXO 3: Técnica Inmunohistoquímica (PCNA ó Ki-67).....	59
ANEXO 4: Coeficiente de Correlación de Pearson	61
ANEXO 5: Análisis de Varianza.....	62
ANEXO 5.1) En morfometría.....	62
ANEXO 5.2) En otros indicadores.....	64
ANEXO 6: Tabla Resumen AgNOR.....	67

RESUMEN

En este estudio se evaluó el grado de proliferación de tumores cutáneos de células redondas del perro, incluyendo a mastocitoma, histiocitoma y TVT a través de técnicas inmunohistoquímicas (PCNA ó Ki-67) y detección de proteínas argirófilas (AgNOR). Además, en el mastocitoma se realizó la técnica de azul de toluidina (AT), la cual permitió observar la presencia de gránulos citoplasmáticos metacromáticos, dependiendo del grado de diferenciación del tumor. Se ha señalado que existiría una correlación directa significativa entre las técnicas inmunohistoquímicas y AgNOR, sin embargo, los resultados de esta investigación no demostraron tal correlación.

La técnica AgNOR, no permitió discriminar entre tumores benignos y malignos, por lo tanto, la cuantificación de proteínas AgNOR estaría más asociada a velocidad de proliferación que a malignidad. La utilización de esta técnica debe ser considerada como una prueba complementaria al diagnóstico histopatológico.

ABSTRACT

In this study, the degree of proliferation of canine cutaneous round cell tumors including mast cell tumor, histiocytoma and transmissible venereal tumor (TVT) was assessed through immunohistochemistry (PCNA or Ki-67) and detection of argyrophilic proteins (AgNOR). Besides, in mast cell tumor, the toluidine blue method was performed. This method reveals cytoplasmic metachromatic granules depending on the degree of differentiation of tumor. It has been noted that there would be a significant direct correlation between immunohistochemistry and AgNOR; however, the results of this study showed no correlation.

The AgNOR technique is not allowed to discriminate between benign and malignant tumors, therefore, AgNOR protein quantification would be more associated to speed of proliferation than malignancy. The use of this technique should be considered a complementary test to histopathologic diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Una neoplasia es una masa anormal de tejido, con una velocidad de crecimiento mayor a la normal, en ella se produce un desequilibrio o alteración en componentes básicos de la dinámica de poblaciones celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular o apoptosis. En el perro, al igual que el hombre u otros animales domésticos, es posible observar una gran variedad de neoplasias, principalmente en los adultos de mayor edad, en quienes estas patologías cutáneas tienen una incidencia y prevalencia importante.

Después de establecer el diagnóstico preciso de una neoplasia, es importante investigar sobre las características de su comportamiento biológico. El método AgNOR (regiones organizadoras nucleolares argirófilas) puede proporcionar una herramienta histológica de gran utilidad en el pronóstico de neoplasias; se basa en la afinidad que existe entre un conjunto de proteínas nucleares con la plata, que se observan como puntos oscuros al microscopio óptico. Esta técnica podría constituir una alternativa más económica y simple frente a otras como las inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales.

En este trabajo, se estudiaron 3 tipos de neoplasias cutáneas de células redondas, de presentación frecuente en el perro, y que presentan distintas características de comportamiento tumoral: a) Histiocitoma, neoplasia de carácter benigno, b) TVT, considerado neoplasia de malignidad local, aunque las metástasis son poco frecuentes, c) Mastocitoma, que tiene 3 grados de acuerdo a su nivel de diferenciación: grado 1 (benigno), presenta células bien diferenciadas, grado 2 (maligno), moderadamente diferenciadas y grado 3 (altamente maligno), pobremente diferenciadas. En todos los tumores se evaluó el grado de proliferación celular a través de marcadores inmunohistoquímicos (Ki-67 ó PCNA) y a través del método AgNOR.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1.- Núcleo y Proteínas Nucleares

El núcleo almacena la información genética y es un centro de control celular. En su interior ocurre la replicación de 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, frecuentemente denominadas proteínas no histonas, están asociadas con el cromosoma, regulando la transcripción, replicación, reparación y recombinación de ADN celular (Watson *et al.*, 2004).

2.- Nucléolo y Regiones Organizadoras Nucleolares

La subestructura que más destaca en el núcleo es el nucléolo, que es el sitio donde ocurre la transcripción y el procesamiento del ARN ribosomal (ARNr) y el ensamblaje de los ribosomas. El tamaño del nucléolo depende de la actividad metabólica de la célula, siendo los nucléolos más grandes en aquellas células con una alta actividad de síntesis de proteínas. Después de cada división celular, los nucléolos se forman alrededor de las regiones cromosómicas que contienen los genes para los ARNr 5,8S, 18S y 28S, por esta razón se denominan Regiones Organizadoras Nucleolares (NOR) (Cooper, 2002).

3.- AgNOR y Pronóstico Tumoral

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) son segmentos de ADN que codifican el ARNr. 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 nucléolos vuelven a formarse después de su desaparición durante la mitosis (Derenzini, 2000). Estas regiones están íntimamente asociadas a un conjunto de nucleoproteínas ácidas específicas que pueden ser detectadas mediante técnicas de impregnación argéntica y que se denominan, en consecuencia, como Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas

(AgNOR) (Palomo-González *et al.*, 2002). Los componentes fundamentales de las NORs en interfase son las proteínas AgNOR. Dentro de ellas están: la nucleolina, una fosfoproteína de 105 kDa, que tiene un papel importante en la transcripción de moléculas de ARNr, y la nucleofosmina (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, han sido identificadas como proteínas AgNOR, 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 el tamaño de las NORs en interfase son muy variables dentro del nucléolo, de acuerdo a la actividad transcripcional de ARNr. 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 adecuado para las células hijas y, mientras más corto sea el ciclo celular, habrá mayor biogénesis ribosomal por unidad de tiempo. De esta forma, el número de AgNOR en interfase está estrictamente relacionado con la actividad transcripcional de ARNr (Derenzini, 2000). Existe una relación entre la cantidad de AgNOR en interfase y el pronóstico de tumores malignos: a mayor número de AgNOR, peor es el pronóstico. Por tanto, la cantidad de AgNOR en interfase está estrictamente relacionada con la velocidad de proliferación celular, según Derenzini y Trerè (1991).

De acuerdo a lo señalado por Pich *et al.* (2000), los AgNOR son considerados indicadores de pronóstico en diferentes tipos de tumores humanos, basados en los siguientes argumentos:

- Un aumento en las proteínas AgNOR podría deberse a una demanda aumentada para biogénesis ribosomal, lo que refleja una alta actividad metabólica.

- Como los AgNORs están ubicados en el brazo corto de cinco cromosomas acrocéntricos, un aumento en el número de tales cromosomas, lo cual puede ocurrir en tumores aneuploides, podría conducir a un aumento en la cantidad de AgNOR.
- La cantidad de AgNOR está normalmente asociada con el grado histológico de diferenciación.
- La cantidad de AgNOR refleja la actividad proliferativa celular, como ha sido demostrado por su correlación directa con parámetros cinéticos establecidos con marcadores nucleares de proliferación celular como Ki-67 y PCNA. Sin embargo, según los mismos autores, la rapidez de la proliferación celular, más que la actividad proliferativa en sí, es lo que influencia la progresión neoplásica.

A diferencia del humano, las NORs en el perro, se ubican en las regiones teloméricas de los cromosomas 7, 8, 27 y 38. (Kopp *et al.*, 1982).

4.- Evaluación morfométrica nuclear

Trerè (2000), señala que se han propuesto 2 métodos para el análisis cuantitativo de proteínas AgNOR: el método del recuento y el método morfométrico. El primero, consiste en la enumeración de puntos teñidos con plata en cada célula, directamente en el microscopio, enfocando a un alto aumento (100x). El método morfométrico consiste en la medición automática o semiautomática del área ocupada por las estructuras teñidas con plata dentro del contorno nuclear mediante análisis de imagen computacional.

Según Strefezzi *et al.*, (2003), los parámetros morfométricos nucleares más apropiados para diferenciar entre los grados histopatológicos del mastocitoma cutáneo canino en cortes teñidos con H-E, son: área, diámetro promedio y perímetro del núcleo. Estos parámetros revelaron diferencias significativas entre G II y G III, y entre G I y G III. Similares resultados obtuvieron Maiolino *et al.* (2005), quienes también trabajaron con mastocitomas teñidos con

H-E. La morfometría de los núcleos de las células neoplásicas puede ser una efectiva herramienta auxiliar para el diagnóstico diferencial de histiocitoma, mastocitoma y TVT en perros, principalmente cuando se analiza la distribución y la caracterización morfológica del nucléolo y la heterocromatina. En un trabajo, realizado por Waldemarin *et al.* (2004), se describe en el nucléolo regiones de interés (ROI) intensamente teñidas que fueron segmentadas computacionalmente y corresponderían a material nucleolar o heterocromatina. Estos autores encontraron que el número de ROIs fue mayor en histiocitoma y TVT que en mastocitoma. Sin embargo, el área y el perímetro de ROIs fue mayor en mastocitoma. Por otro lado, los ROI del histiocitoma fueron más periféricos y con mayor dispersión. En todos estos tipos tumorales, la desviación estandar del área de ROIs fue mayor que su promedio, lo que indica una gran variación en estas áreas. De acuerdo a la experiencia de estos autores, los valores de área, perímetro, ancho y largo nuclear son mayores en el histiocitoma.

5.- Proliferación celular

El ciclo celular se divide en cuatro etapas, G1, S, G2, M. En la fase G1, la célula aumenta de tamaño y se prepara para copiar su ADN, lo que ocurre en la fase siguiente, denominada S (síntesis). Posteriormente, la célula ingresa a la fase G2, donde se prepara para la mitosis, que ocurre a continuación en la fase M, originando dos células, cada una de las cuales recibe una serie completa de cromosomas. Las nuevas células pueden entrar inmediatamente en fase G1 continuando el ciclo o pueden detenerse (G0), en forma temporal o permanente. La progresión, a través de las cuatro etapas del ciclo celular, depende en gran medida de que se alcancen niveles elevados de ciclinas, las que interactúan con quinasas dependientes de ciclina (CDK), siendo la mitosis la fase más corta del ciclo celular (Weinberg, 1996).

Dentro de los métodos que evalúan la actividad proliferativa de una célula, están:

5.1.- Recuento de figuras mitóticas: es el método morfológico tradicional. Consiste en la enumeración de mitosis por cierto número de campos microscópicos de alto aumento, mitosis por milímetro cuadrado, o mitosis por determinado número de células tumorales (índice mitótico). Sin embargo, hay que considerar que este procedimiento detecta sólo las células que están en mitosis, y no permite observar el resto de las fases del ciclo celular. Su principal defecto es la falta de estandarización y la baja capacidad para reproducir esta prueba (Linden *et al.*, 1992; Madewell, 1997).

5.2.- Métodos inmunohistoquímicos: a través del uso de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos nucleares de proliferación celular, como Ki-67 y PCNA.

5.2 a) PCNA: (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) es una proteína no-histona de 36 Kd y de 261 aminoácidos con alto contenido en ácido glutámico y aspartato. Actúa como proteína auxiliar de la enzima ADN polimerasa δ (Löhr *et al.*, 1997). De esta forma, el proceso de síntesis de ADN mediado por la ADN polimerasa δ es dependiente del PCNA. El PCNA es un marcador de la fase G1 (síntesis baja de PCNA) que aumenta con el comienzo de la fase S (síntesis alta de PCNA) para retornar a valores basales durante el período final de la fase S (Vicente *et al.*, 1998). Sin embargo, en la práctica, estas etapas de síntesis no se encuentran bien delimitadas, debido a que el PCNA tiene una prolongada vida media, siendo aún detectable al final de la fase M (Meer *et al.*, 2003).

5.2 b) Ki-67: es una proteína nuclear no histona de 395 Kd, cuya expresión se inicia en la mitad de la fase G1, aumenta en la fase S y G2, y tiene su máxima expresión en mitosis, después de la cual es degradada rápidamente, alcanzando una vida media de 60 a 90 minutos. Por esta razón, el método Ki-67 sería más preciso que PCNA. MIB-1 es el anticuerpo que detecta al antígeno Ki-67 en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (Meer *et al.*,

2003). La ubicación del antígeno Ki-67 es variable, se encontraría en el nucléolo durante la interfase, en el nucleoplasma durante la profase, asociado a cromosomas individuales en la metafase, y en la telofase estaría distribuido por todo el núcleo con un patrón puntiforme (Linden *et al.*, 1992). Ki-67 contribuiría a la condensación de los cromosomas (Löhr *et al.*, 1997).

Estas técnicas inmunohistoquímicas tienen como principal desventaja el alto costo económico de los insumos utilizados.

5.3.- Método AgNOR: descrito anteriormente y que reconoce ciertas proteínas nucleares no histónicas argirófilas asociadas con proliferación, tiene la ventaja, sobre las técnicas inmunohistoquímicas, que puede ser realizado en cualquier laboratorio de histopatología, utiliza material biológico tratado con métodos convencionales de fijación e inclusión y los insumos tienen bajo costo económico.

En la actualidad, las enfermedades oncológicas representan un grupo de desórdenes de alta incidencia en medicina veterinaria, donde los tumores de células redondas ocupan un lugar relevante. Es por esto, que surge la necesidad no sólo de realizar diagnósticos diferenciales confiables, sino que también utilizar herramientas que permitan pronosticar el comportamiento biológico de las neoplasias y así, orientar al clínico en la elección de las terapias más adecuadas al tumor evaluado. Esto ha inducido a la realización de distintas líneas de investigación en esta área.

En esta memoria, se estudiaron indicadores de pronóstico tumoral, mediante la expresión de Ki-67 o PCNA y AgNOR, en 3 tipos de neoplasias de alta incidencia en perros, pero que difieren en su cinética tumoral: el histiocitoma, de carácter benigno; el mastocitoma, que tiene un comportamiento impredecible, pero potencialmente maligno, muy variable en sus 3 grados; y el tumor venéreo transmisible (TVT), que es considerado con alta capacidad de

invasión y destrucción local, con bajo índice metastásico y de fácil remisión inducida por quimioterapia. A diferencia de las células normales, las células cancerosas ignoran los controles normales de proliferación y siguen sus propias instrucciones internas de división. Además, son capaces de emigrar del sitio donde se producen, invadir otros tejidos y formar masas en lugares distantes del cuerpo (Weinberg, 1996). De esta forma, las metástasis son implantes tumorales que no guardan continuidad con el tumor primario y definen, claramente, a un tumor como maligno (Cotran *et al.*, 2000).

6.- Tumores de Células Redondas del Canino

Los tumores de células redondas del canino constan de células definidas de forma redonda a ovalada. En ellos se incluyen, plasmocitoma, linfoma, mastocitoma, histiocitoma y TVT (Nesbit *et al.*, 2002).

6.1.- Histiocitoma:

Los histiocitos son macrófagos maduros, que normalmente residen en el tejido conectivo. Cuando estas células, de linaje monocítico, proliferan en forma exacerbada pueden originar una neoplasia benigna o histiocitoma. Es común en perros jóvenes, siendo las razas Floatcoat Retriever, English Bulldog, Terriers, Boxer, las de mayor riesgo (Woods, 2004).

El histiocitoma se puede presentar como nódulos pequeños, rojos, soleantados, alopécicos, que a menudo tienen una superficie ulcerada. Se ubican de preferencia en la cabeza, pabellón de la oreja y cuello. El diagnóstico se hace en base a la historia clínica, signos, citología y se requiere histopatología para el diagnóstico definitivo (Woods, 2004).

La apariencia histológica es muy variable, dependiendo de la edad de la lesión, el grado de necrosis e inflamación secundaria. Es habitual el infiltrado dérmico de células redondas densamente empaquetadas, levemente pleomórficas, dispuestas en cordones o láminas, con escaso estroma. Las células se extienden desde la unión dermoepidérmica a la

dermis profunda. Las porciones más profundas de la neoplasia tienden a ser más estrechas que las superficiales, dándole al tumor la forma de cuña al ser observado con aumento bajo. Las figuras mitóticas son numerosas. En la base del tumor pueden encontrarse agregados densos de linfocitos y células plasmáticas (Goldschmidt y Hendrick, 2002).

La mayoría de los histiocitomas caninos regresan en forma espontánea, no obstante, la extirpación quirúrgica generalmente es curativa. Estas neoplasias raramente metastizan y el pronóstico de no recurrencia es excelente (Woods, 2004).

6.2.- Mastocitoma:

El mastocitoma cutáneo es común en el perro, corresponde entre un 7 a 20% de los tumores cutáneos. Es un tumor originado a partir de mastocitos, los cuales son componentes celulares normales del tejido conectivo. Estas células se caracterizan por poseer gránulos citoplasmáticos metacromáticos ricos en heparina, histamina y factor quimiotáctico eosinofílico. El mastocitoma cutáneo se ubica de preferencia en tronco, región perineal y extremidades, afectando en su mayoría a perros adultos y viejos, de ambos sexos. Algunas de las razas más predisuestas son: Boxer, Bulldog inglés, Boston Terrier, Bull Terrier inglés (O`Keefe, 1990).

El tumor puede surgir desde la dermis o del tejido conectivo subcutáneo, como masas bien definidas, elevadas y a menudo eritematosas y alopecicas (O`Keefe, 1990). La mayoría de estos tumores presentan un color de blanquecino a amarillo pálido, aunque el color y la consistencia del mastocitoma dependen del grado de degranulación e inflamación secundaria (Goldschmidt y Hendrick, 2002). La complicación clínica más frecuente en perros con mastocitoma es la aparición de úlceras gastroduodenales debido a la liberación de histamina por las células tumorales. Otras consecuencias son: anormalidades de la coagulación y retraso en los procesos de cicatrización, las que estarían asociadas con la liberación de heparina y de

enzimas proteolíticas junto con sustancias vasoactivas respectivamente (Martínez de Merlo, 2000). El diagnóstico se basa en citología e histopatología. Es importante destacar, que el comportamiento biológico de este tumor es impredecible, pudiendo variar de benigno a extremadamente maligno. Alrededor de un 50% de estas neoplasias son malignas (O'Keefe, 1990).

Histológicamente, las células tumorales son de redondas a poligonales con núcleos redondos centrales o levemente excéntricos y citoplasma rosado pálido con gránulos que se tiñen de color gris-azul con H-E o morado con tinciones metacromáticas. Con frecuencia se encuentran eosinófilos asociados al mastocitoma canino (Goldschmidt y Hendrick, 2002).

Se ha sugerido una correlación entre grado de diferenciación celular y comportamiento biológico, lo que permitiría establecer un pronóstico para estos tumores (Goldschmidt y Hendrick, 2002). En la clasificación histológica del mastocitoma cutáneo propuesta por Patnaik *et al.* (1984), el G I es bien diferenciado, el G II es intermedio, y el G III es el más indiferenciado o anaplásico. Sin embargo, a pesar de que el sistema de clasificación histológica sigue diversas características histológicas predefinidas, muchas veces la clasificación es subjetiva, ya que los patólogos pueden determinar diferentes grados para el mismo tumor. Esta subjetividad es mayor en los mastocitomas de diferenciación intermedia (G II) (Rech *et al.*, 2004). De esta forma, aunque la clasificación histopatológica se considera un buen método para la predicción del comportamiento tumoral a largo plazo, presenta un 50-60% de discordancia entre patólogos expertos (Strefezzi *et al.*, 2003).

El tratamiento óptimo para el mastocitoma canino es la extirpación quirúrgica completa del tumor, con márgenes amplios, y radioterapia para los tumores donde la extirpación quirúrgica total es imposible. También se utilizan esteroides en forma sistémica y/o local (Goldschmidt y Hendrick, 2002).

6.3.- Tumor Venéreo Transmisible (TVT):

TVT es un tumor contagioso de transmisión por contacto directo con áreas epiteliales con alguna solución de continuidad, en particular en la zona genital, que afecta a perros de ambos sexos. El TVT tiene una distribución mundial pero parece ser más prevalente en regiones urbanas tropicales y subtropicales. Los animales con mayor riesgo de desarrollar TVT son aquellos que viven en áreas con alta concentración de perros vagabundos y callejeros, con inadecuadas leyes de tenencia de animales y con cruzamientos poco controlados. Se encuentra en su mayoría en perros sexualmente maduros debido a su modo de transmisión. El TVT espontáneo se transmite por el coito y por conductas sociales como oler y lamer, lo que puede ayudar a explicar los casos de implantación extragenital en la cavidad nasal y oral, las metástasis son escasas. Los TVT son lesiones con forma de coliflor, de color rosado o rojo, pueden ser únicos o múltiples y de variados tamaños. Son relativamente firmes pero frágiles, especialmente aquellos que involucran genitales externos. La hemorragia está asociada con la fragilidad tumoral. Otros signos clínicos asociados pueden incluir descarga genital, olor anormal y lamido excesivo (Rogers, 1997).

Histológicamente, el TVT presenta células de redondas a ovoides dispuestas en láminas y cordones. Los márgenes celulares generalmente están mal definidos. Los núcleos son grandes, redondos, generalmente con un nucléolo en el centro. El citoplasma es de color rosado pálido y de cantidad moderada. El índice mitótico es alto, esta neoplasia crece rápidamente al comienzo y luego puede permanecer estática por un tiempo. Las metástasis son poco frecuentes, afectando en su mayoría a nódulos linfáticos regionales (Goldschmidt y Hendrick, 2002). En el TVT implantado experimentalmente, se ha descrito una eventual regresión espontánea, lo que no sucede en el TVT de ocurrencia natural (Flores *et al.*, 2000).

En un estudio morfológico e inmunohistoquímico realizado en TVT por González *et al.* (2000), se aplicó quimioterapia con sulfato de vincristina para inducir la regresión tumoral y cuyos resultados indicaron, que la proliferación de células tumorales se detuvo, aumentaron la células apoptóticas y los leucocitos, con una alta proporción de linfocitos T, además, el parénquima tumoral ubicado alrededor de los vasos intratumorales se desorganizó y hubo un incremento de la fibrosis.

El TVT responde muy bien a la quimioterapia con sulfato de vincristina a dosis 0,03 mg/kg aplicada en forma intravenosa cada siete días, lográndose la remisión total entre 3 a 5 aplicaciones (Flores *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar proteínas AgNOR como indicadores de pronóstico tumoral en tres tipos de neoplasias de células redondas del canino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar, cuantificar y comparar el área de AgNOR de cada una de las neoplasias.
- Detectar, cuantificar y comparar el área inmunomarcada con un marcador específico de proliferación celular, de cada una de las neoplasias
- Relacionar los valores de AgNOR con los valores del marcador de proliferación celular, dentro de cada neoplasia.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL

Se utilizaron 9 tumores de TVT en fase progresiva, 7 histiocitomas, 9 mastocitomas grado 1 (G I), 9 mastocitomas grado 2 (G II), y 10 mastocitomas grado 3 (G III). Estos tumores, que fueron fijados con formalina al 10% e incluidos en parafina, provienen del archivo de biopsias, del Servicio de Anatomía Patológica, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

MÉTODO

De cada tumor se obtuvieron cortes de 4 μm de grosor los que fueron montados en portaobjetos albuminados y silanizados. Los cortes montados en portaobjetos albuminados fueron tratados con Hematoxilina-Eosina (HE), para la descripción histológica. En los mastocitomas se usó, además, el método de Azul de Toluidina (AT) para identificar los gránulos metacromáticos (ANEXO 1). Los cortes montados en portaobjetos silanizados se usaron para:

- 1.- Identificar las proteínas AgNOR, en todos los tumores, a través del método de plata según Trerè (2000). Los tiempos a utilizar fueron estandarizados para cada neoplasia (técnica AgNOR en ANEXO 2).
- 2.- Identificar el antígeno PCNA, en mastocitomas, para proliferación celular (técnica inmunohistoquímica en ANEXO 3).
- 3.- Identificar el antígeno Ki-67 para proliferación celular, en histiocitoma y TVT, para lo cual se utilizó el anticuerpo monoclonal anti Ki-67 (Monoclonal Mouse Anti-Human Ki67 Antigen, DAKO M 7240, Dinamarca). Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo biotinilado de conejo anti-ratón (Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins Biotin,

DAKO E0354, Dinamarca). Para amplificar la reacción enzimática se aplicó un conjugado de Estreptavidina / Peroxidasa (DAKO P0397, Dinamarca). La reacción enzimática se reveló con un sustrato-cromógeno Diaminobencidina (DAB, DAKO K3465, USA), que genera una reacción positiva de color café (técnica inmunohistoquímica en ANEXO 3).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

- 1.- Se hizo una descripción histológica de tumores tratados con HE, AT, AgNOR, PCNA y Ki-67.
- 2.- Se hizo una cuantificación del área ocupada por los gránulos metacromáticos, sólo en mastocitomas tratados con el método Azul de Toluidina, en 5 campos ópticos con un aumento 400X, 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).
- 3.- Para la cuantificación de proteínas AgNORs en todos los tumores, se midió el área ocupada por los gránulos argirófilos ubicados dentro del núcleo de las células tumorales, para lo cual se utilizó la misma metodología señalada anteriormente.
- 4.- Para la obtención de los resultados de PCNA (mastocitomas) y Ki-67 (histiocitoma y TVT) se midió el área ocupada por la inmunomarcación positiva (color café) en 5 campos ópticos, también a través del análisis morfométrico computacional descrito anteriormente.
5. En todos los tumores se evaluó: N° de puntos AgNOR, Localización de puntos AgNOR y Distribución de puntos AgNOR, para lo cual se observaron 50 células en cada tumor y se obtuvo el porcentaje promedio en cada grupo de neoplasias.
- 6.- Se obtuvieron microfotografías digitales y se tabularon los resultados.
- 7.- Análisis Estadístico:

7.1) Se hizo una asociación entre las áreas obtenidas con los métodos de AgNOR y Ki-67 (o PCNA) dentro de cada uno de los tumores. En los mastocitomas además, se establece la asociación de estas técnicas con AT. Para relacionar los resultados de los métodos señalados, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (ANEXO 4).

7.2) Se realizó Análisis de Varianza en los siguientes indicadores: área AT de mastocitomas, área PCNA de mastocitomas, área Ki-67 de histiocitoma y TVT, área de puntos AgNOR de mastocitomas, histiocitoma y TVT, número de puntos AgNOR en mastocitomas, histiocitoma y TVT, localización de puntos AgNOR en mastocitomas, histiocitoma y TVT, distribución de puntos AgNOR de mastocitomas, histiocitoma y TVT (ANEXO 5).

RESULTADOS

1.- DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES.

Mastocitoma G I: Con el método de HE las células tumorales presentan una densidad moderada, distribuyéndose mayoritariamente en hileras delimitadas por fibras de colágeno tipo I de color rosado (**Figura 1**). A mayor aumento, se observan células con núcleos redondos, nucléolos prominentes, discreta presencia de gránulos citoplasmáticos y abundantes células polimorfonucleares (**Figura 2**). Con el método de AT se destacan células tumorales grandes, redondas y poliédricas, con abundantes gránulos citoplasmáticos metacromáticos, que sólo permiten ver en algunas células un núcleo pálido con nucléolos basófilos (**Figura 3**). La detección de proteínas AgNOR muestra, en la mayoría de las células tumorales, la presencia de uno o dos puntos argirófilos por núcleo (**Figura 4**). La actividad proliferativa, estudiada con anticuerpo monoclonal anti PCNA, se detecta en algunos mastocitos, mientras que otros permanecen en estado quiescente (G0) (**Figura 5**).

Mastocitoma G II: Con HE se ve un aumento de células tumorales en dermis, delimitadas por escaso estroma tumoral (**Figura 6**). A mayor aumento se observa la presencia de células pleomórficas dispuestas entre fibras de colágeno tipo I (**Figura 7**). Con AT se observa que los granulos citoplasmáticos metacromáticos son menos abundantes que el mastocitoma G I (**Figura 8**). Con AgNOR la mayoría de los núcleos presenta dos o tres puntos argirófilos (**Figura 9**). Con PCNA se observa un incremento en la actividad proliferativa de los mastocitos entre células en fase G0 (**Figura 10**).

Mastocitoma G III: Con HE se ve un gran predominio de células tumorales dispuestas en amplias láminas delimitadas por escaso estroma tumoral (**Figura 11**). A mayor aumento, se destaca la presencia de células anaplásicas con variadas formas y tamaños celulares (anisocitosis) y nucleares (anisocariosis), con nucleolos prominentes; entre las células se

distribuyen escasas fibras colágenas tipo I, más finas que las observadas en los otros grados tumorales (**Figura 12**). Con AT la mayoría de las células tumorales carecen de gránulos citoplasmáticos metacromáticos o son muy escasos (**Figura 13**). Los núcleos de las células anaplásicas presentan una mayor reacción argirófila, destacándose por la variación en tamaño y número de puntos AgNOR (**Figura 14**). El método inmunohistoquímico con PCNA indica un claro incremento de la actividad proliferativa en los mastocitos transformados, los que se ven con una intensa inmunomarcación positiva, en la mayoría de ellos. (**Figura 15**).

Histiocitoma: Con HE se ve que las células tumorales se disponen en cordones irregulares, que se extienden desde la unión dermoepidérmica hasta la dermis profunda, observándose incluso células que infiltran la epidermis. Los histiocitos forman una masa tumoral de aspecto muy celular y compacto, con un estroma escaso con pocas fibras colágenas tipo I distribuidas en forma arremolinada entre las células. Las células tumorales contienen núcleos ovoides con citoplasma levemente eosinófilo, sin presencia de gránulos o vacuolas y con límites celulares mal definidos (**Figuras 16 y 17**). La mayoría de las células tumorales presentan entre uno y tres puntos AgNOR, aunque algunas llegan a tener hasta 5 gránulos argirófilos (**Figura 18**). La actividad proliferativa detectada con Ki-67 muestra a histiocitos intensamente inmunomarcados entre numerosas células en fase quiescente (**Figura 19**).

TVT: Con HE se observan células tumorales dispuestas en grupos rodeados de delgados tabiques de fibras colágenas tipo I, teñidas de color rosado, además se ven pequeñas áreas aisladas de infiltración linfocitaria alrededor de vasos sanguíneos (**Figura 20**). Las células son grandes, redondas o poliédricas, con núcleos bien marcados y nucléolos prominentes, de ubicación central o excéntrica, el citoplasma tiene aspecto vacuolado y débilmente teñido (**Figura 21**). La mayor parte de las células presentan sólo un punto argirófilo de gran tamaño, que correspondería al nucléolo (**Figura 22**). Con anticuerpo monoclonal anti Ki-67 algunas

células tienen núcleos intensamente inmunomarcados entre numerosas células quiescentes como se indica en la **Figura 23**.

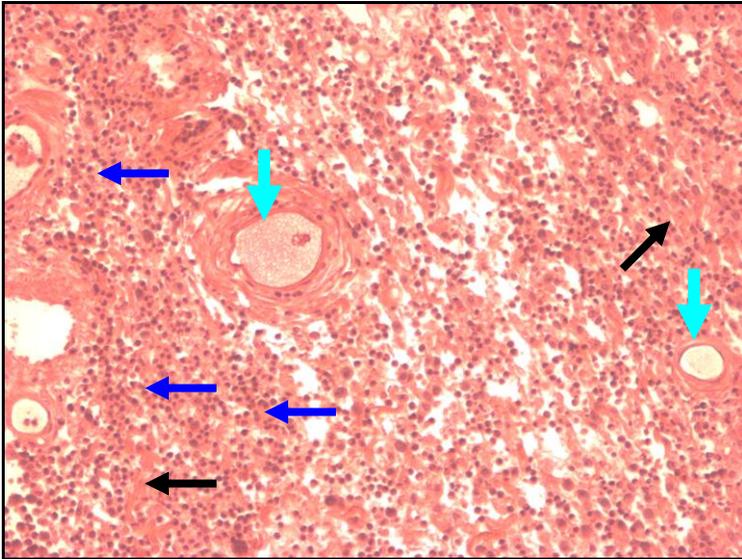


FIGURA 1: Mastocitoma G I.

Hileras de células tumorales (flechas azules), fibras de colágeno (flechas negras), vasos sanguíneos (flechas celestes).

Método HE 100X.

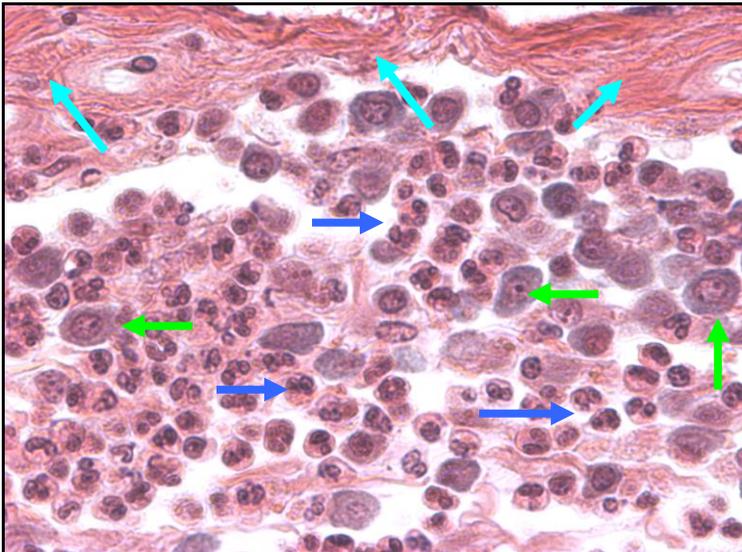


FIGURA 2: Mastocitoma G I.

Células tumorales con núcleo redondo y nucléolo excéntrico prominente, escasos gránulos citoplasmáticos (flechas verdes), estroma tumoral con fibras de colágeno (flechas celestes). Abundantes células polimorfonucleares, entre las células tumorales (flechas azules). Método HE 400X.

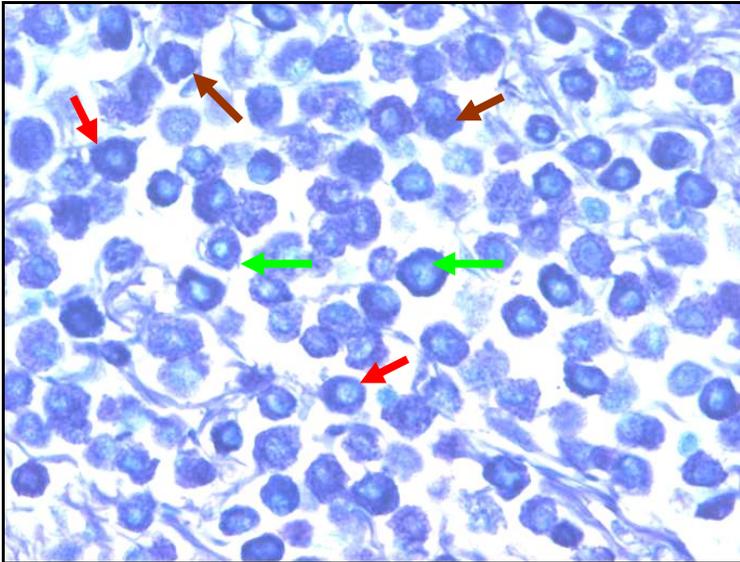


FIGURA 3: Mastocitoma G I

Mastocitos redondos (flechas rojas) y mastocitos poliédricos (flechas cafés), con abundantes gránulos citoplasmáticos metacromáticos y núcleos pálidos, algunos parcialmente ocultos por los gránulos (flecha verde).
Método AT pH 2,5 400X.

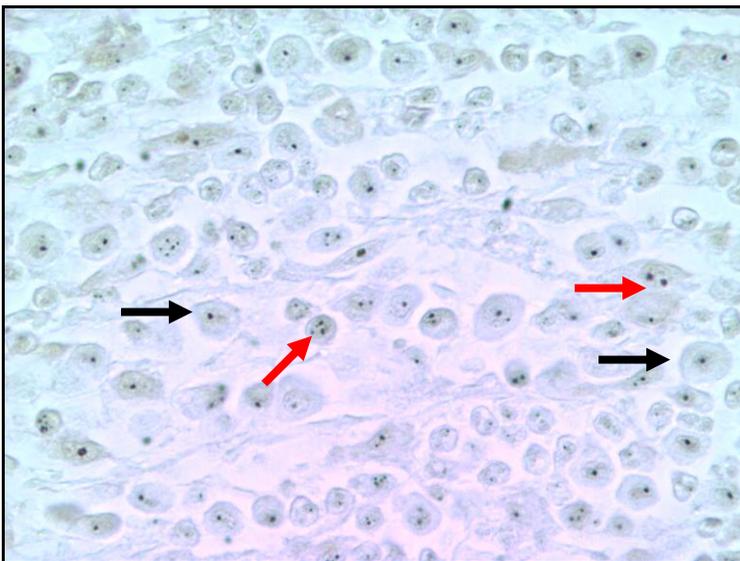


FIGURA 4: Mastocitoma G I

Núcleos con un punto argirófilo (flechas negras) y con dos puntos argirófilos (flechas rojas)
Método AgNOR 400X.

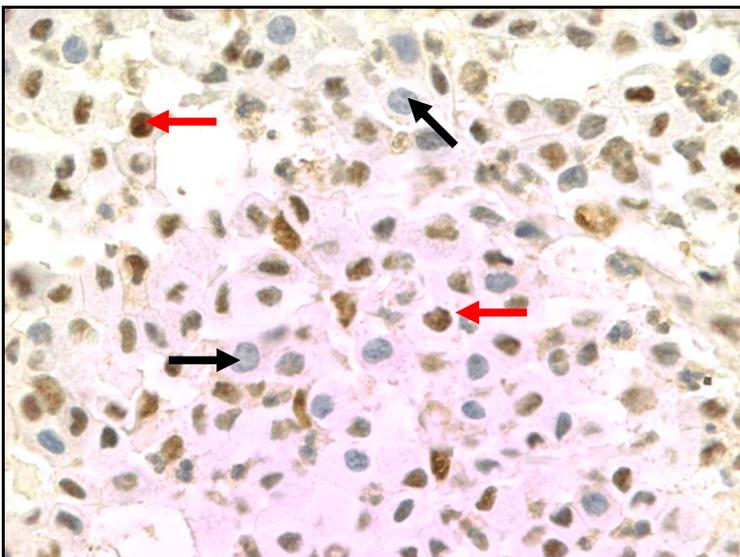


FIGURA 5: Mastocitoma G I

Núcleos marcados positivamente de color café (flechas rojas), núcleos quiescentes (flechas negras).
Método inmunohistoquímico anti-PCNA 400X.

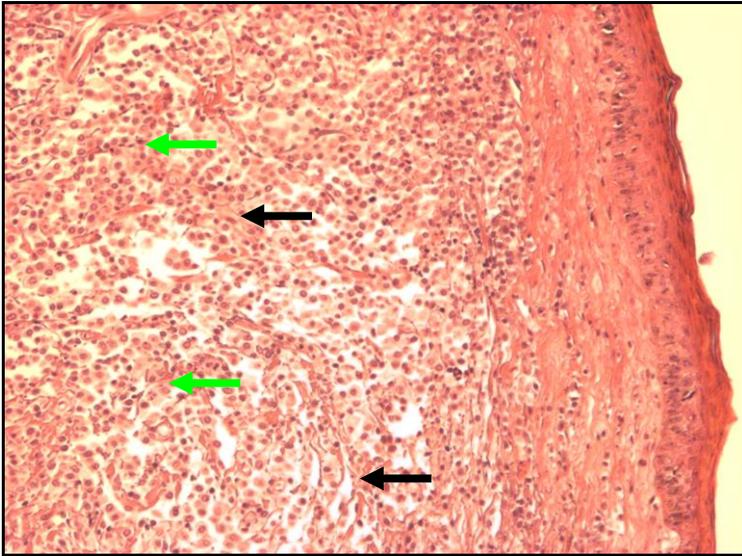


FIGURA 6: Mastocitoma G II

Abundantes células tumorales en dermis (flechas verdes), con escaso estroma tumoral (flechas negras).

Método HE 100X.

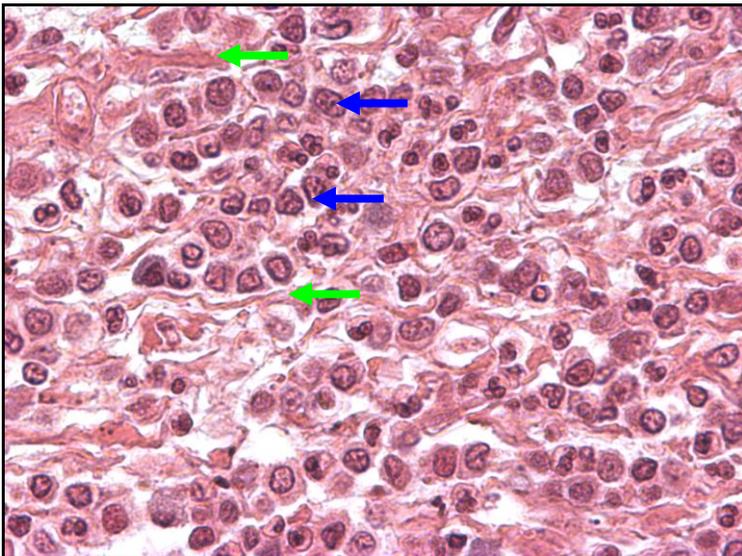


FIGURA 7: Mastocitoma G II.

Grupo de células tumorales, algunas pleomórficas (flecha azul), rodeados por delgadas fibras de colágeno tipo I (flechas verdes).

Método HE 400X

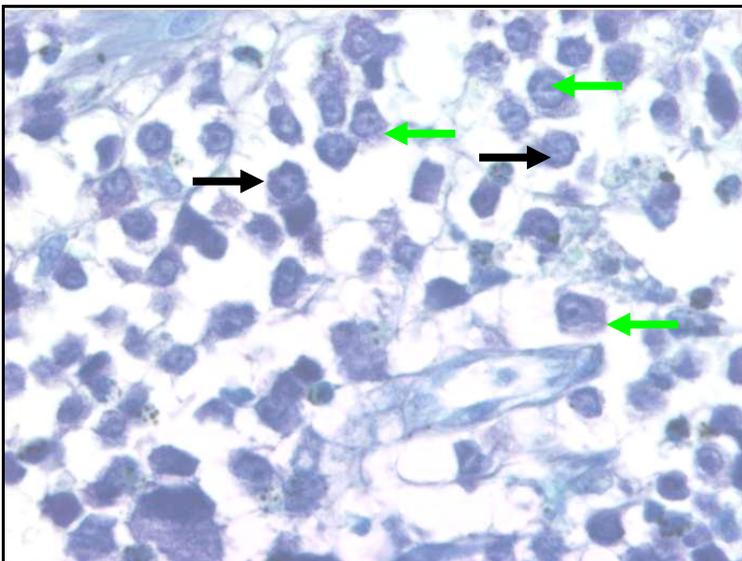


FIGURA 8: Mastocitoma G II

Gránulos citoplasmáticos metacromáticos escasos (flechas negras), Mastocitos con formas y tamaños variados (flechas verdes).

Método AT pH 2,5 400X.

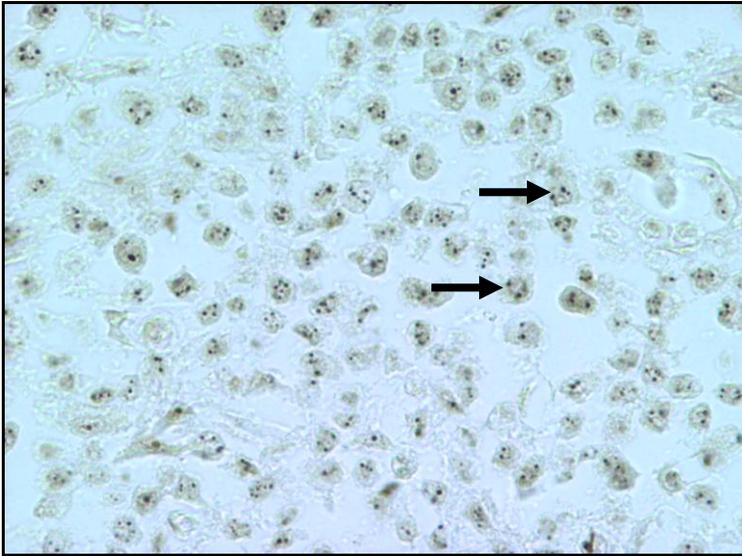


FIGURA 9: Mastocitoma G II.

Núcleos con dos puntos argirófilos (flechas negras).
Método AgNOR. 400X

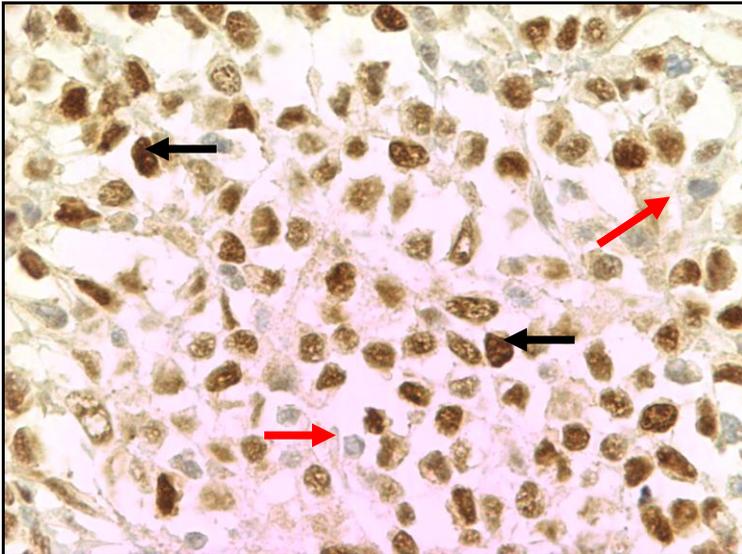


FIGURA 10: Mastocitoma G II

Mayor número de mastocitos inmunomarcados (flechas negras) en relación al mastocitoma G I. Escasas células en G 0 (flechas rojas).
Método inmunohistoquímico anti-PCNA 400X.

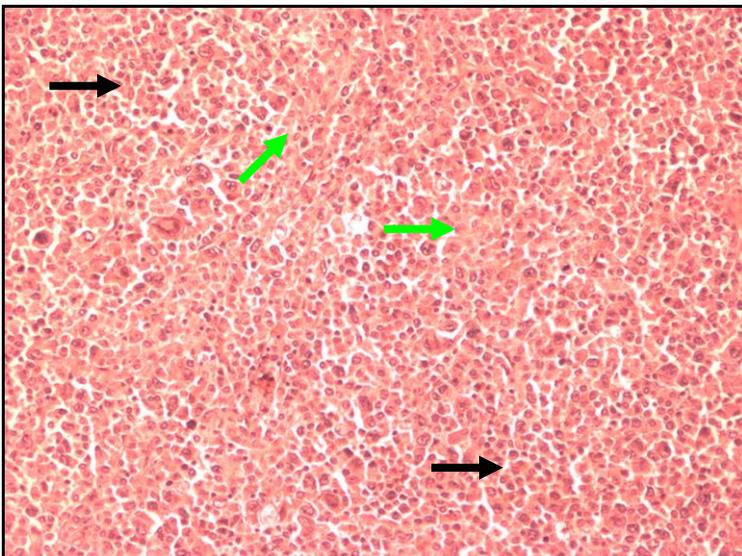


FIGURA 11: Mastocitoma G III

Láminas de células tumorales (flechas negras) y escaso estroma tumoral (flechas verdes).
Método HE 100X.

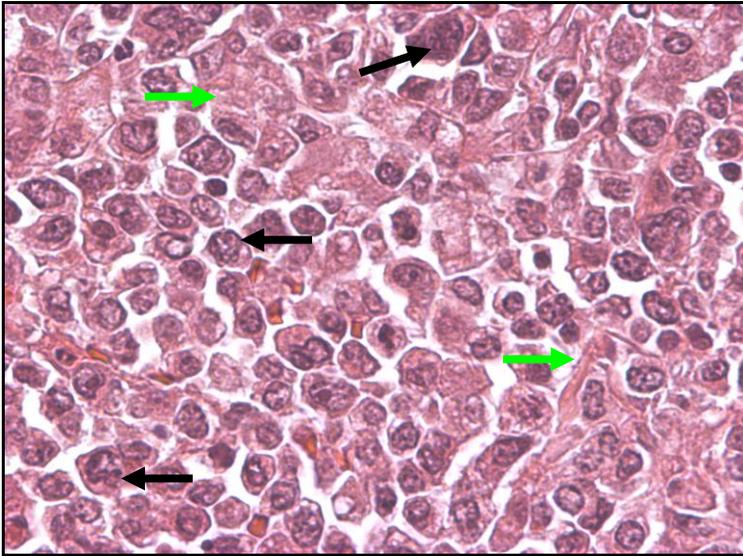


FIGURA 12: Mastocitoma G III

Células anaplásicas con pleomorfismo marcado (flechas negras) y escasas fibras colágenas (flechas verdes).
Método HE 400X.

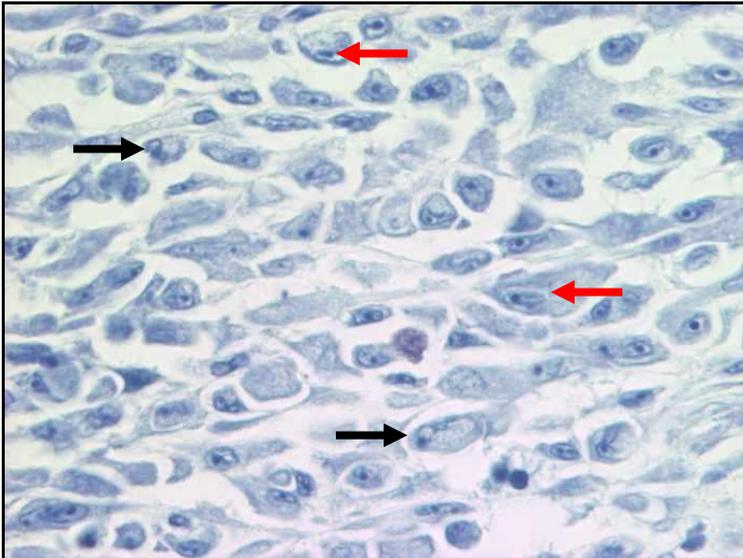


FIGURA 13: Mastocitoma G III

Predominio de células pleomórficas (Flechas rojas), gránulos citoplasmáticos metacromáticos muy escasos (flechas negras).
Método AT pH 2,5. 400X.

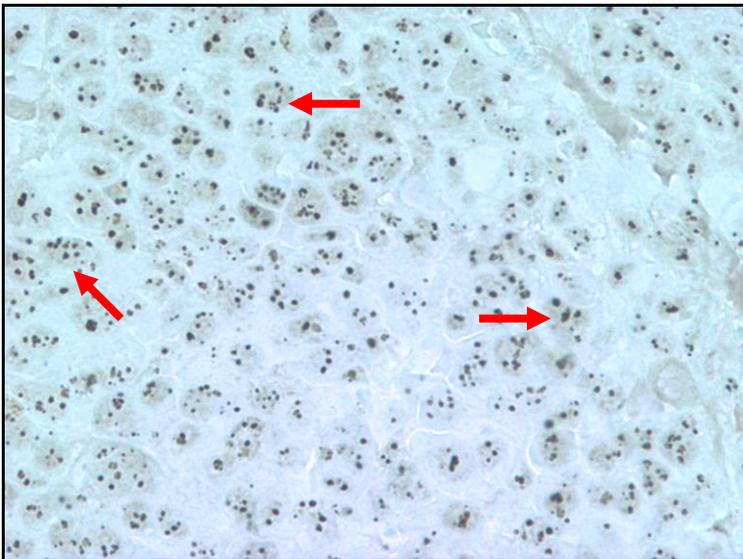


FIGURA 14: Mastocitoma G III

Núcleos con numerosos puntos argirófilos (flechas rojas). Método AgNOR 400X.

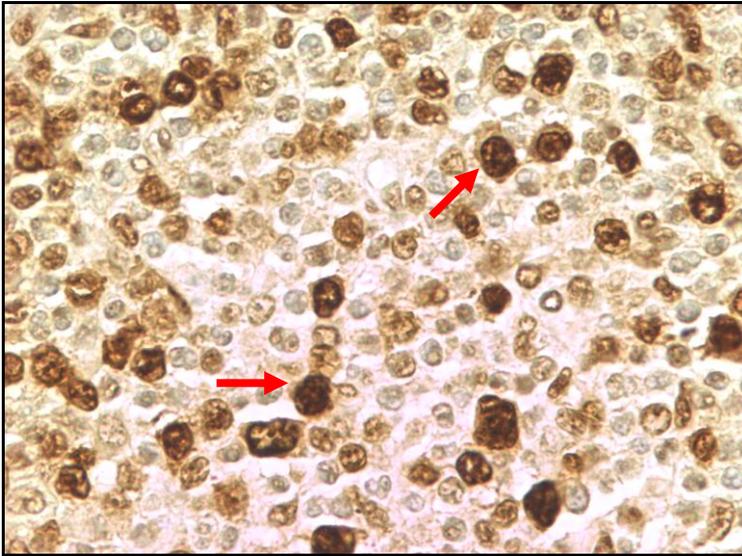


FIGURA 15: Mastocitoma G III

Intensa inmunomarcación positiva (flechas rojas). Método inmunohistoquímico anti-PCNA 400X

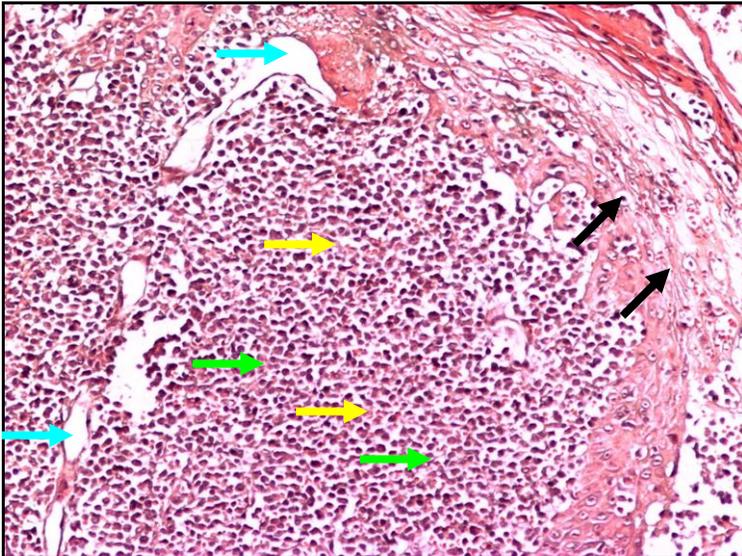


FIGURA 16: Histiocitoma

Abundantes células tumorales formando masas y cordones irregulares en dermis (flechas verdes). Células tumorales infiltrando epidermis (flechas negras). Escasas fibras colágenas se ubican entre los histiocitos (flechas amarillas). Vasos sanguíneos (flechas celestes) Método HE 100X.

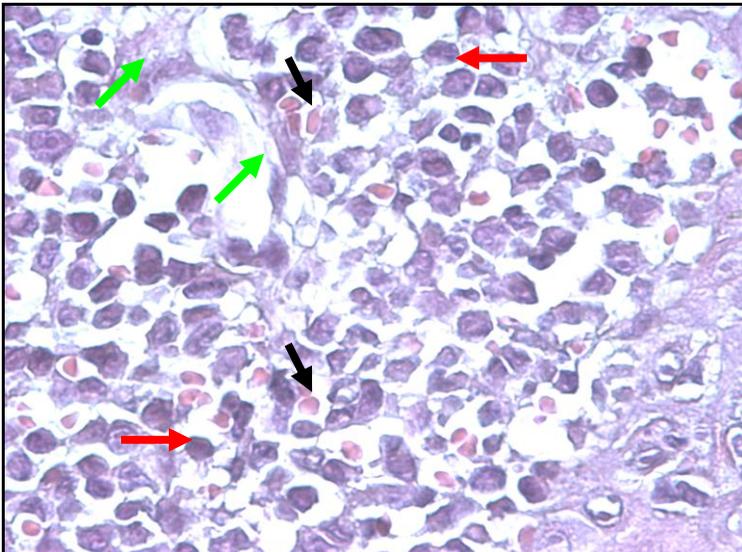


FIGURA 17: Histiocitoma

Presencia de histiocitos en gran parte del campo, con núcleos ovoides, sin gránulos ni vacuolas y con límites celulares indefinidos (flechas rojas), escasas fibras colágenas (flechas verdes). Glóbulos rojos (flechas negras) Método HE 400X.

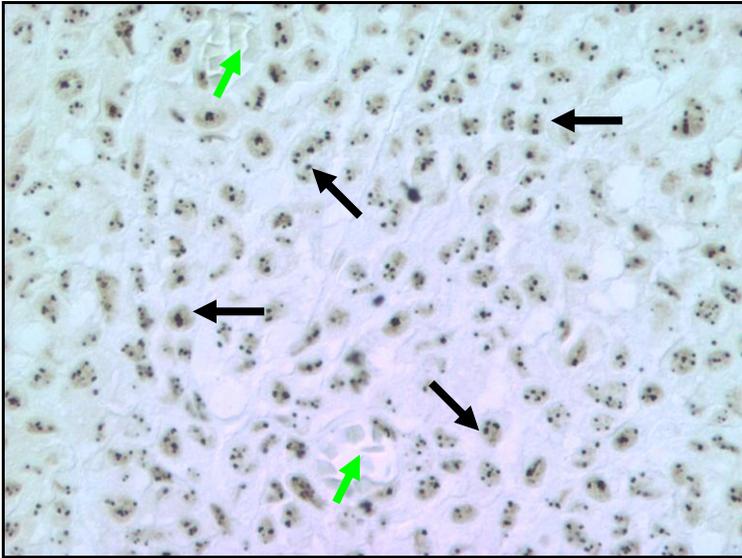


FIGURA 18: Histiocitoma
 Núcleos con distinto número de puntos argirófilos (flechas negras). Vasos sanguíneos (flechas verdes)
 Método AgNOR 400X.

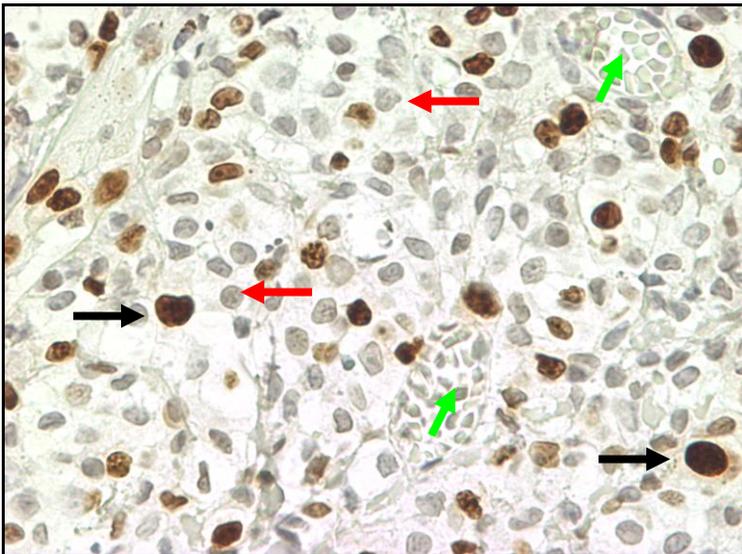


FIGURA 19: Histiocitoma
 Histiocitos intensamente inmunomarcados (flechas negras), histiocitos quiescentes (flechas rojas). Vasos sanguíneos (flechas verdes)
 Método inmunohistoquímico anti Ki-67 400X.

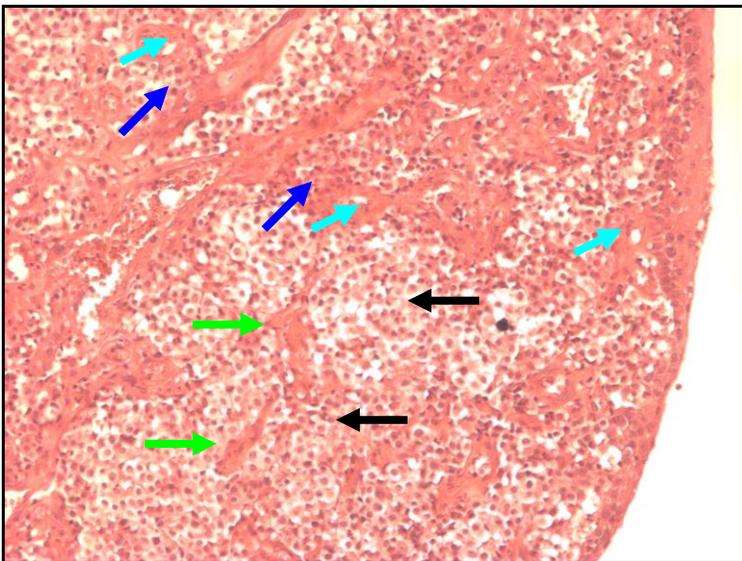


FIGURA 20: TVT
 Grupos de células tumorales (flechas negras) rodeados por irregulares tabiques de fibras colágenas (flechas verdes). Leve infiltración linfocitaria (flechas azules). Vasos sanguíneos arteriulares (flechas celestes)
 Método HE 100X.

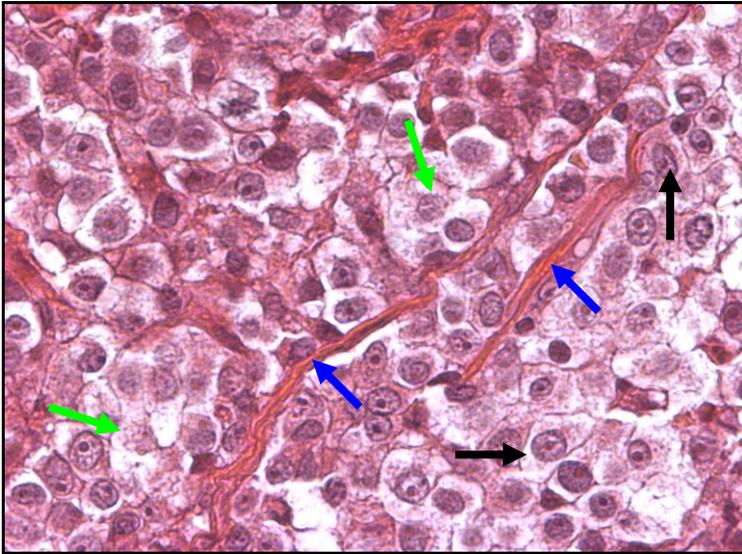


FIGURA 21: TVT

Célula tumoral redonda con núcleo marcado y nucléolo central prominente (flechas negras), presencia de vacuolas citoplasmáticas (flechas verdes), fibras colágenas (flechas azules). Método HE 400X.



FIGURA 22: TVT

Células tumorales con un punto argirófilo de gran tamaño correspondiente al nucléolo (flechas rojas). Método AgNOR 400X.

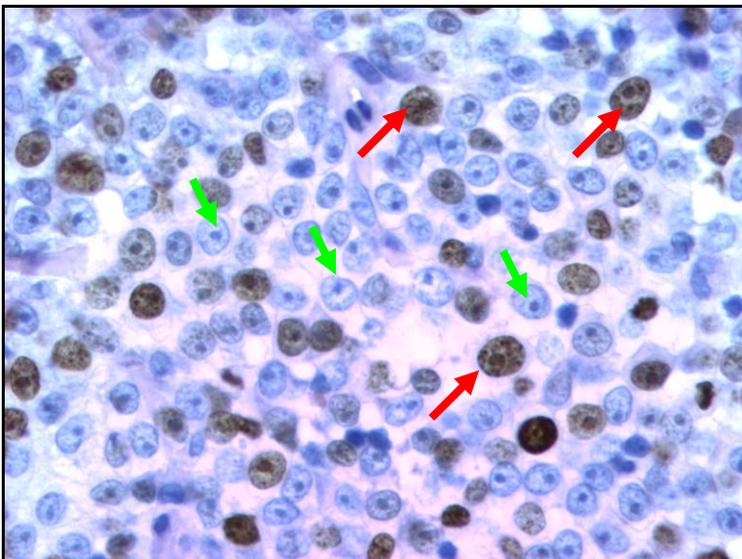


FIGURA 23: TVT

Núcleos inmunomarcados (flechas rojas). Núcleos de células quiescentes (flechas verdes). Método inmunohistoquímico anti Ki-67 400X.

2.- COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON (tabla en ANEXO 4).

1.- Histiocitoma: Al evaluar el grado de asociación entre las áreas promedio obtenidas con las técnicas AgNOR y Ki-67, se obtuvo una correlación no significativa: Coeficiente Pearson.= -0.58. (p= 0,18).

2.- TVT: Al evaluar el grado de asociación entre las áreas promedio obtenidas con las técnicas AgNOR y Ki-67, se obtuvo una correlación no significativa: Coeficiente Pearson=0,32. (p=0,4).

3.- Mastocitoma: se establecieron 3 asociaciones para cada grado: AT/AgNOR, AT/PCNA, AgNOR/PCNA.

3.1) Mastocitoma G I

- AT/AgNOR: Coef. Pearson=0,46. (p=0,18). Correlación no significativa.
- AT/PCNA: Coef Pearson =0,14. (p=0,71). Correlación no significativa.
- AgNOR/PCNA: Coef Pearson =0,46. (p=0,21). Correlación no significativa.

3.2) Mastocitoma G II

- AT/AgNOR: Coef. Pearson =0,75. (p=0,02). Correlación significativa.
- AT/PCNA: Coef. Pearson =0,7. (p=0,02). Correlación significativa.
- AgNOR/PCNA: Coef. Pearson =0,58. (p=0,1). Correlación no significativa.

3.3) Mastocitoma G III

- AT/AgNOR: Coef. Pearson =0,02. (p=0,96). Correlación no significativa.
- AT/PCNA: Coef. Pearson =0,41. (p=0,24). Correlación no significativa.
- AgNOR/PCNA: Coef. Pearson=0,11. (p=0,76). Correlación no significativa.

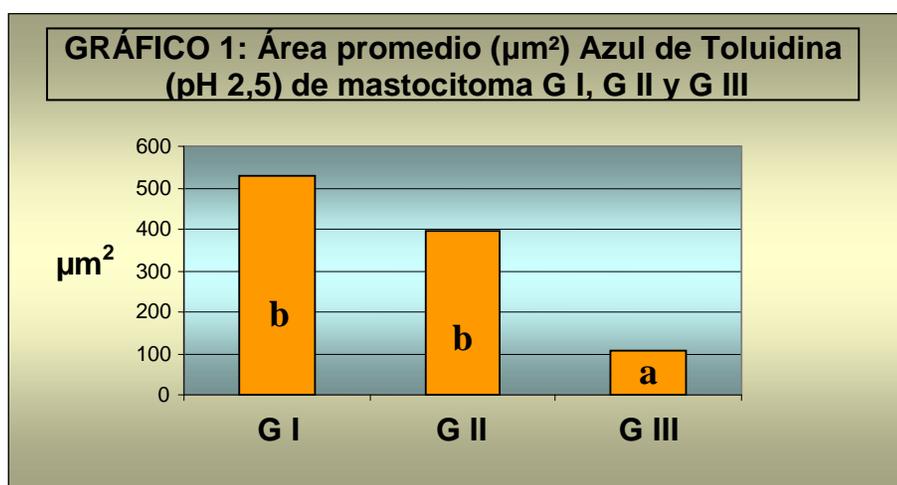
3.- MORFOMETRÍA CON ANÁLISIS DE VARIANZA (ANEXO 5.1).

a) Área AT en mastocitomas:

El área promedio de gránulos metacromáticos con Azul de Toluidina de los mastocitomas G I fue de 530,85 μm^2 , siendo estadísticamente igual que el promedio de los mastocitomas G II (396,62 μm^2). Sin embargo, el promedio de los tumores G III (107,92 μm^2) fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) que el de los tumores G I y G II. (Tabla 1 y Gráfico 1).

TABLA 1
Área promedio (μm^2) de gránulos metacromáticos con Azul de Toluidina (pH 2,5) de mastocitomas G° I, G° II y G° III

tumor G I	AREA AT (μm^2)	Tumor G II	AREA AT (μm^2)	tumor G III	AREA AT (μm^2)
1	436,37	1	408,49	1	225,22
2	252,93	2	578,20	2	124,79
3	690,92	3	348,59	3	96,86
4	625,81	4	404,73	4	170,80
5	607,98	5	382,09	5	45,30
6	705,60	6	504,37	6	29,81
7	581,79	7	450,43	7	131,29
8	293,93	8	258,40	8	52,19
9	322,70	9	362,62	9	147,32
10	790,47	10	268,29	10	55,59
Sumatoria	5308,50		3966,20		1079,17
Promedio	530,85±190,54 b		396,62±98,28 b		107,92±63,32 a

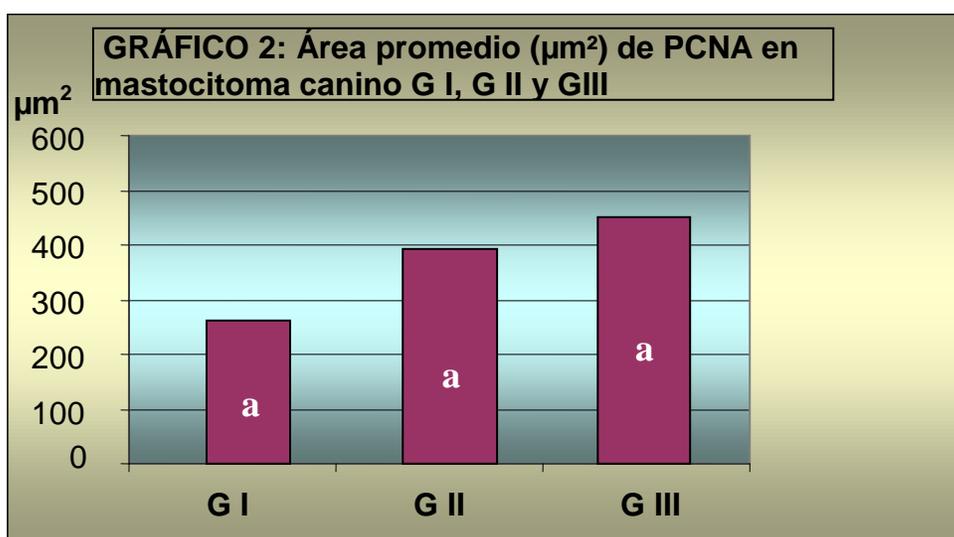


Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

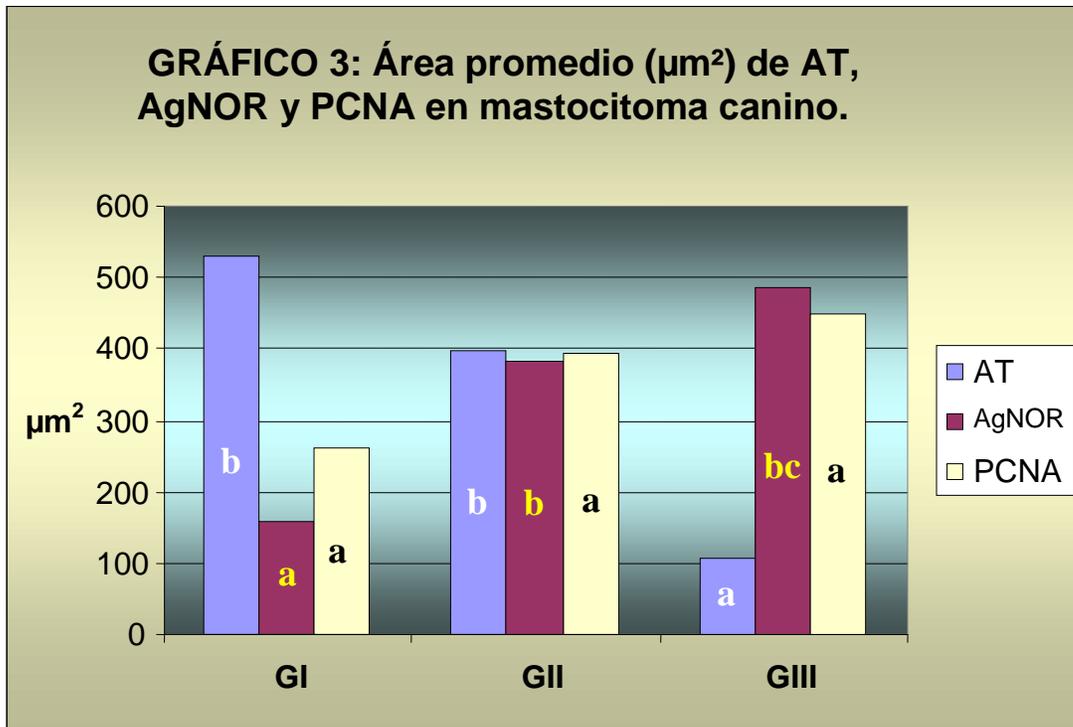
b) Área PCNA en Mastocitomas:

Las áreas promedio inmunomarcadas con PCNA en mastocitomas, no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p \geq 0,05$). (Tabla 2 y Gráfico 2).

TABLA 2			
Área promedio (μm^2) de proliferación celular (PCNA) en mastocitoma canino			
Nº tumor	Mastocitoma G° I	Mastocitoma G° II	Mastocitoma G° III
1	NC*	471,72	688,11
2	275,41	1291,66	656,02
3	198,78	273,25	361,49
4	269,33	340,56	342,39
5	259,77	428,55	695,88
6	337,54	258,74	357,43
7	417,32	207,91	566,38
8	297,43	189,74	207,52
9	95,03	311,91	401,56
10	210,66	158,11	227,28
Sumatoria	2361,26	3932,15	4504,06
Promedio	262,36±90,72	393,22±331,24	450,41±186,15
	a	a	a



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). NC*=No Codificado.



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

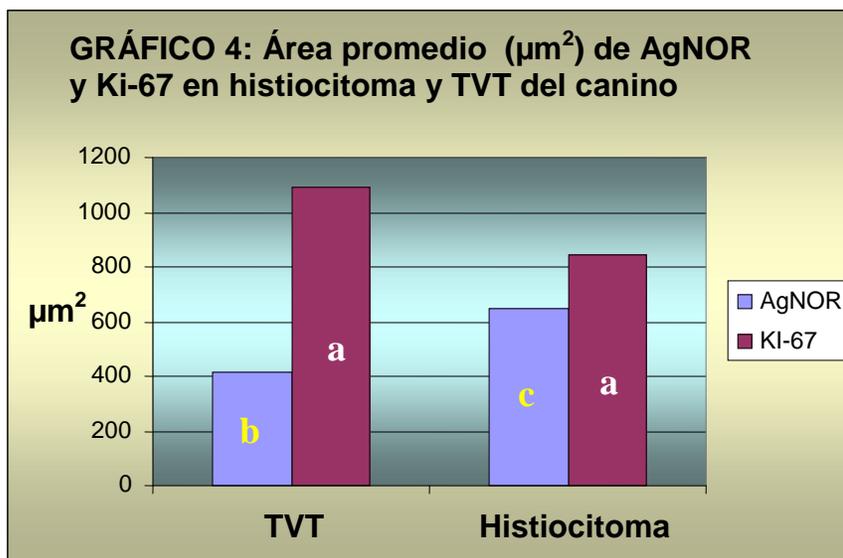
El Gráfico 3 resume los resultados de las tres técnicas realizadas en los tres grados de mastocitoma canino: AT, AgNOR y PCNA. El área AT del mastocitoma G III fue significativamente menor que el G I y G II ($p \leq 0,05$). Por su parte, el área AgNOR del mastocitoma G I fue significativamente menor que el G II y G III ($p \leq 0,05$). Los valores de área PCNA no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los distintos grados.

c) Área Ki-67 en Histiocitoma y TVT:

Las áreas promedio inmunomarcadas con Ki-67 en histiocitoma y TVT, no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p \geq 0,05$). (Tabla 3). En el gráfico 4 se muestra además, el área AgNOR de estos tumores.

TABLA 3
Área promedio (μm^2) de proliferación celular (Ki-67) en histiocitoma y TVT del canino

Nº tumor	Histiocitoma	TVT
1	541,21	1649,42
2	571,86	619,44
3	119,03	822,61
4	1379,83	553,1
5	921,51	1737,32
6	1433,52	1687,83
7	933,1	895,2
8		1110,6
9		722,6
10		
Sumatoria	5900,06	9798,12
Promedio	842,87\pm472,57 a	1088,68\pm480,09 a



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

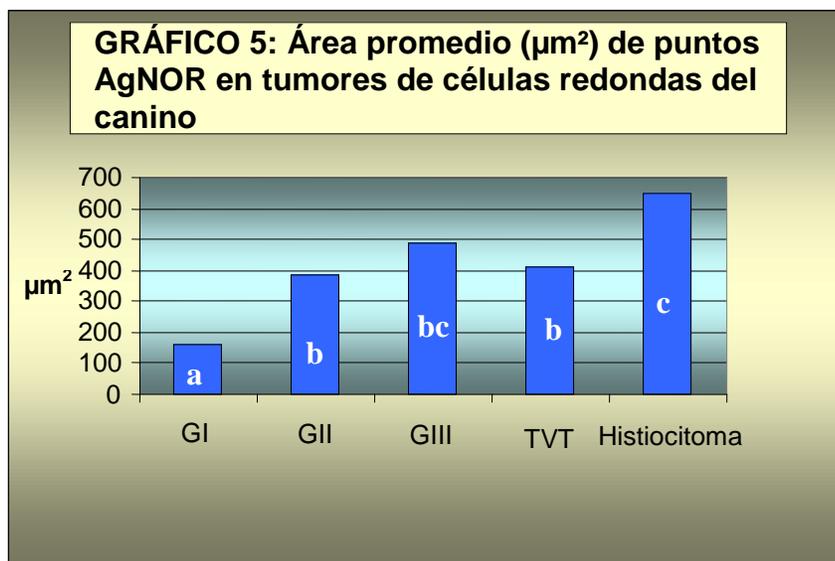
d) Área de puntos AgNOR en Mastocitomas, Histiocitoma y TVT:

En la Tabla 4 y Gráfico 5 se muestran los resultados del área de puntos AgNOR en todos los tumores estudiados, siendo el mastocitoma GI el que presentó el área estadísticamente menor ($159,58 \pm 74,59$) ($p \leq 0,05$) en relación a los otros tumores, mientras que

el histiocitoma registró el valor más alto ($647,22 \pm 119,18$) siendo significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el mastocitoma GI, GII y TVT.

TABLA 4
Área promedio (μm^2) de puntos AgNOR en tumores de células redondas del canino

Nº tumor	Mastocitoma G I	Mastocitoma G II	Mastocitoma G III	Histiocitoma	TVT
1	142,16	336,23	382,91	594,44	334,76
2	109,34	719,64	591,23	738,42	294,13
3	205,94	NC*	484,55	854,25	312,47
4	188,98	281,52	460,30	603,87	318,87
5	124,57	214,79	309,07	598,88	654,33
6	100,49	417,81	873,86	657,57	414,66
7	333,40	655,39	631,55	483,08	523,43
8	101,33	354,04	69,13		320,76
9	92,53	367,58	610,90		571,69
10	197,11	100,71	449,73		395,32
Sum.	1595,85	3447,69	4863,24	4530,51	4140,42
Prom.	159,58\pm74,59 a	383,08\pm196,94 b	486,32\pm214,99 bc	647,22\pm119,18 c	414,04\pm126,34 b



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). NC*=No Codificado.

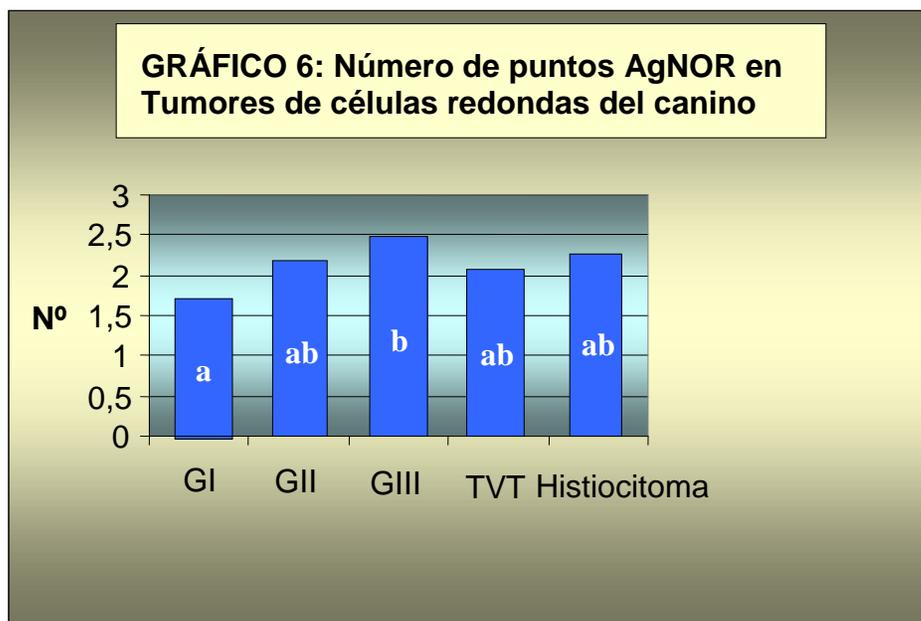
4.- OTROS INDICADORES CON ANÁLISIS DE VARIANZA (ANEXO 5.2)

a) Número de puntos AgNOR en Mastocitomas, Histiocitoma y TVT:

En la Tabla 5 y Gráfico 6 se observa que sólo hubo diferencias significativas entre el número de puntos AgNOR del mastocitoma G I ($1,74\pm 0,26$) y el del mastocitoma G III ($2,48\pm 0,73$).

TABLA 5
Número de puntos AgNOR promedio en tumores de células redondas del canino

Nº tumor	Mastocitoma GI	Mastocitoma GII	Mastocitoma GIII	Histiocitoma	TVT
1	1,54	1,54	2,46	2,06	2,04
2	1,46	2,68	2,2	2,32	1,86
3	1,86	NC*	2,12	2,16	2,14
4	1,92	2,16	2,1	3,04	1,7
5	1,74	2,16	2,34	1,8	2,7
6	1,76	1,92	2,96	2,22	1,78
7	2,18	2,92	2,74	2,26	2,38
8	1,3	2,84	1,36		1,88
9	1,66	1,76	4,18		2,08
10	1,94	1,73	2,32		2,1
Sumatoria	17,36	19,71	24,78	15,86	20,66
Promedio	$1,74\pm 0,26$ a	$2,19\pm 0,51$ ab	$2,48\pm 0,73$ b	$2,27\pm 0,38$ ab	$2,07\pm 0,3$ ab



Letras distintas indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$). NC*=No Codificado.

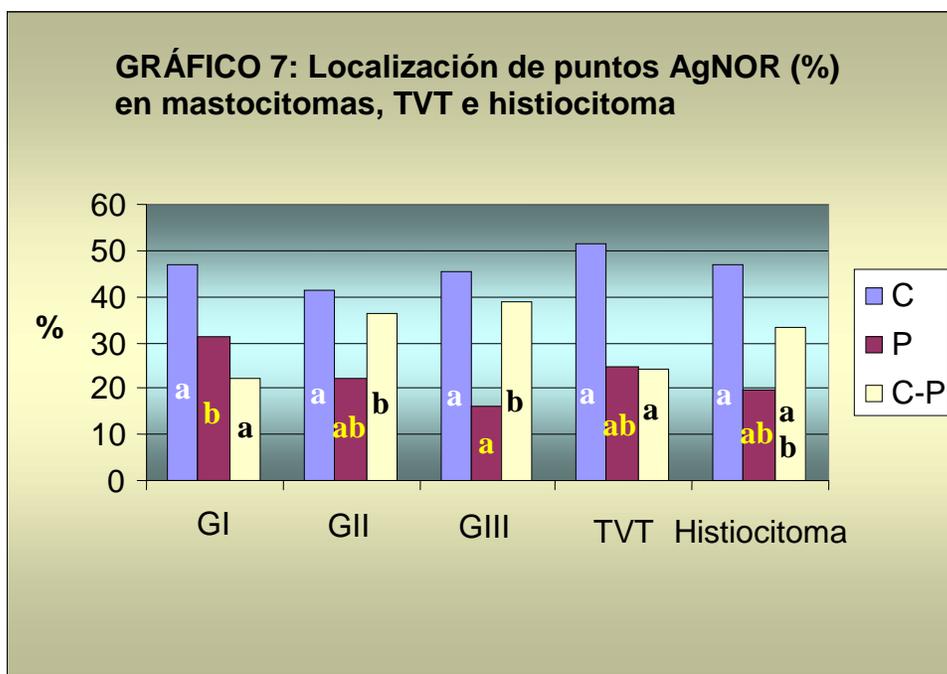
b) Localización de puntos AgNOR. en Mastocitomas, Histiocitoma y TVT:

En la Tabla 6 y Gráfico 7 se muestran los patrones de localización de puntos AgNOR en todos los tumores evaluados. En la tabla aparecen los porcentajes promedio de cada grupo de tumores.

TABLA 6: Porcentaje (%) de núcleos con puntos AgNOR de localización central (C), periférica (P) y central-periférica (CP) en los tumores evaluados.

Tumor	Central (C)	Periférica (P)	Central-Periférica (CP)
Mastocitoma G° I	46,8 a	31,2 b	22 a
Mastocitoma G° II	41,5 a	22 ab	36,5 b
Mastocitoma G° III	45,2 a	16 a	38,8 b
Histiocitoma	47,1 a	19,7 ab	33,1 ab
TVT	51,2 a	24,8 ab	24 a

Letras distintas en cada columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).



C=Central P=Periférica C-P=Central-Periférica

c) Distribucion de puntos AgNOR en Mastocitomas, Histiocitoma y TVT:

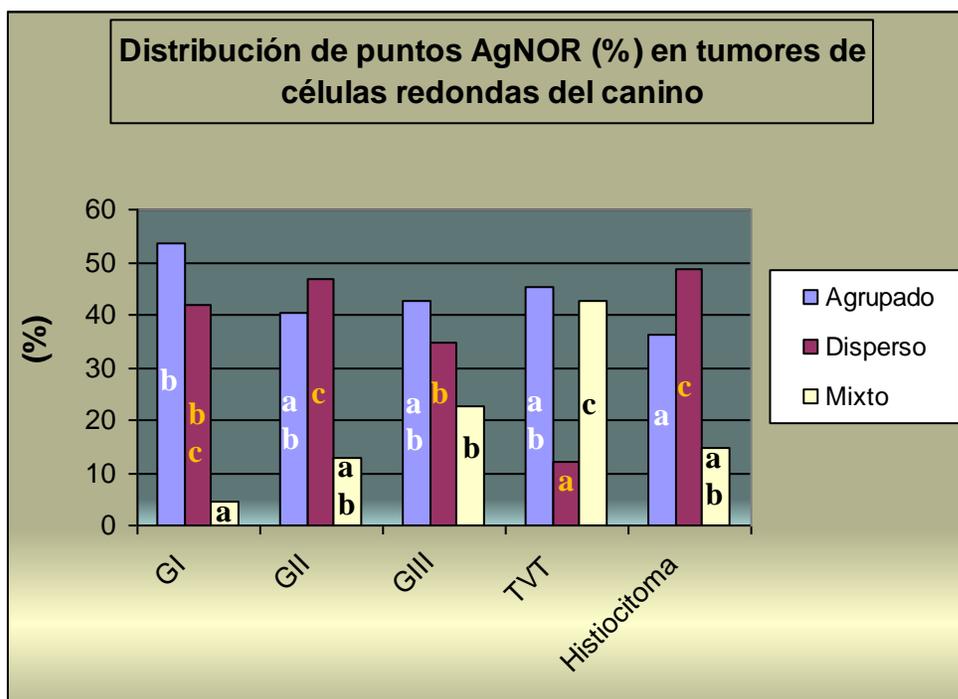
En la Tabla 7 y Gráfico 8 se muestran los patrones de distribución de puntos AgNOR en todos los tumores evaluados. En la tabla aparecen los porcentajes promedio de cada grupo de tumores.

TABLA 7: Porcentaje (%) de núcleos con puntos AgNOR de distribución agrupada (A), dispersa (D) y mixta (M) en los tumores evaluados.

Tumor	Agrupada (A)	Dispersa (D)	Mixta (M)
Mastocitoma G° I	53,6 b	42 bc	4,4 a
Mastocitoma G° II	40,2 ab	46,8 c	13 ab
Mastocitoma G° III	42,6 ab	34,8 b	22,6 b
Histiocitoma	36,3 a	48,9 c	14,9 ab
TVT	45,4 ab	12 a	42,6 c

Letras distintas en cada columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

GRAFICO 8



DISCUSIÓN

En esta memoria se estudió la actividad proliferativa en tres neoplasias de células redondas del canino de presentación frecuente (mastocitoma, histiocitoma y TVT), a través de la aplicación de anticuerpos nucleares monoclonales de proliferación celular y de proteínas argirófilas (AgNOR) de regiones organizadoras nucleolares.

Para determinar el pronóstico del mastocitoma canino, el conocimiento del grado histológico es un parámetro importante para el médico veterinario, ya que este grado se correlaciona con el comportamiento biológico del tumor (Goldschmidt y Hendrick, 2002). La aplicación del método de HE, usado rutinariamente en laboratorios de histopatología y en esta memoria, no permite visualizar la metacromasia de los gránulos de los mastocitos, dificultando el diagnóstico diferencial entre los tres grados del mastocitoma e incluso, es posible confundir esta neoplasia con otros tumores de células redondas. Por el contrario, el método AT utilizado en este trabajo, permitió discriminar bien el grado de diferenciación del tumor a través de la reacción metacromática, demostrando, que a mayor grado de anaplasia, menor es la cuantificación de esta reacción. Esto se respalda con los resultados obtenidos en otra memoria realizada en forma paralela a este trabajo, donde se estudiaron, en forma retrospectiva, 59 biopsias de mastocitomas cutáneos caninos, diagnosticados previamente sólo con HE, de los cuales el 20% y el 32% de tumores G II cambiaron a G I y G III respectivamente, al aplicar el método de azul de toluidina (¹). Esto es consistente con lo indicado por Simoes y Schoning (1994), Lavallo *et al.*, (2003) y por Rech *et al.*, (2004) quienes dicen, que aunque el mastocitoma bien diferenciado puede ser diagnosticado en preparaciones histológicas de rutina (HE), es necesario el uso de tinciones especiales como azul de toluidina para realizar el diagnóstico diferencial del tumor.

¹ Castillo C.(2008), datos no publicados de Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario.

La disminución significativa observada en nuestros resultados del área promedio de los gránulos metacromáticos teñidos con AT del mastocitoma G III en relación al G I y G II demuestra la falta de diferenciación o el carácter anaplásico del G III. Esto se debería a una considerable disminución de los mediadores presentes en los gránulos de los mastocitos como heparina y condroitín sulfato, glicosaminoglicanos (GAGs) que poseen un alto contenido de grupos sulfatados (Frisell, 1982; Viglioglia, 2004). Según lo expresado por Pearse (1985), estas moléculas interactúan con colorantes del grupo de las tiazinas como el AT, dando una reacción metacromática de azul a los tonos rojos, tras reaccionar con un componente tisular, denominado cromotropo, que contiene altas concentraciones de polianiones (glicosaminoglicanos sulfatados), donde la molécula del colorante se polimeriza y sus propiedades de absorción de luz son diferentes a las moléculas individuales. De esta forma, la metacromasia refleja la gran cantidad de cargas aniónicas muy cercanas unas a otras, que caracteriza a los componentes de los gránulos de los mastocitos bien diferenciados, como los observados en el mastocitoma G I, a diferencia del G III, cuya metacromasia se encontró significativamente reducida. Esta disminuida reacción metacromática reflejaría la falta de producción o de almacenamiento de mediadores en gránulos citoplasmáticos, como consecuencia de la transformación neoplásica de los mastocitos, que adquieren características de células indiferenciadas. Nuestros resultados son consistentes con lo expresado por Simoes y Schoning (1994), quienes informan que las propiedades tintoriales de los mastocitos están asociadas con el número y tamaño de los gránulos citoplasmáticos y con el grado de diferenciación celular. Según estos autores, los tumores mal diferenciados tienen una menor concentración de heparina y posiblemente otros GAGs, que son los principales productos que interactúan con los colorantes histoquímicos. De la misma forma, Rech *et al.*, (2004)

describieron, en mastocitoma G III, sólo una metacromasia leve a moderada, al ser comparados con los otros dos grados.

Los resultados de todos los tumores estudiados, en relación al recuento de puntos AgNOR, mostraron que sólo el mastocitoma G III fue estadísticamente mayor que el G I, y se podría deducir, que la alta actividad proliferativa del G III, se asociaría, en este tumor, a malignidad y mal pronóstico. Situación similar describen Rech *et al.*, (2004), quienes también encontraron sólo diferencias entre el G I v/s G III, (G I: $1,5 \pm 0,19$, G II: $1,85 \pm 0,9$, G III: $3,25 \pm 0,6$). Sin embargo, Giraldo *et al.*, (2003a), sostienen que hay diferencias estadísticas entre los tres grados, a pesar de las altas desviaciones estandar registradas por ellos (G I: $2,82 \pm 1,86$, G II: $3,18 \pm 1,78$, G III: $3,75 \pm 2,28$).

Por otra parte, los histiocitomas cutáneos caninos, considerados entre los tumores benignos, presentaron un recuento AgNOR similar a lo registrado en los tres grados de mastocitomas y en el TVT. Hay que considerar, que tanto el TVT como el mastocitoma GIII, son clasificados como neoplasias malignas, siendo este último, a diferencia de TVT, altamente anaplásico. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Giraldo *et al.* (2003b), quienes no encontraron diferencias significativas en el número de puntos AgNOR entre tumores mixtos mamarios malignos y benignos en caninos. Sin embargo, hay discrepancia con lo indicado por Palomo-González *et al.* (2002), ya que ellos detectaron diferencias significativas en el recuento AgNOR entre adenomas foliculares tiroídeos benignos ($1,97 \pm 0,43$) y carcinomas foliculares tiroídeos malignos ($2,51 \pm 0,53$). De la misma forma, Raymond y Leong (1989) encontraron diferencias significativas entre el recuento AgNOR de lesiones benignas de mama (2,05) y el de neoplasias malignas de mama (5,46). Del resultado de estos autores, se podría deducir que hay una proporcionalidad directa entre recuento AgNOR y malignidad. Sin embargo, nuestros resultados señalarían, que un mayor recuento

AgNOR estaría más asociado a una mayor velocidad de proliferación que a un comportamiento maligno, coincidiendo con lo expresado por Giraldo *et al.* (2003b), quienes consideran la expresión de AgNORs como un indicador de actividad proteica.. También, Giri *et al.* (1989) trabajando en lesiones humanas benignas y malignas de mama, encontraron sobreposición en los recuentos AgNOR entre epiteliosis y carcinoma intraductal. Se podría deducir, por tanto, que el recuento AgNOR no siempre presenta la claridad esperada en relación a la caracterización de una neoplasia benigna v/s maligna. En esta memoria, el recuento de puntos AgNOR se ejecutó en forma manual, similar a lo realizado por autores como Palomo-González *et al.* (2002), Rech *et al.* (2004). Sin embargo, y a pesar de que esta forma de cuantificación ha sido ampliamente utilizada, Trerè (2000) advierte que el método podría ser subjetivo y poco reproducible, puesto que a veces, es difícil discriminar entre puntos que se encuentran muy próximos o parcialmente superpuestos. De esta forma, se debe tener cautela durante la interpretación de los resultados, considerando a esta técnica como un complemento al diagnóstico histopatológico (Smith y Crocker, 1988).

Los resultados obtenidos del área (μm^2) promedio AgNOR en mastocitomas, que indicó diferencias significativas sólo entre las áreas AgNOR de G I v/s G II y G I v/s G III, se debería probablemente, de acuerdo a lo informado por Scase *et al.* (2006), al carácter heterogéneo del G II, que exhibe una variación considerable en el comportamiento biológico. Sin embargo, nuestros resultados discrepan de lo descrito por Giraldo *et al.* (2003a), quienes señalan haber encontrado diferencias significativas en el área de AgNOR entre los 3 grados histológicos de mastocitomas, pero con amplias desviaciones estándar.

Hay que destacar que el histiocitoma cutáneo, registró el área AgNOR promedio más alta, siendo estadísticamente igual al mastocitoma GIII y mayor que el TVT, que es potencialmente maligno pero de fácil remisión inducida por quimioterapia (González *et al.*,

2000). La mayor área argirófila del histiocitoma, se debería al carácter muy celular de este tumor, que demandaría alta síntesis proteica, para mantener o aumentar la población celular, lo que es consistente con lo expresado por Giraldo *et al.* (2003b). Sin embargo, también hay que considerar que, al analizar en conjunto área AgNOR y área Ki-67 en histiocitoma y TVT, el valor significativamente mayor del área AgNOR se obtuvo en el histiocitoma, mientras que en el área Ki-67, que detecta a las células que están proliferando, no se registraron diferencias significativas. Se podría postular, que la alta presencia de proteínas argirófilas en el histiocitoma se asociaría a una cinética del ciclo celular más lenta que TVT, lo que permitiría visualizar la reacción de plata de los gránulos por un tiempo más prolongado, durante la interfase. Estos resultados, también son consistentes con lo planteado por Derenzini, (2000) quien expresa, que el número y el tamaño de las NORs en interfase son muy variables dentro del nucléolo, dependiendo de la actividad transcripcional de ARNr y, por lo tanto, existiría una relación entre la cantidad de AgNOR en interfase y el tiempo de división celular. Así, mientras más rápido sea el ciclo celular, habrá mayor biogénesis ribosomal por unidad de tiempo.

Es importante señalar que la medición del área AgNOR fue obtenida a través de morfometría computacional, considerando el tamaño y no el número de puntos, por lo que el resultado sería más fidedigno y objetivo que el recuento de puntos AgNOR, que se realizó en forma manual, coincidiendo con lo recomendado por Trerè (2000). Esta diferencia en la metodología empleada podría explicar la ausencia de diferencias significativas entre el recuento de puntos AgNOR de histiocitoma y TVT.

La actividad proliferativa cuantificada como áreas inmunomarcadas con PCNA no mostró diferencias significativas, entre los tres grados del mastocitoma, Esto podría explicarse por el carácter heterogéneo de las muestras tumorales que presentaron amplias desviaciones

estándar, especialmente el GII. No obstante, los promedios numéricos tienden a señalar un incremento en la medida que el tumor se hace más indiferenciado, lo que es corroborado por las características histológicas de cada neoplasia. Estos resultados son consistentes con el trabajo de Abadie *et al.* (1999), quienes encontraron una gran sobreposición de los valores entre los mastocitomas. Sin embargo, estos autores destacan que el número promedio de núcleos positivos a PCNA fue significativamente mayor en los perros que murieron a causa del mastocitoma, al compararlos con los que sobrevivieron. Por su parte, Scase *et al.* (2006) no encontraron asociación significativa entre los valores de PCNA y el tiempo de sobrevida en perros que presentaban mastocitoma cutáneo. Sería posible, que esta variabilidad en los resultados con PCNA se deba a su larga vida media (20 hrs) que podría sobreestimar la inmunomarcación para células que han dejado, recientemente, el ciclo celular y en las cuales aún se podría detectar la presencia de PCNA no degradado (Linden *et al.*, 1992). Además, hay que considerar que PCNA participa en la reparación del ADN (Löhr *et al.*, 1997). En esta memoria, por razones económicas, no se pudo utilizar Ki-67 en los mastocitomas para compararlas con los registros de PCNA como los realizados por los autores antes señalados.

De todas formas, se puede observar que el valor promedio de las áreas inmunomarcadas con PCNA, tienden a aumentar hacia el G III, lo que estaría relacionado con el nivel de proliferación celular. De igual forma, las áreas inmunomarcadas con Ki-67 en histiocitoma y TVT, tampoco mostraron diferencias significativas, aunque el marcaje del TVT tiende a ser más alto que histiocitoma. Por otra parte, Scase *et al.* (2006) establecieron, en mastocitoma canino, que los valores de AgNOR y de Ki-67, están asociados significativamente con la clasificación de Patnaik *et al.* (1984) y con el tiempo de sobrevida, señalando que ambos valores promedio son marcadores de pronóstico para el mastocitoma canino. Sin embargo, la clasificación histopatológica es de menor utilidad para mastocitomas

G II, debido a la variación considerable en sus características histológicas. Los mismos autores señalan, que los valores de Ki-67 se pueden usar para dividir a los mastocitomas G II en 2 subgrupos, con diferencias importantes en el tiempo de sobrevida de los pacientes.

En relación al patrón de localización de los gránulos argirófilos dentro de los núcleos de las células tumorales, se observó, que todos los tumores presentaron porcentajes estadísticamente iguales de núcleos con puntos centrales (C), consistente con lo informado por Palomo-González *et al.* (2002) en lesiones foliculares tiroideas benignas y malignas, quienes tampoco encontraron diferencias estadísticas entre ellas, aunque los valores tienden a ser más altos en los carcinomas (38,3%) que en los adenomas (29,3%). Por otro lado, en los porcentajes de localización periférica (P), sólo hubo diferencias significativas entre los mastocitoma G I y G III. Este patrón podría servir como un referente de grado de diferenciación en los mastocitomas, indicando que el más indiferenciado posee un porcentaje menor de núcleos con puntos AgNOR periféricos. Estos resultados son compatibles con los encontrados por Palomo-González *et al.* (2002) quienes señalan que los carcinomas foliculares tiroideos presentaron un menor porcentaje de puntos AgNOR periféricos (52,9% de los núcleos) al compararlos con adenomas foliculares tiroideos (el 62,2%), aunque no registraron diferencias significativas. El último patrón de localización considerado en nuestros resultados fue el central-periférico (CP), que incluye a los núcleos que poseen puntos AgNOR ubicados en el centro y en la periferia. Este patrón no mostró diferencias significativas entre el mastocitoma G I (22%) y el TVT (24%), sin embargo ambos valores fueron significativamente menores que el mastocitoma G II (36,5%) y mastocitoma G III (38,8%). De esta forma, este tipo de localización más amplia de proteínas AgNOR, estaría señalando mayor biogénesis ribosomal consistente con una mayor velocidad de proliferación y eventualmente, un comportamiento maligno.

En relación al patrón de distribución de los gránulos argirófilos dentro de los núcleos de las células tumorales, el porcentaje de núcleos con puntos agrupados (A) no mostró diferencias entre los mastocitomas, ni el TVT y sólo el histiocitoma fue significativamente menor que el mastocitoma G I, por lo que este indicador no sería de utilidad para caracterizar grados de diferenciación entre ellos. El patrón de distribución de puntos dispersos (D) tampoco permitió discriminar entre neoplasias malignas y benignas, sólo el TVT tuvo un valor significativamente menor en relación a los otros tumores. El patrón de distribución mixto (M), mostró un comportamiento similar ya que tampoco fue posible discriminar entre las neoplasias con la excepción del TVT que fue mayor que mastocitomas e histiocitoma. A través de los resultados obtenidos en esta memoria, en relación a la distribución de los puntos AgNOR, se podría concluir que estos no son buenos indicadores para diferenciar entre tumores malignos y benignos, a diferencia de lo descrito por Giraldo *et al.* (2003a), quienes afirman que en el mastocitoma canino predomina una distribución de puntos AgNOR dispersos en el núcleo y en el nucléolo. De igual forma, Giraldo *et al.* (2003b) observaron en tumores mamarios caninos, el predominio del mismo patrón de distribución. Según Shiro *et al.* (1993) este tipo de distribución sería más frecuente en tumores de menor diferenciación.

A diferencia de autores como Hall *et al.* (1988), Dervan *et al.* (1989), Canepa *et al.* (1990), Pich *et al.* (2000), quienes informan que existe una correlación directa significativa entre la cantidad de AgNOR y marcadores nucleares de proliferación celular como PCNA o Ki-67, en nuestro trabajo no pudimos establecer una correlación significativa, al calcular el coeficiente de correlación de Pearson. Sin embargo, en el caso del mastocitoma, donde se evaluó área AgNOR v/s área PCNA, se pudo observar que en la medida que aumenta el grado histológico, aumentan en forma paralela ambas áreas promedio, indicando algún grado de correlación o proporcionalidad, aunque estadísticamente no se estableció.

CONCLUSIONES

1. No se estableció una correlación significativa entre las técnicas inmunohistoquímicas realizadas y AgNOR.
2. La cuantificación de proteínas AgNOR, obtenida por recuento de puntos y por medición de área, no permitió discriminar entre las neoplasias estudiadas. Esta cuantificación podría indicar más bien, velocidad de proliferación y no necesariamente el comportamiento maligno de una neoplasia.
3. La metacromasia permitió discriminar, en mastocitomas, grados de diferenciación (malignidad), a diferencia de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PCNA.
4. La técnica AgNOR debe ser considerada como una prueba complementaria al diagnóstico histopatológico.

BIBLIOGRAFIA

ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E. 1999. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215(11):1629-1634.

CANEPA, M.; GAMBINI, C.; SEMENTA, A.R.; BORGIANI, L.; ROVIDA, S. 1990. Nucleolar organizer regions and Ki-67 immunostaining in ductal breast cancer: a comparative study. *Pathologica* 82(1078):125-132.

COOPER, G.M. 2002. *La célula*. 2ª ed. Marbán Libros. Madrid, España. 685 p.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. 2000. Neoplasias. **In:** Robbins Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Mc Graw Hill Interamericana. México D.F., México. pp 277-347.

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

DERENZINI, M.; TRERE, D. 1991. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.* 61(1):1-8.

DERVAN, P.A.; GILMARTIN, L.G.; LOFTUS, B.M.; CARNEY, D.N. 1989. Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am. J. Clin. Pathol.* 92(4):401-407.

FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZALEZ, C.; CEPEDA, R. 2000. Tumor venéreo transmisible. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. *Monografías Med. Vet.* 20(1):82-93.

FRISELL, W. R. 1982. *Human Biochemistry.* Macmillan Publishing Co. Inc. New York, U.S.A. 845 p.

GIRALDO, G. E.; ARANZAZU, D. A.; RODRÍGUEZ, B. DE J.; PÉREZ, M. M.; RAMÍREZ, M. C. 2003a. Caracterización de las Regiones Organizadoras Nucleolares coloreadas con Plata (AgNORs) en tumores cutáneos caninos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 16(2):132-138.

GIRALDO, G. E.; ARANZAZU, D. A.; RODRÍGUEZ, B. DE J.; PÉREZ, M. M.; RAMÍREZ, M. C. 2003b. Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares coloreadas con plata (AgNORs) en tumores mamarios caninos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 16(1):33-39.

GIRI, D.D; NOTTINGHAM, J.F.; LAWRY, J.; DUNDAS, S.A.; UNDERWOOD, J.C. 1989. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNOR) in benign and malignant breast

lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. Pathol.* 157(4):307-313.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. 2002. Tumors of the skin and soft tissues. **In:** Meuten, D. J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4^a ed. Iowa State Press. Iowa, United States of America. pp 45-117.

GONZALEZ, C. M.; GRIFFEY, S. M.; NAYDAN, D. K.; FLORES E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B. R. 2000. Canine Transmissible Venereal Tumour: a Morphological and Immunohistochemical Study of 11 Tumours in Growth Phase and during Regresión after Chemotherapy. *J. Comp. Path.* 122:241-248.

HALL, P.A.; CROCKER, J.; WATTS, A.; STANSFELD, A.G. 1988. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12(4):373-381.

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

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; CARNEIRO, R. A.; PEREIRA, L. C. 2003 Punção aspirativa por agulha fina para diagnóstico de mastocitoma em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55(4):500-502.

LINDEN, M.D.; TORRES, F.X.; KUBUS, M.S.; ZARBO, R.J. 1992. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. Am. J. Clin. Pathol. 97 (suppl. 1):S4-S13.

LÖHR, C. V.; TEIFKE, J. P.; 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.

MADEWELL, B. R. 1997. Tumor Markers In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed. Academic Press. pp 761-784.

MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. 2005. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours. J. Comp. Path. 133:209-211.

MARTÍNEZ DE MERLO, E. 2000. Mastocitoma cutáneo canino: un reto para el veterinario. [en línea] <http://www.colvet.es/madrid/revista/may_jun_00/casoclinico.htm> [consulta: 27-08-2008]

MEER, S.; GALPIN, J.S.; ALTINI, M.; COLEMAN, H.; ALI, H. 2003. Proliferating cell nuclear antigen and Ki67 immunoreactivity in ameloblastomas. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 95: 213-221.

NESBIT, E.A.; BAIN, P.J.; NORTHUP, N.C.; LATIMER, K.S. 2002. Canine Round Cell Tumors. [en línea] <<http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/nesbit/>> [consulta: 27-08-2008]

O'KEEFE, D.A. 1990. Canine Mast Cell Tumors. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 20(4):1105-1115.

PALOMO-GONZÁLEZ, M. J.; PÉREZ-REQUENA, J.; REGO-GONZÁLEZ, M.; LÓPEZ-NIETO, M.; CAÑIZARES BENITEZ, C. 2002. Evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNORs) en neoplasias foliculares tiroideas. Rev. Esp. Patol. 35(1):95-100.

PATNAIK, AK; EHLER, WJ; MAC EWEN EG. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vet. Pathol. 21(5):469-474.

PEARSE, A. G. E. 1985. Histochemistry Theoretical and Applied. 4th ed. Churchill Livingstone. v. 2.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. 2000. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. Micron 31:133-141.

RAYMOND, W.A.; LEONG, A.S. 1989. Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. Hum. Pathol. 20(8):741-746.

RECH, R.R.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; SALLIS, E.S.V.; RAFFI, M.B.; GARMATZ, S.L. 2004. Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56 (4):441-448

ROGERS, K.S. 1997. Transmissible Venereal Tumor. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 19(9):1036-1045.

SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. 2006. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. J. Vet. Intern. Med. 20:151-158.

SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITOH, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A. 1993. A Correlation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions with Stages of Hepatocellular Carcinoma. Cancer 71(1):44-49.

SIMOES, J.P.C.; SCHONING, P. 1994. Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. J. Vet. Diagn. Invest. 6(4):458-465.

SMITH, R.; CROCKER, J. 1988. Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. Histopathology 12(2):113-125.

STREFEZZI, R. DE F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. Vet. Pathol. 40:268-275.

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

VICENTE, F.; LARRINAGA, B.; SORIANO, P.; GÓMEZ, M. L.; LERA, J. M. 1998.

Estudio de factores pronósticos en carcinoma mamario en dos grupos de pacientes: Estadio 0 - 21 casos- y Estadio II (con ganglios positivos) 42 casos. *Anales Sis. San Navarra* (21) Supl. 3:139-146.

VIGLIOGLIA, P.A. 2004. Mastocitosis. *Act. Terap. Dermatol.* 27:238.

WALDEMARIN, K. C.; BELETTI, M. E.; COSTA, L. DA F. 2004. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. *Real-Time Imaging* 10:197-204.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R.

2004. *Molecular Biology of the Gene*. 5th ed. Pearson Education. San Francisco, USA. 755 p.

WEINBERG, R.A. 1996. Así se produce el cáncer: Las bases moleculares del cáncer salen a la luz y sugieren nuevas aproximaciones terapéuticas. *Investig. Cienc.* 242:10-18.

WOODS, J.R. 2004. Canine Cutaneous Histiocytoma. [en línea]

< <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/woods/index.php> > [consulta: 27-08-2008]

ANEXO 1: Técnica Azul de Toluidina (AT)

Soluciones y reactivos:

- 1.- Solución madre de Azul de Toluidina: disolver 1 g de azul de toluidina O (Sigma) en 100 ml de alcohol 70%.
- 2.- NaCl 1%: disolver 0.5 g de NaCl en 50 ml de agua destilada.
- 3.- Ajustar pH entre 2.0 y 2.5 usando ácido acético o HCl.
- 4.- Solución de trabajo de Azul de Toluidina (pH 2.0-2.5): mezclar 5 ml de solución madre de azul de toluidina con 45 ml de NaCl 1%.

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar e hidratar cortes hasta agua destilada
- 2.- Teñir cortes en solución de trabajo de Azul de Toluidina por 2-3 minutos.
- 3.- Lavar en agua destilada, 3 cambios.
- 4.- Deshidratar rápidamente con alcohol 95% y 2 cambios de alcohol 100%.
- 5.- Aclarar en xilol, 2 cambios, 3 minutos cada vez.
- 6.- Montar con medio de montaje resinoso.

ANEXO 2: Técnica AgNOR según Löhr *et al.* 1997, estandarizada en nuestro laboratorio de histología.

1.- Desparafinar cortes histológicos:

1.1.- Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes en forma descendente (100%, 95%, 70%).

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 minutos c/u.

2.3.- Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente.

2.4.- Lavado con agua destilada y con 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, agregarle gelatina hasta que contenga 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 una 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 minutos 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 minutos.

4.2.- 2 Lavados con 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 minutos en c/u.

5.2.- Aclarar en xiloles (3 lavados) por 5 minutos en c/u.

5.3.- Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex^R)

ANEXO 3: Técnica Inmunohistoquímica (PCNA ó Ki-67)

1.- Desparafinar cortes histológicos:

1.1.- Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes en forma descendente (100%, 95%, 70%).

1.2.- Lavado en agua destilada.

2.- Recuperación de inmunorreactividad con calor de microondas:

2.1.- Colocar las muestras en solución buffer citrato 0,1M 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 hasta alcanzar 92-94°C. (Se sugieren 3 pulsos de 5 minutos c/u).

2.3.- Mantener temperatura durante 10-20 minutos, utilizando la mínima potencia de irradiación del horno.

2.4.- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2.5.- Lavado con agua destilada.

3.- Bloqueo de peroxidasa endógena:

3.1.- Agregar agua oxigenada (H₂O₂) al 3% en agua destilada durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.2.- Lavado con agua destilada.

3.3.- Lavado con PBS.

4.- Bloqueo de proteínas:

4.1- Agregar BSA al 2% en PBS durante 10 minutos.

5.- Incubación con anticuerpo primario (durante toda la noche a 4°C):

5.1.- Para PCNA: Monoclonal Anti Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Sigma Chemical P-8825 Alemania, diluido 1:1000 en PBS + BSA.

5.1.- Para Ki-67: Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen (DAKO M7240 Dinamarca), diluido 1:100 en PBS + BSA.

6.- Lavado con PBS: 3 lavados de 5 minutos c/u.

7.- Incubación con anticuerpo secundario (diluido 1:200 en PBS + BSA, durante 60 minutos a temperatura ambiente):

7.1.- Para PCNA y Ki-67: Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins Biotin (DAKO E0354 Dinamarca).

8.- Lavado con PBS: 3 lavados de 5 minutos c/u.

9.- Incubación con conjugado Estreptavidina-Peroxidasa (DAKO P0397 Dinamarca):

9.1- Diluido 1:200 en PBS + BSA, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

10.- Lavado con PBS: 3 lavados de 5 minutos c/u.

11.- Revelado con DAB (DAKO K3465 USA): de 3 a 5 minutos

12.- Lavado con PBS: 3 lavados de 5 minutos c/u.

13.- Contraintinción con Hematoxilina de Mayer:

13.1.- Sumergir en hematoxilina durante 1-1,5 minutos.

13.2.- Lavado con agua corriente.

13.3.- Sumergir en carbonato de litio al 0,5% durante 2 minutos.

13.4.- Lavado con agua corriente.

14.- Deshidratar, aclarar y montar:

14.1.- Deshidratar las muestras en alcoholes de 96% (1 lavado), y de 100% (3 lavados) por 5 minutos en c/u.

14.2.- Aclarar en xiloles (3 lavados) por 5 minutos en c/u.

14.3.- Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex^R).

ANEXO 4: Coeficiente de Correlación de Pearson

Coeficientes de correlación

TUMOR= HISTIOCITOMA

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	área Ki-67	área AgNOR
área Ki-67	1,00	0,18
área AgNOR	-0,58	1,00

TUMOR= TVT

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	área Ki-67	área AgNOR
área Ki-67	1,00	0,40
área AgNOR	0,32	1,00

Coeficientes de correlación

TUMOR= MASTOCITOMA GRADO 1

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	área A/T	área AgNOR	área PCNA
área A/T	1,00	0,18	0,71
área AgNOR	0,46	1,00	0,21
área PCNA	0,14	0,46	1,00

TUMOR= MASTOCITOMA GRADO 2

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	área A/T	área AgNOR	área PCNA
área A/T	1,00	0,02	0,02
área AgNOR	0,75	1,00	0,10
área PCNA	0,70	0,58	1,00

TUMOR= MASTOCITOMA GRADO 3

Correlacion de Pearson: coeficientes\probabilidades

	área A/T	área AgNOR	área PCNA
área A/T	1,00	0,96	0,24
área AgNOR	0,02	1,00	0,76
área PCNA	0,41	0,11	1,00

ANEXO 5: Análisis de Varianza

5.1) En morfometría

a) Área AT (Mastocitomas):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área A/T	30	0,68	0,65	37,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	934132,49	2	467066,24	28,04	<0,0001
mastocitoma	934132,49	2	467066,24	28,04	<0,0001
Error	449763,56	27	16657,91		
Total	1383896,05	29			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=143,21669

Error: 16657,9097 gl: 27

mastocitoma	Medias	n	
3	107,92	10	A
2	396,62	10	B
1	530,85	10	B

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

b) Área PCNA (Mastocitomas):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área PCNA	29	0,11	0,04	61,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	174150,26	2	87075,13	1,66	0,2100
TUMOR	174150,26	2	87075,13	1,66	0,2100
Error	1365186,52	26	52507,17		
Total	1539336,78	28			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=259,36295

Error: 52507,1738 gl: 26

TUMOR	Medias	n	
MASTO 1	262,37	9	A
MASTO 2	393,22	10	A
MASTO 3	450,41	10	A

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

c) Área Ki-67 (Histiocitomas, TVT):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área Ki-67	16	0,07	3,1E-03	48,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	237922,11	1	237922,11	1,05	0,3237
TUMOR	237922,11	1	237922,11	1,05	0,3237
Error	3183807,53	14	227414,82		
Total	3421729,64	15			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=513,38912

Error: 227414,8235 gl: 14

TUMOR	Medias	n	
HISTIO	842,87	7	A
TVT	1088,68	9	A

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

d) Área de puntos AgNOR (Mastocitomas, Histiocitomas, TVT):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
área AgNOR	46	0,52	0,47	38,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1084181,67	4	271045,42	11,06	<0,0001
TUMOR	1084181,67	4	271045,42	11,06	<0,0001
Error	1005209,01	41	24517,29		
Total	2089390,68	45			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=209,29235

Error: 24517,2929 gl: 41

TUMOR	Medias	n		
MASTO 1	159,59	10	A	
MASTO 2	383,08	9		B
TVT	414,04	10		B
MASTO 3	486,32	10	B	C
HISTIO	647,22	7		C

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

5.2) En otros indicadores

a) N° de puntos AgNOR (Mastocitomas, Histiocitomas, TVT):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
N° de puntos	46	0,24	0,17	22,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,96	4	0,74	3,30	0,0196
TUMOR	2,96	4	0,74	3,30	0,0196
Error	9,20	41	0,22		
Total	12,17	45			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,63332

Error: 0,2245 gl: 41

TUMOR	Medias	n		
MASTO 1	1,74	10	A	
TVT	2,07	10	A	B
MASTO 2	2,19	9	A	B
HISTIO	2,27	7	A	B
MASTO 3	2,48	10		B

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

b) Localización de puntos AgNOR. (Mastocitomas, Histiocitomas, TVT):

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
c	46	0,05	0,00	32,22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	461,42	4	115,36	0,52	0,7248
TUMOR	461,42	4	115,36	0,52	0,7248
Error	9177,88	41	223,85		
Total	9639,30	45			

Test:Tukey Alfa:=0,05 DMS:=14,15184

Error: 223,8507 gl: 41

TUMOR	Medias	n	
MASTO 2	41,56	9	A
MASTO 3	45,20	10	A
MASTO 1	46,80	10	A
HISTIO	47,14	7	A
TVT	51,20	10	A

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

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
p	46	0,18	0,09	52,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1279,28	4	319,82	2,17	0,0889
TUMOR	1279,28	4	319,82	2,17	0,0889
Error	6030,63	41	147,09		
Total	7309,91	45			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=11,47157

Error: 147,0885 gl: 41

TUMOR	Medias	n		
MASTO 3	16,00	10	A	
HISTIO	19,71	7	A	B
MASTO 2	22,00	9	A	B
TVT	24,80	10	A	B
MASTO 1	31,20	10		B

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

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
cp	46	0,24	0,16	42,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2200,28	4	550,07	3,18	0,0230
TUMOR	2200,28	4	550,07	3,18	0,0230
Error	7094,68	41	173,04		
Total	9294,96	45			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=12,44251

Error: 173,0410 gl: 41

TUMOR	Medias	n		
MASTO 1	22,00	10	A	
TVT	24,00	10	A	
HISTIO	33,14	7	A	B
MASTO 2	36,44	9		B
MASTO 3	38,80	10		B

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

c) Distribución de puntos AgNOR (Mastocitomas, Histiocitomas, TVT):

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
a	46	0,14	0,06	34,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1504,42	4	376,11	1,66	0,1777
TUMOR	1504,42	4	376,11	1,66	0,1777
Error	9286,18	41	226,49		
Total	10790,61	45			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=14,23509

Error: 226,4923 gl: 41

TUMOR	Medias	n			
HISTIO	36,29	7	A		
MASTO 2	40,22	9	A	B	
MASTO 3	42,60	10	A	B	
TVT	45,40	10	A	B	
MASTO 1	53,60	10			B

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

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
d	46	0,58	0,54	34,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8336,44	4	2084,11	13,97	<0,0001
TUMOR	8336,44	4	2084,11	13,97	<0,0001
Error	6116,01	41	149,17		
Total	14452,46	45			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=11,55250

Error: 149,1710 gl: 41

TUMOR	Medias	n			
TVT	12,00	10	A		
MASTO 3	34,80	10		B	
MASTO 1	42,00	10		B	C
MASTO 2	46,78	9			C
HISTIO	48,86	7			C

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

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
m	46	0,59	0,55	59,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8234,75	4	2058,69	14,70	<0,0001
TUMOR	8234,75	4	2058,69	14,70	<0,0001
Error	5742,06	41	140,05		
Total	13976,80	45			

Test: Tukey Alfa:=0,05 DMS:=11,19374

Error: 140,0502 gl: 41

TUMOR	Medias	n			
MASTO 1	4,40	10	A		
MASTO 2	13,00	9	A	B	
HISTIO	14,86	7	A	B	
MASTO 3	22,60	10		B	
TVT	42,60	10			C

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

ANEXO 6: Tabla Resumen AgNOR

Tabla 1: Área (μm^2), número promedio (Nº) , localización (%) y distribución (%) de gránulos AgNOR positivos en Mastocitoma canino GI, GII, GIII, TVT e Histiocitoma.

Tumor	Área (μm^2)	Nº	LOCALIZACIÓN (%)			DISTRIBUCIÓN (%)		
			C	P	CP	A	D	M
GI	159,57 ($\pm 74,59$) a	1,74 ($\pm 0,26$) a	46,8 a	31,2 b	22,0 a	53,6 b	42,0 bc	4,4 a
GI	383,08 ($\pm 196,94$) b	2,19 ($\pm 0,51$) ab	41,56 a	22,0 ab	36,44 b	40,22 ab	46,78 c	13,0 ab
GIII	486,32 ($\pm 214,99$) bc	2,48 ($\pm 0,73$) b	45,2 a	16,0 a	38,8 b	42,6 ab	34,8 b	22,6 b
TVT	414,04 ($\pm 126,34$) b	2,07 ($\pm 0,3$) ab	51,2 a	24,8 ab	24,0 a	45,4 ab	12,05 a	42,6 c
HISTIOCITOMA	647,22 ($\pm 119,16$) c	2,27($\pm 0,38$) ab	47,14 a	19,71 ab	33,14 ab	36,29 a	48,86 c	14,86 ab

