



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCION DE TRIPTASA POR INMUNOPEROXIDASA EN MASTOCITOMAS CUTANEOS CANINOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO
Z O O T E C N I S T A
P R E S E N T A :
ADRIANA MENDEZ BERNAL

ASESORES:

M.V.Z. PhD. ENRIQUE M. ABURTO FERNANDEZ
M.C. GERARDO ARISTI URISTA
M.V.Z. MA. GUADALUPE SANCHEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.,

2005

m 346279



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Méndez Bergal

FECHA: 1-Julio-05

FIRMA: Adriana

DEDICATORIA

A mis padres Esperanza y José Antonio

Por su amor, apoyo y palabras de aliento

En memoria a mis abuelos y mi tío.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores por su apoyo, tiempo y conocimientos sobre todo por la oportunidad que me brindaron para la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Aburto con profundo cariño gracias por su confianza, paciencia y apoyo invaluable, ha sido una persona sumamente importante en mi desarrollo profesional.

Al MC Gerardo Aristi Urista por el apoyo en el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica.

Al MVZ Guadalupe Sánchez González por el apoyo incondicional en el análisis estadístico.

A los miembros de mi jurado MVZ. Nuria De Buen LLado, MVZ. José Ramírez Lezama, MVZ. Joaquín Aguilar Bobadilla, MVZ Elizabeth Morales Salinas por todo el apoyo y confianza los cuales fueron importantes para el comienzo de una etapa en mi vida.

Gracias al Dr. Fernando Constantino, por inculcarme el gusto por aprender patología y por la oportunidad de formar parte del departamento de Patología todo este tiempo.

A Miguel Angel Aboites, gracias por brindarme tu apoyo, cariño y estar conmigo en todo momento.

A Mireya Juárez y a Lucía Rangel Luna por su amistad desde el inicio de la carrera, por el apoyo y las palabras de aliento que me ayudaron a salir adelante en los momentos difíciles.

A los técnicos de histopatología Guadalupe Juárez Solís y Antonio Morales Arreola. A la Sra. Carmen Ramos, por su cariño y comprensión.

A todas las personas que de forma directa e indirecta contribuyeron en la elaboración de este trabajo y cuya labor agradezco infinitamente.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	13
HIPÓTESIS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
Criterios de inclusión.....	15
Examen histopatológico.....	15
Estudio inmunohistoquímico.....	15
Método del complejo streptavidina biotina (ABC).....	16
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	27
REFERENCIAS.....	28
FIGURAS.....	31
CUADROS.....	37

LISTA DE FIGURAS

Página

31

- Fig.1** Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas con núcleo uniforme arregladas en cordones. Nótese la presencia de gránulos en el citoplasma, teñidos de azul o gris pálido. H y E, 1000x.
- Fig.2** Fotomicrografía. Mastocitoma grado II. Células redondas que muestran pleomorfismo moderado y se arreglan en grupos irregulares. Sus núcleos son redondos o indentados, con cromatina dispersa, exhiben discreta variación de tamaño. En muchas de estas células se distinguen finos gránulos intracitoplasmáticos azules o gris claros, 1000x
- Fig.3** Fotomicrografía. Mastocitoma grado III. Células pleomórficas con menor cantidad de gránulos en el citoplasma, anisocariosis marcada y nucléolos prominentes. Nótese la presencia de numerosos eosinófilos entremezclados. H y E, 1000x
- Fig.4** Fotomicrografía. Preparación citológica de células cebadas neoplásicas, con núcleo redondo u oval con numerosos gránulos intracitoplasmáticos, que se tiñen metacromáticamente (azul o púrpura). Tinción de Diff- Quick, 1000x
- Fig.5** Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas que se disponen formando cordones y fuertemente positivas con la tinción azul de toluidina, 200x
- Fig.6** Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas que se disponen formando cordones y muestran numerosos gránulos alcohol ácido resistentes con la tinción Ziehl- Neelsen, 400x
- Fig.7** Fotomicrografía. Mastocitoma grado III o poco diferenciado, negativo a la tinción azul de toluidina, 200x
- Fig. 8** Fotomicrografía. Mastocitoma grado III negativo a la tinción de Ziehl-Neelsen, 400x
- Fig.9** Fotomicrografía. Mastocitoma grado I fuertemente positivo para triptasa por la técnica la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa, 200x
- Fig.10** Fotomicrografía. Histiocitoma canino. Tejido utilizado como testigo negativo para triptasa con la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa, 200x

- Fig.11** Fotomicrografía. Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos con la tinción de azul de toluidina en los diferentes grados de diferenciación.
- Fig.12** Fotomicrografía. Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos con la tinción de Ziehl–Neelsen en los diferentes grados de diferenciación.
- Fig.13** Fotomicrografía. Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos a triptasa por la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa en los diferentes grados de diferenciación.

LISTA DE CUADROS

Página

37

Cuadro 1. Clasificación de 41 mastocitomas cutáneos caninos diagnosticados mediante histopatología.

Cuadro 2. Clasificación de 41 mastocitomas cutáneos caninos por grado de diferenciación y positividad para las técnicas histoquímicas e inmunoperoxidasa.

Cuadro 3. Sensibilidad de las técnicas histoquímicas e inmunoperoxidasa para el diagnóstico de mastocitomas cutáneos por grado de diferenciación.

Resumen

Méndez Bernal, Adriana. Detección de triptasa por inmunoperoxidasa en mastocitomas cutáneos caninos. (Bajo la dirección de MVZ. Enrique Martín Aburto Fernández, MC. Gerardo Aristi Urista y MVZ. Ma. Guadalupe Sánchez González).

El mastocitoma (tumor de células cebadas) está considerado entre las neoplasias cutáneas más comunes en el perro. El diagnóstico definitivo de los mastocitomas se lleva a cabo por medio de la citología e histopatología con ayuda de tinciones metacromáticas como la de azul de toluidina; sin embargo, los tumores poco diferenciados pueden carecer de gránulos citoplasmáticos en cantidad suficiente para ser detectados por dichas tinciones, o la de Hematoxilina-Eosina, y su diagnóstico se dificulta. El objetivo de este trabajo fué determinar la presencia de triptasa en mastocitomas caninos con diferentes grados de diferenciación, así como comparar la determinación de gránulos citoplasmáticos de dos técnicas histoquímicas con la determinación de triptasa. Cuarenta y un mastocitomas previamente procesados para examen histológico con la técnica de Hematoxilina-Eosina fueron seleccionados y clasificados por microscopía óptica como grado I (bien diferenciado), II (intermedio) y III (poco diferenciado) de acuerdo a su grado de diferenciación. Cortes seriados de cada muestra fueron teñidos con azul de toluidina, Ziehl-Neelsen, y uno de ellos procesados para la aplicación del anticuerpo anti triptasa por el método de streptavidina biotina inmunoperoxidasa. La tinción de azul de toluidina permitió identificar los gránulos metacromáticos en 34 de los casos (82%), y en el 42% de los grado III. Los gránulos citoplasmáticos fueron alcohol ácido resistentes en 32 casos (78%) con la tinción de Ziehl-Neelsen, y en el 42% de los grado III. La enzima triptasa fué detectada en el 85% de los casos, y en el 67% de los

tumores grado III. La determinación de triptasa resultó ser una prueba específica y útil para el diagnóstico de mastocitomas cutáneos en perros independientemente de su grado de diferenciación y es recomendable en el caso de tumores poco diferenciados (grado III).

INTRODUCCIÓN

Los tumores de células redondas se hallan entre las afecciones neoplásicas más observadas en la clínica de pequeñas especies,^{1,2} la mayor parte de ellos son malignos en el perro.³ Estos tumores representan el 67.5% de las neoplasias cutáneas e incluyen al tumor de células cebadas o mastocitoma, histiocitoma, sarcoma histiocítico, tumor venéreo transmisible, plasmocitomas y linfoma.^{1,2} Los mastocitomas comprenden del 7 al 21 % de las neoplasias que afectan la piel del perro.^{1,2} En un estudio reciente llevado a cabo por Juárez *et al*³ en el Departamento de Patología de la FMVZ- UNAM, los mastocitomas ocuparon el 16.3% de las neoplasias cutáneas del perro; es decir, que fueron el tumor de piel más frecuentemente diagnosticado en los últimos cuatro años (2000 – 2004).³ Aunque la gran mayoría se originan en la piel, algunos se forman en el intestino, bazo, hígado y otros órganos.⁴ El promedio de edad en la que se presentan varía de 8.2 a 10. 5 años (media = 8.5 años).^{5,6,7,8} Muchos estudios han informado que no existe predisposición por género, pero sí por raza entre las que figuran el Bóxer, Boston terrier, Bull terrier, Labrador retriever, Weimaraner, Pug, Schnauzer y Bull dog (así como sus descendientes) entre las más afectadas.^{4,5,7}

Características clínicas

Los mastocitomas cutáneos caninos pueden desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, pero hay predisposición por ciertas áreas anatómicas. Aproximadamente el 50% se localizan en el tronco y la región perianal, incluyendo el escroto, cerca del 40% surgen en la piel de las extremidades (muslos) y alrededor del 10% en la cabeza y el cuello. Los mastocitomas múltiples ocurren en el 11 a 14% de los casos.^{4,7} Clínicamente estos tumores

se observan como nódulos únicos o múltiples no encapsulados, variablemente delimitados cuyos diámetros fluctúan entre 1 y 10 cm, aunque también pueden presentarse en forma de placas, particularmente en el área inguinal.^{7,8,9} La piel que los cubre suele estar alopecica, eritematosa, edematosa y ulcerada.^{8,10} Esto puede estar relacionado con prurito, daño autoinfligido e inflamación secundaria, debido a la degranulación de sustancias proinflamatorias y pruriginosas por los mastocitos neoplásicos.⁸ La mayoría de los mastocitomas son de color amarillo claro y de consistencia suave al tacto, pero estas características pueden variar de acuerdo al grado de inflamación coexistente.^{7,8,9}

Características histológicas.

Existen diversos informes que indican una correlación importante entre el grado de diferenciación celular de los mastocitomas y su comportamiento biológico, de tal manera que su clasificación se basa en la presencia o ausencia de alteraciones morfológicas de las células neoplásicas (grado de atípia celular).^{2,4,5,8} El grado I o bien diferenciado esta conformado por células que se disponen en hileras o pequeños grupos separados por fibras de colágena madura en la dermis y generalmente no invaden el tejido subcutáneo.⁴ Estas células son redondas y monomórficas, con abundante citoplasma de bordes bien definidos, núcleo redondo u oval con cromatina condensada y gránulos intracitoplasmáticos de color azul (basofílicos) o gris claro, bien aparentes con tinción de Hematoxilina-Eosina. La presencia de figuras mitóticas es rara^{2,4,8} (Fig.1).

El grado II o intermedio es altamente celular, las células tienden a invadir el tejido subcutáneo, muestran pleomorfismo moderado y tienden a arreglarse en grupos de tamaños y formas irregulares. Sus núcleos son redondos o

identados con cromatina dispersa, exhiben discreta variación de tamaño, y uno o varios nucléolos evidentes. En muchas de estas células se distinguen finos gránulos intracitoplasmáticos azules o gris claro. Las figuras mitóticas están presentes y llegan a observarse hasta 2 por campo aleatorio con el objetivo 40x.^{2,4,8} (Fig.2).

El grado III o poco diferenciado, exhibe un marcado pleomorfismo celular. En estos casos, los núcleos de las células neoplásicas, son marcadamente irregulares en tamaño (anisocariosis) y usualmente contienen de uno a tres nucléolos prominentes. El citoplasma contiene escasos gránulos casi indistinguibles y pueden observarse hasta 8 figuras mitóticas por campo aleatorio con el objetivo 40x^{4,8} (Fig 3). Se emplean tinciones especiales como azul de toluidina y Ziehl-Neelsen que generalmente ponen de manifiesto los gránulos cuando estos no son visibles con Hematoxilina-Eosina.^{2,4,8,11} Independientemente del grado de diferenciación los mastocitomas suelen estar acompañados de colagenolisis, edema, inflamación eosinofílica y vasculitis eosinofílica.^{4,8,10}

Comportamiento biológico

En un estudio realizado con 83 perros, Patnaik *et al*⁵ informaron la importante correlación que hay entre el tiempo de supervivencia y el grado de diferenciación de este tumor, después de haber llevado a cabo su resección quirúrgica. En este estudio se observó que el 83% (28/30) de los perros con tumor grado I sobrevivió por lo menos 1500 días después del diagnóstico inicial.⁵ El 44% (16/30) diagnosticados con tumor grado II sobrevivió el mismo período y sólo el 6% (1/17) con neoplasia grado III logró sobrevivir dicho tiempo.⁵ Aproximadamente el 50% de estas neoplasias reinciden localmente, en

especial los mastocitomas grado II y III.^{6,7} Otros factores adicionales que se usan para predecir el comportamiento biológico de los mastocitomas incluyen el tamaño del tumor, su localización, y la presencia o ausencia de metástasis.¹² El sitio más común de metástasis son los linfonodos regionales (en el 76% de los casos), seguido por el bazo, hígado, riñón, corazón y médula ósea.⁷ Así mismo se han informado otros sitios de diseminación como la mucosa oral, cerebro, los linfonodos hepatopancreáticos y la próstata.¹²

Síndromes paraneoplásicos

Se han descrito diversos síndromes paraneoplásicos asociados a los mastocitomas como consecuencia de la liberación de sustancias biológicamente activas. Entre estos se incluyen las úlceras gastroduodenales, retraso en la cicatrización, hemorragias locales, y ocasionalmente choque anafiláctico.^{6,7,13,14} Los mastocitomas están relacionados con ulceración gástrica en varias especies como el perro, el gato y la vaca.

Las úlceras ocurren con mayor frecuencia en el estómago, que en el duodeno, pueden ser únicas o múltiples y se presentan en el 83% de los casos.^{7,14} Estas lesiones se localizan con mayor frecuencia en la región fúndica y pilórica y en el 15% de los casos perforan el órgano afectado.^{10,13} Las úlceras se originan por el incremento en los niveles circulantes de histamina liberada por los mastocitos neoplásicos, esta sustancia estimula a los receptores H₂, de las células parietales de la mucosa gástrica, incrementando la producción de ácido clorhídrico y produciendo hipermotilidad gástrica. El desarrollo de la úlcera es el resultado de la combinación del incremento en la secreción de ácido clorhídrico, la hipermotilidad y posiblemente isquemia vascular. Generalmente la ulceración gástrica es subclínica o puede cursar con signos clínicos como

anorexia, vómito, diarrea, melena, anemia.¹¹ En casos graves, pueden observarse signos de peritonitis como resultado de la perforación de la úlcera.^{10, 14}

El retraso en la cicatrización es otro síndrome paraneoplásico observado en perros con mastocitomas y es atribuido a los efectos locales de enzimas proteolíticas y aminas vasoactivas liberadas por este tumor. La histamina se une a los receptores H₁ y H₂ de los macrófagos, lo que provoca la liberación del factor supresor de fibroblastos, y la consecuente reducción en la formación de tejido conectivo fibroso, esto da lugar a un retraso en la cicatrización.^{10,11, 13}

Las anomalías sistémicas en el tiempo de coagulación, son otro síndrome que resulta de la liberación de heparina por las células cebadas neoplásicas.¹⁰

A esto se atribuye el sangrado gastrointestinal y epistaxis en personas con mastocitosis sistémicas.¹⁵

Algunos animales diagnosticados con mastocitoma cutáneo ocasionalmente llegan a manifestar choque anafiláctico como resultado de la liberación masiva de histamina por el tumor, esto genera hipotensión generalizada y colapso circulatorio.^{4,10}

Métodos de diagnóstico

Además de considerar las características clínicas es necesario llevar a cabo un examen microscópico para confirmar el diagnóstico de mastocitoma y poder establecer el tipo de grado de acuerdo a su nivel de diferenciación.

La aspiración con aguja delgada es un método de diagnóstico definitivo para los mastocitomas cutáneos caninos, de igual manera sirve para evaluar otros órganos como linfonodos, bazo e hígado en casos de metástasis o enfermedad visceral.^{1,7} En preparaciones citológicas se observan células cebadas, con

núcleo redondo u oval y con numerosos gránulos intracitoplasmáticos, que se tiñen metacromáticamente (azul o púrpura) con métodos especiales como Diff-Quick, Wright o Wright–Giemsa¹(Fig. 4). La presencia de gran número de eosinófilos además de los gránulos en el citoplasma de las células neoplásicas es de gran ayuda para el diagnóstico diferencial con otros tumores de células redondas como el tumor venéreo transmisible, linfoma e histiocitoma.^{1,4,8,13} Los mastocitomas anaplásicos pueden ser un desafío para el diagnóstico por que exhiben escasos gránulos en su citoplasma o bien pueden estar ausentes. Otro método de diagnóstico definitivo es la biopsia quirúrgica (histopatología) que suele corroborar el diagnóstico citológico.^{2, 4, 8}

Tratamiento

Existen diversos protocolos para el tratamiento de esta neoplasia dentro de los cuales se incluyen la resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia y la aplicación de corticoesteroides, cuya elección depende de ciertos factores como el estadio de la enfermedad, la localización y el grado de diferenciación histológico.^{4, 6, 10,13}

Debido a la naturaleza infiltrante de los mastocitomas, siempre que sea posible, se debe practicar una extirpación quirúrgica amplia de las lesiones primarias. Se recomiendan márgenes de 3 cm de tejido sano, en todos los planos quirúrgicos y una evaluación histopatológica para cerciorarse de que la lesión fue resecada en su totalidad. Cuando la resección quirúrgica no es completa, se considera la posibilidad de una segunda resección o el uso de radioterapia. Esta última puede ser eficaz para prevenir la recurrencia de mastocitomas incompletamente extirpados.^{6,7,10} La radioterapia también se puede usar de forma paliativa para tratar perros con mastocitomas no extirpables,

particularmente en el caso de tumores metastásicos. Los efectos colaterales al uso de esta terapia pueden ser vómito, hipotensión y úlcera gastroduodenal.^{6, 7, 16,17,18}

La quimioterapia puede ser usada en los mastocitomas que no pueden ser extirpados quirúrgicamente o con metástasis, algunos autores refieren que se puede usar en combinación con la resección quirúrgica y/o radioterapia en lesiones de alto grado de malignidad.⁷ Los agentes antineoplásicos que se han utilizado para el tratamiento de esta neoplasia son la vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina y L- asparaginasa.^{7,11,19} Esta última sustancia, ha demostrado una buena respuesta en la reducción significativa en el tamaño del tumor de manera experimental.^{7,11}

El empleo de la prednisona o prednisolona por vía oral o intralesional, producen una reducción parcial o total del tumor en el 20% de los perros tratados por un periodo de 10 a 20 semanas. La prednisona es la más comúnmente empleada a dosis de 20 a 40 mg/ m² por 7 días.²⁰ El efecto colateral más importante, resultado de la aplicación de este tipo de terapia, es el hiperadrenocorticismio iatrogénico.^{7, 11,20}

Características de las células cebadas.

Las células cebadas se caracterizan por la presencia de gránulos citoplasmáticos que se tiñen metacromáticamente con azul de toluidina. Los gránulos contienen una gran cantidad de componentes fisiológicos activos, como la histamina, serotonina (en algunas especies), heparina y un grupo de proteasas neutras dentro de las cuales se encuentra la triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A.^{21,22}

La histamina es una amina básica que se encuentra en mayor concentración en el interior de los gránulos de los mastocitos en el humano, y es el resultado de la descarboxilación del aminoácido histidina, tal proceso ocurre en el aparato de Golgi de la célula cebada y de basófilos. La histamina causa contracción de músculo liso en los bronquios, tubo digestivo, útero y vejiga, también actúa en las paredes de los vasos sanguíneos para incrementar la permeabilidad vascular.²¹

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es un derivado del aminoácido triptofano y se encuentra en altas concentraciones en los gránulos de los mastocitos de roedores, y algunos autores informan su presencia en grandes herbívoros domésticos.²¹ En condiciones normales causa vasoconstricción que produce un incremento de la presión arterial (excepto en bovinos, donde actúa como vasodilatador). Tiene poco efecto en la permeabilidad vascular, excepto en ratas y ratones. Aunque ambos compuestos son mediadores importantes en la inflamación, son solo una parte de la compleja mezcla que se libera después de la degranulación de los mastocitos.²¹ La heparina es un mucopolisacárido ácido y probablemente es quien confiere a los gránulos citoplasmáticos la propiedad de teñirse metacromáticamente. Es un potente anticoagulante y su función es estabilizar al resto de las proteasas del interior del mastocito y alterar la actividad biológica de otras enzimas.²²

Más del 50% de las proteínas que se encuentran presentes en el interior de los gránulos de los mastocitos son proteasas neutras que incluyen a la quimasa, triptasa y carboxipeptidasa A.²² Las observaciones originales de estas proteasas neutras fueron descritas por primera vez en roedores, ovejas y humanos, donde la quimasa fue identificada mediante la técnica de

inmunohistoquímica y se encuentra presente en el 85% de los gránulos de los mastocitos ubicados en la piel, músculo, parénquima pulmonar, pared torácica y abdominal, y en el tracto gastrointestinal.^{21,23} Otra proteasa neutra importante es la carboxipeptidasa A que se encuentra en el 70% de los gránulos de los mastocitos de las ratas, es una proteína de 35 kDa con actividad de enzima hidrolítica en pH neutro. Es posible que estas dos enzimas complementen otras reacciones.²²

La presencia de triptasa ha sido descrita como componente normal de las células cebadas del humano, perro, caballo, bovino y roedores.²³ Es una proteasa predominante de las células cebadas de la piel, pulmón y del tracto gastrointestinal, esta compuesta por dos tetrámeros de 134 kDa, con dos subunidades de 31 – 34 kDa. Esta enzima está unida a la heparina, quien le provee estabilidad y se libera de manera paralela a la histamina durante la degranulación.²²

Dentro de las funciones de la triptasa se incluye la sensibilización del músculo al efecto de la histamina; estimular la proliferación de fibroblastos, músculo liso y células epiteliales; generar cininas; regular la expresión de molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM- 1); estimular la liberación de interleucina 8 (IL-8) e inducir la quimiotaxis de eosinófilos, hidrolizar algunos neuropéptidos, causa la secreción de moco, y además tiene actividad mitógena.^{21,22}

La triptasa solo se ha demostrado en mastocitos y, su contraparte sanguínea, los basófilos; por lo tanto, su detección puede ser considerada como una herramienta de diagnóstico importante para diferenciar a los mastocitomas de los otros tumores de células redondas del perro.²⁴

III. JUSTIFICACIÓN:

Tomando en cuenta que la triptasa únicamente se localiza en los mastocitos y los basófilos, determinar su presencia en las células que componen a los mastocitomas la convierte en un posible marcador específico para establecer un diagnóstico preciso, ya que permite diferenciar estas neoplasias del resto de los denominados tumores de células redondas del perro. De lo anterior puede depender el manejo clínico y pronóstico del animal, después de la extracción quirúrgica del tumor primario.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de triptasa en mastocitomas cutáneos caninos mediante inmunoperoxidasa por el método del complejo streptavidina – biotina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Comparar la determinación de gránulos citoplasmáticos por medio de técnicas especiales (azul de toluidina y Ziehl-Neelsen) con la determinación de triptasa por el método del complejo streptavidina- biotina para el diagnóstico de mastocitomas cutáneos caninos.
2. Demostrar que la determinación de triptasa puede ser un método de diagnóstico específico para mastocitomas cutáneos en perros independientemente de su grado de diferenciación.

V. HIPÓTESIS

Los especímenes diagnosticados como mastocitomas en estudio histopatológico expresarán triptasa mediante la técnica del complejo streptavidina – biotina, independientemente de su grado de diferenciación.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo, transversal, observacional y descriptivo, en el cual se utilizaron muestras de piel con diagnóstico de mastocitoma de 41 perros a los cuales se les realizó estudio histopatológico de 1999 a 2004.

Criterios de inclusión

Se utilizaron cortes de piel con lesiones diagnosticados como mastocitomas o compatibles con lo mismo. Cada muestra fue revisada en el microscopio fotónico y clasificada como grado I, II y III de acuerdo a Meuten JD,⁴

Examen Histopatológico

Se trabajaron con muestras de piel previamente fijadas en formalina amortiguada al 10 %, incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina (H/E), que forman parte del acervo de diagnóstico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y de un laboratorio privado. Estas muestras se les realizaron varios cortes seriados de 3-4 µm de espesor, los cuales se utilizaron posteriormente para el estudio de inmunohistoquímica y tinciones histoquímicas como azul de toluidina y Ziehl-Neelsen. Estas últimas se realizaron de acuerdo a las técnicas descritas por Luna.¹² (Fig. 5, 6,7 y 8)

Estudio inmunohistoquímico (IHQ)

El estudio de inmunohistoquímico se realizó en la Unidad de Patología del Hospital General de México. Con el fin de identificar la enzima triptasa se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa por el método de complejo streptavidina-biotina (ABC)*.^{12, 25,26,27}

*Strep AB Complex HRP. Lab. Dako, Japón.

Tejidos utilizados como testigos

Se utilizó como testigo positivo áreas de piel residuales (libres de infiltración neoplásica) con mastocitos no neoplásicos. El testigo negativo para el procedimiento consistió en una sección del mismo testigo positivo, pero sin la aplicación del anticuerpo primario, el cual fue sustituido por suero normal de conejo. Así mismo se empleó otra sección de tumor de células redondas (histiocitoma) como testigo negativo (Fig. 9)

Método de complejo streptavidina- biotina (ABC).

Preparación de los tejidos

De las muestras de piel incluidas en parafina, se realizó un corte de 3 μm de grosor, y se obtuvieron un total de 41 laminillas. Los cortes histológicos fueron adheridos en portaobjetos previamente preparados con solución adhesiva Poli-L- Lysina al 1%, para evitar el desprendimiento de los tejidos durante el procesamiento.^{12, 25,26}

Las secciones se desparafinaron en una estufa a 60°C, por 12 horas aproximadamente. Para completar este proceso, los tejidos se sumergieron en xilol, se realizaron tres cambios de 5 minutos cada uno y después un cambio de 3 minutos en acetona, cada uno a temperatura ambiente. Para la rehidratación de los tejidos, los portaobjetos se sumergieron en alcohol absoluto por 3 minutos.

Inhibición de la peroxidasa endógena

Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones de piel fueron tratadas con peróxido de hidrógeno y metanol absoluto, en una relación de 1:8 por 30 minutos. A continuación se sumergieron en alcohol de 96% por 3 minutos y se realizaron lavados con agua corriente y después con agua

destilada. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguada de fosfatos con un pH de 7.6, y se realizaron tres cambios de 3 minutos cada uno a temperatura ambiente. Después se secaron las laminillas alrededor del tejido y se colocaron en una cámara húmeda para agregar suero normal de carnero, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos.

Aplicación del anticuerpo primario

Después de la incubación se drenó el suero y se procedió a la aplicación del anticuerpo primario diluido en PBS: anti-triptasa clona AA1* y producido en ratón a una dilución de 1:400. Se aplicaron dos gotas (20µ L/gota) en cada laminilla, dejándolos incubar en la cámara húmeda a 4° C durante toda la noche (12 hrs aproximadamente).

Para el testigo negativo del antígeno a identificar se sustituyó el anticuerpo primario por suero normal de conejo (20µ L/gota). Posterior a su incubación de las muestras fueron sometidas a tres lavados con solución amortiguada de fosfatos por 3 minutos cada uno.

Aplicación de anticuerpo secundario

Después de haber incubado los tejidos en la cámara húmeda se aplicaron dos gotas (20µ L/gota) de anticuerpo secundario anti ratón biotinilado en solución amortiguada de fosfatos a cada muestra y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (20–25°C), en la cámara húmeda. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron tres lavados con solución amortiguada de fosfatos de 3 minutos cada uno.

*No. Catalogo: M7052. Labs. Dako. Japón

** No. Catalogo: S3003 Slides, Labs. Dako

Aplicación del Complejo Streptavidina- biotina

Para magnificar la reacción inmunológica, se aplicaron dos gotas del conjugado de la enzima CAB a cada laminilla y se incubaron por 30 minutos, en la cámara húmeda a temperatura ambiente (20–25°C). Posterior a la incubación se realizaron tres lavados con solución amortiguada de fosfatos, de 3 minutos cada uno.

Aplicación del cromógeno

La preparación del cromógeno, así como el tiempo de incubación, se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante del reactivo comercial de tinción usado.

Para revelar esta reacción, se aplicaron dos gotas (20µL/gota), del cromógeno 3'3'tetracloruro de diaminobencidina (DAB), y después de 5 minutos, observando la reacción al microscopio óptico. Enseguida se realizó un lavado con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción del revelado y posteriormente un lavado con agua corriente, inmediatamente se sumergieron en sulfato de cobre durante 10 minutos. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayers*, se aplicaron dos gotas (20 µL/gota) en cada laminilla, y se lavarón con agua destilada.

Para la rehidratación de los tejidos, los portaobjetos se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones, absoluto, 96%, 80% y 50%, realizando un cambio de 3 minutos cada uno, por cada concentración de alcohol y finalmente en xilol para ser posteriormente montadas con resina sintética**.

* No. Catalogo: S3309 Lab. Dako. Japón

**No. Catalogo: C0563. Lab. Dako. Japón.

Una reacción positiva a la presencia de triptasa se observó, en forma de gránulos intracelulares, teñidos de color café ocre (Fig. 10).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de resultados se realizó mediante una prueba de Cochran.²⁸

RESULTADOS

Histopatología

Cuarenta y un mastocitomas cutáneos caninos diagnosticados por histopatología, fueron seleccionados y clasificados con base en su grado de diferenciación como mastocitomas grado I (12/41), grado II (17/41) y grado III (12/41) (Cuadro 1).

Azul de Toluidina

La proporción de casos positivos por esta técnica fué, para los mastocitomas grado I (12/12), grado II (17/17) y grado III (5/12). No se encontró diferencia significativa entre los diferentes grados de diferenciación ($P>0.05$) (Cuadro 2).

Zielh-Neelsen

La proporción de casos positivos por esta técnica fué, para los mastocitomas grado I (11/12), grado II (16/17) y grado III (5/12). Los datos no mostraron diferencia estadística significativa entre los diferentes grados de diferenciación ($P>0.05$) (Cuadro 2).

Determinación de Triptasa por inmunoperoxidasa mediante el complejo streptavidina-biotina

La proporción de casos positivos por esta técnica fué, para los mastocitomas grado I (10/12), grado II (15/17) y grado III (8/12). No se presento diferencia estadística significativa entre los tres grados de diferenciación ($P>0.05$) (Cuadro 3).

Al comparar las diferentes técnicas por grado no hubo diferencia estadística significativa entre ellas ($P>0.05$) (Figura 11, 12 y 13).

Con base en lo anterior, se decidió determinar la sensibilidad para cada una de las tinciones. Los resultados son los siguientes:

Azul de toluidina

Los gránulos metacromáticos fueron evidentes en 34 de los casos (82%). En el caso de los mastocitomas grado I y II la sensibilidad para esta tinción fue del 100%, a diferencia de los mastocitomas grado III cuya sensibilidad fue del 42% (Cuadro 3).

Ziehl- Neelsen

Los gránulos fueron alcohol ácido resistentes en 32 de los casos (78%) Los mastocitomas grado I y II presentaron más del 90% de sensibilidad para esta técnica. En el caso de los mastocitomas grado III la sensibilidad fue del 42% (Cuadro 3).

Triptasa

Esta enzima fue, detectada por inmunoperoxidasa en 33 de los casos (85%). Los porcentajes de sensibilidad para este marcador en mastocitomas grado I y II fueron de 92% y 94%, respectivamente, y para mastocitomas grado III fue 67% (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Establecer el diagnóstico preciso de tumores de células redondas en perros tales como histiocitoma, sarcoma histiocítico (histiocitosis maligna), linfoma, plasmocitoma, tumor venéreo transmisible y mastocitoma con base en su morfología y técnicas convencionales (tinción de hematoxilina y eosina), suele ser una labor complicada, sobre todo cuando estas neoplasias muestran un bajo grado de diferenciación. Lo anterior las hace confundibles morfológicamente y es entonces cuando se justifica el uso de técnicas especiales.

Las células cebadas normales y neoplásicas bien diferenciadas se caracterizan por poseer gránulos citoplasmáticos que, contienen una gran cantidad de mediadores como la histamina, la serotonina (en algunas especies como los roedores), la heparina, esta última confiere la propiedad de teñir los gránulos metacromáticamente, además de un grupo de proteasas neutras dentro de las cuales se encuentra la triptasa.^{21,22}

Con base en lo anterior Cannas (1994)²⁹ empleó la tinción histoquímica de azul de toluidina, para poner de manifiesto los gránulos metacromáticos en 24 de 28 casos (63%). Así mismo, Ozaki *et al* (2002)³⁰ con el empleo de la misma tinción determinó la presencia de gránulos metacromáticos en 39 de 39 casos (100%). Cabe mencionar que en estos dos trabajos no se tomó en cuenta el grado de diferenciación de los mastocitomas.^{29, 30}

En el presente trabajo, los gránulos metacromáticos se hicieron evidentes en 34 de 41 casos (82%) con la tinción de azul de toluidina, sin considerar el grado de diferenciación. De tal manera que la sensibilidad para esta tinción fue superior a la descrita por Cannas (1994)²⁹ e inferior a la descrita por Ozaki

(2002)³⁰. Las diferencias pueden estar relacionadas con el número de tumores bien diferenciados y pobremente diferenciados, así como la degranulación de las células neoplásicas.

El presente estudio confirma que las propiedades de tinción de los mastocitos neoplásicos están directamente relacionadas con su grado de diferenciación, lo cual coincide con lo señalado por Cannas *et al.*²⁹ Esto puede deberse a que las células menos diferenciadas expresan una menor cantidad y tamaño de gránulos citoplasmáticos.²⁹ Por esta razón, se presume que las células tumorales en un mastocitoma grado III, tienen menor concentración de heparina, y otras sustancias intragranulares como los glicosaminoglicanos, ambos productos afines al colorante azul de toluidina, que al disminuir en cantidad reducen la sensibilidad de esta técnica.

Es escasa la información en la literatura que hace referencia al uso de la técnica de Zielh–Neelsen para la detección de gránulos de mastocitos normales y neoplásicos. Rest *et al*³¹ en 1979 demostró que los gránulos de las células cebadas son alcohol ácido resistentes en tejidos de humanos, perros, gatos, cuyos y conejos. Esta característica le permitió distinguir fácilmente el patrón granular del citoplasma de los mastocitos normales y neoplásicos, inclusive en aquellos tumores poco diferenciados. En el presente trabajo, la sensibilidad de dicha técnica para tumores grado I y II fué ligeramente inferior (92% y 94%, respectivamente) que la observada con azul de toluidina, e igual que para tumores grado III. Lo anterior demuestra la utilidad de ésta tinción para la identificación de mastocitos normales y neoplásicos, aunque no se utilice tan frecuentemente como la tinción de azul de toluidina.

La inmunoperoxidasa se ha utilizado con anterioridad en perros para establecer el diagnóstico de mastocitomas y otros tumores de células redondas tales como los histiocitomas, linfomas cutáneos y tumor venéreo. Algunos de los marcadores que se han empleados para mastocitomas son la quimasa y el CD68; sin embargo, este último no es específico para células cebadas.³⁰ Se han utilizado una gran variedad de marcadores para la identificación de células como son lisozima, alfa -1- antripsina y catepsina B.⁴ Para la detección de células linfocíticas, se han usado el CD45, CD3 y CD79 *acy*.^{4,30} Así mismo, en el tumor venéreo transmisible se ha observado inmunopositividad para la vimentina, lisozima, alfa- 1- antripsina.⁴

Ozaki *et al* (2002),³⁰ determinó triptasa en mastocitomas viscerales en perros, encontrando 24 casos positivos de 39 casos (61%). En el presente estudio la determinación de triptasa mediante inmunoperoxidasa, permitió confirmar el diagnóstico de mastocitoma en 35 de 41 casos (85%). En el caso de tumores grado III (poco diferenciados), la detección de triptasa superó considerablemente (25%) la sensibilidad de las técnicas histoquímicas. Esto último se refleja al comparar las 3 técnicas sin tomar en cuenta el grado de diferenciación ya que la sensibilidad para azul de toluidina fue del 82%, y para Ziehl–Neelsen 78%. De lo anterior se desprende que la detección de triptasa puede ser una herramienta útil para confirmar el diagnóstico de mastocitomas, sobre todo aquellos de grado III, cuyos gránulos son menos aparentes con técnicas histoquímicas.

La enzima triptasa únicamente está presente en los gránulos de mastocitos y su contraparte sanguínea los basófilos²⁴ de tal manera que su detección descarta la posibilidad de otros tumores de células redondas. El hecho de que

la triptasa no se pudo demostrar en el 100% de los casos de este trabajo, (incluyendo algunas neoplasias bien diferenciadas) puede depender de varios factores tales como: la preservación de las muestras o grado de autólisis, el tipo de fijador empleado, el tiempo de permanencia del tejido en formalina, y una serie de situaciones inherentes a la técnica de inmunoperoxidasa empleada, por ejemplo: la concentración del anticuerpo utilizado, tiempo de incubación durante el desarrollo de la técnica y la temperatura ambiental, entre otras.^{25,27}

Cuando las muestras de tejido permanecen demasiado tiempo en formalina algunas proteínas se pueden desnaturalizar y enmascarar antígenos, lo que provoca que la reacción sea débil o nula.²⁵ Así mismo concentraciones bajas del anticuerpo utilizado pueden dar lugar a resultados falsos positivos o negativos.²⁵ Además, si el anticuerpo se descongela más de una vez pueden ocurrir alteraciones en los resultados.^{25,27}

A pesar de la alta sensibilidad de las técnicas azul de toluidina y Ziehl–Neelsen para la detección de gránulos de mastocitos neoplásicos, es recomendable buscar otras pruebas, que además de ser específicas, puedan proporcionar mayor sensibilidad sobre todo en el caso de las lesiones poco diferenciadas, como los mastocitomas grado III, o bien en tumores bien diferenciados, pero con una alta tasa de degranulación.

Este trabajo demuestra que la detección de triptasa puede ser considerada como una técnica útil para la confirmación de mastocitomas poco diferenciados. Lo anterior permite descartar otros tumores de células redondas cutáneos y el establecimiento de una terapia y pronóstico específicos.

CONCLUSIONES

Se detectó triptasa en la mayoría de los mastocitomas cutáneos de este estudio mediante inmunoperoxidasa por el método del complejo streptavidina-biotina.

La determinación de triptasa por inmunoperoxidasa es una prueba diagnóstica específica y útil para el diagnóstico de mastocitomas cutáneos en perros independientemente de su grado de diferenciación.

Es recomendable la determinación de triptasa en mastocitomas cutáneos caninos poco diferenciados (grado III).

El uso de la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de gránulos de mastocitos neoplásicos, tiene un sensibilidad muy parecida a la de azul de toluidina por lo tanto debe ser considerada como una herramienta más para el diagnóstico de estos tumores.

REFERENCIAS

1. Duncan JR, Prasse KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. Mast cell tumor, histiocytoma, lymphosarcoma and transmissible venereal tumor. *Vet Pathol* 1979;16 (6):673-679
2. Yaguer JA, Wilcock B.P. Color Atlas and text of surgical pathology of the dog and cat. Dermatopathology and skin tumors. Ontario, Wolf, 1994
3. Juárez RM, Aburto FE. Revisión de 558 casos de neoplasias cutáneas en perros durante el período 2000-2004. 2004 Mayo 26-28: Tepic (Nayarit). México. México D.F, Sociedad de Patólogos Veterinarios, A.C
4. Meuten, DJ. Tumors in Domestic Animals. 4 th ed. Iowa State Press, Ames Iowa USA, 2002
5. Patnaik, AK, Ehler, W.L and MacEwen, E.G. Canine cutaneous mast cell: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 1984;21: 469-474
6. Meleo, KA. Tumors of the skin and associated structures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27:73-77
7. O'Keefe DA. Canine mast cell tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1990;20 (4):1105-1114
8. Groos, TL, Ihrke, PJ and Walder, EJ. Veterinary Dermatopathology. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin diseases. USA. Mosby Year Book, 1992
9. Goldschmidt, MH and Shofer FS. Skin tumors of the dog and cat. Butterworth- Heineman. Great Britain, 1992

10. Rogers, KS. Mast cell tumors. Dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1996; 26: 87-101
11. Prophet B E, Mills B, Arrington BJ, Sobin, MD. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Métodos Histotecnológicos. Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) Washington D. C. 1992
12. Withrow, SJ, MacEwen EG. Small animal clinical oncology. 3 th ed. W.B. Saunders USA, 2001
13. Macy, DW. Canine mast cell tumors. *Vet Clin North Am Small Animal Pract.* 1985;15:783-800
14. Fox, LE, Rosenthal, CR, Twedt, C.D, Dubielzig, R.R, MacEwen E.G and Grauer, FG. Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. *J Vet Intern Med.* 1990;4 242-246
15. Cotran RS., Kumar V, y Robbins SL: Patología estructural y funcional. 6ª. ed. Edit. McGrae Hill Interamericana, México. D.F, 1999
16. La Due T, Price, GS, Dodge R, Page, RL and Thrall D.E: Radation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ult* 1998; 39: 101-109
17. London, A.C and Seguin B.: Mast cell tumors in the dog. *Vet Clin Small Anim Pract* 2003; 33: 473-489
18. Hahn A. K, King, K.G, Carreras, K.J: Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade- III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998) *J Am Vet Med Assoc*, 2004; 224:79-82

19. McCaw, LD, Miller, A.M, Bergman J.P, Withrow J.S, Moores, S.A:
Vincristine therapy for mast cell tumors in dogs. J Vet Inter Med
1997;11:375-378
20. Takahashi, T, Kadosawa T, Nasage M, Mochizuke, M Matsunaga S,
Nishimura, R and Sasaki N: Inhibitory effects of glucocorticoides on
proliferation of canine mast cell tumor. J Vet Med Sci 1997,59 (11):995-1001
21. Tizard, R.I: Inmunología Veterinaria: 6ª ed. México Edit. Magraw-Hill
Interamericana, 2002.
22. Metcalfe, D.D, Baram, D and Mekori AY: Mast cells. Physiol Rev
1997,77:1033-1079
23. Jolly, S, Coignoul F, Gabriel, A and Desmecht, D. Detection in bovine mast
cells: comparison of enzyme – and immunohistochemistry. J Comp Path
1999;120:269-279.
24. Walls FA, Jones BD, Williams, HJ, Church, KM and Holgate TS.
Immunohistochemical identification of mast cells in formaldehyde-fixed
tissue using monoclonal antibodies specific for tryptase. J Pathol
1991;162:119-126.
25. Vanda CB, Valero EG. Inmunohistoquímica diagnóstica. Memorias del
curso sobre inmunohistoquímica. 1997 junio 25, México, México (DF):
Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.1997:s/p
26. Naish JS, Boenish T, Farmilo JA, Stead HR. Immunochemical staining
methods. DAKO Corporation, Carpinteria California, 1989
27. Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme
immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffine-

- embedded tissues for diagnostic pathology. J Vet Diagn Invest 1991;3:101-111
28. Daniel, WW. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la Salud 4ª ed, Edit. Limusa, México, D.F, 2002
29. Cannas, JS and Schoning P: Canine mast cell tumors: a comparison of staining techniques. J Vet Diagn Invest. 1994;6: 458-465
30. Ozaki K, Yamagami T, Nomura K and Narama I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 Dogs. Vet Pathol 2002;39:557-564
31. Rest JR, Lee RL. Staining of mast cell granules by the Ziehl-Neelsen method and differential diagnosis of malignant dermal tumours in the dog. Vet Rec, 1979;104:79

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Figuras

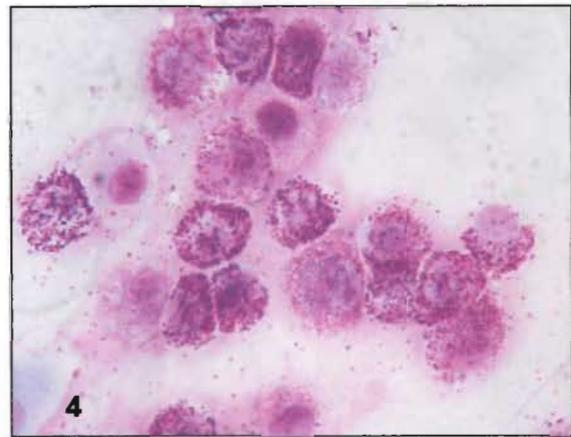
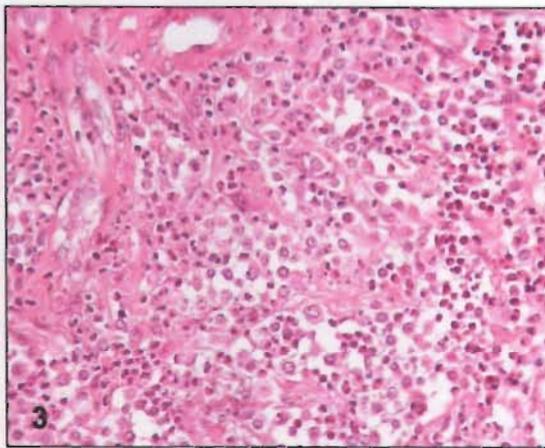
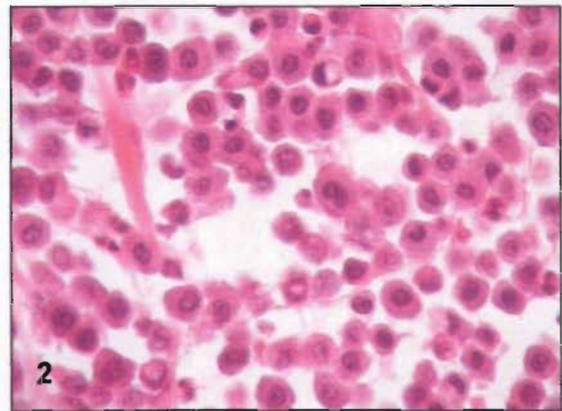
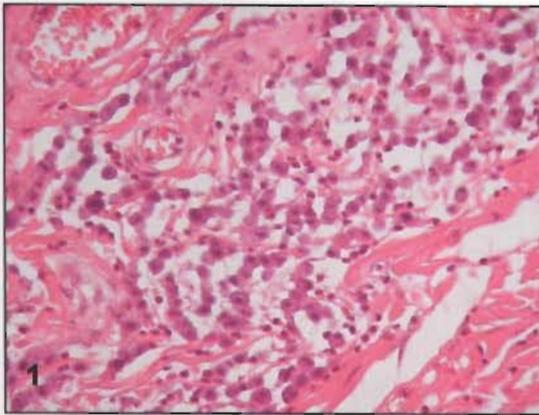


Fig.1 Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas con núcleo uniforme arregladas en cordones. Nótese la presencia de gránulos en el citoplasma, teñidos de azul o gris pálido. H y E, 1000x.

Fig.2 Fotomicrografía. Mastocitoma grado II. Células redondas que muestran pleomorfismo moderado y se arreglan en grupos irregulares. Sus núcleos son redondos o indentados, con cromatina dispersa, exhiben discreta variación de tamaño. En muchas de estas células se distinguen finos gránulos intracitoplasmáticos azules o gris claros. H y E, 1000x

Fig.3 Fotomicrografía. Mastocitoma grado III. Células pleomórficas con menor cantidad de gránulos en el citoplasma, anisocariosis marcada y nucléolos prominentes. Nótese la presencia de numerosos eosinófilos entremezclados. H y E, 1000x

Fig.4 Fotomicrografía. Preparación citológica de células cebadas neoplásicas, con núcleo redondo u oval con numerosos gránulos intracitoplasmáticos, que se tiñen metacromáticamente (azul o púrpura). Tinción de Diff- Quick, 1000x

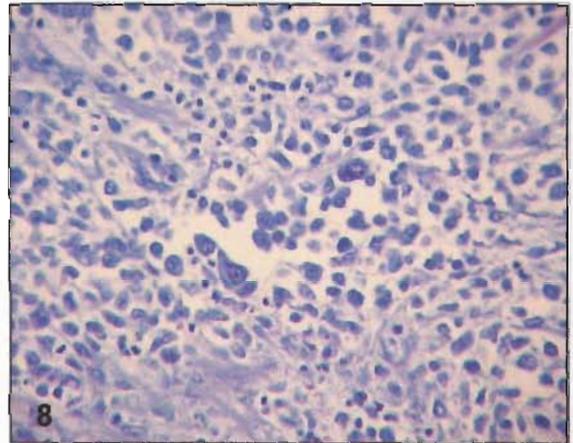
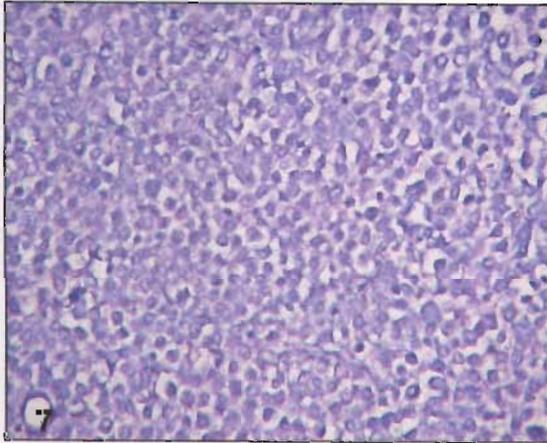
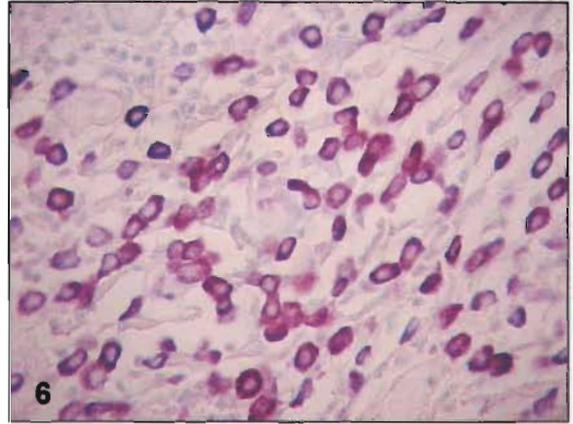
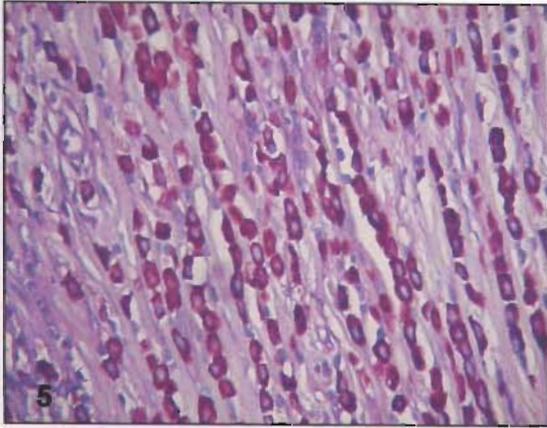


Fig.5 Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas que se disponen formando cordones y fuertemente positivas con la tinción azul de toluidina, 200x

Fig.6 Fotomicrografía. Mastocitoma grado I. Células redondas que se disponen formando cordones y muestran numerosos gránulos alcohol ácido resistentes con la tinción Ziehl- Neelsen, 400x

Fig.7 Fotomicrografía. Mastocitoma grado III o poco diferenciado, negativo a la tinción azul de toluidina, 200x

Fig.8 Fotomicrografía. Mastocitoma grado III negativo a la tinción de Ziehl-Neelsen, 400x

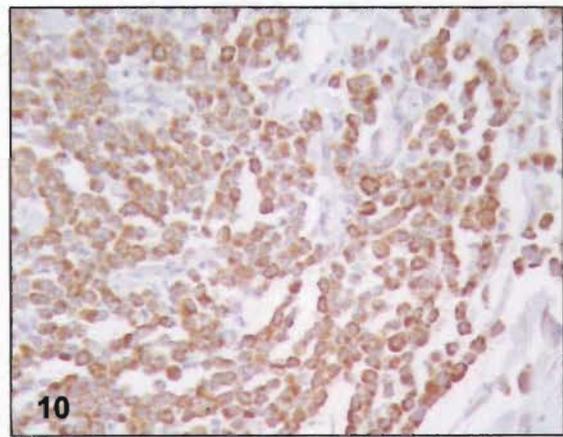
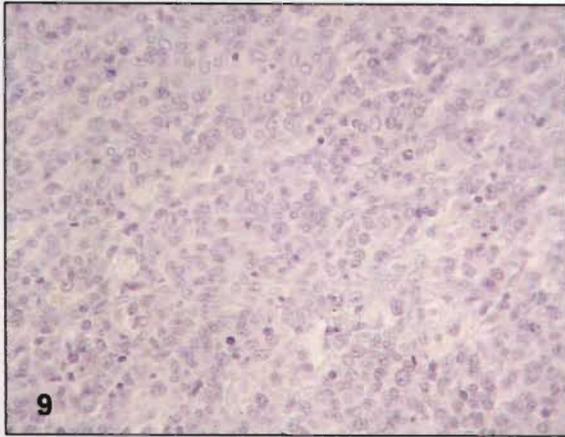


Fig. 9 Fotomicrografía. Histiocitoma canino. Tejido utilizado como testigo negativo para triptasa con la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa. 200x

Fig.10 Fotomicrografía. Mastocitoma grado I fuertemente positivo para triptasa por la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa. 200x

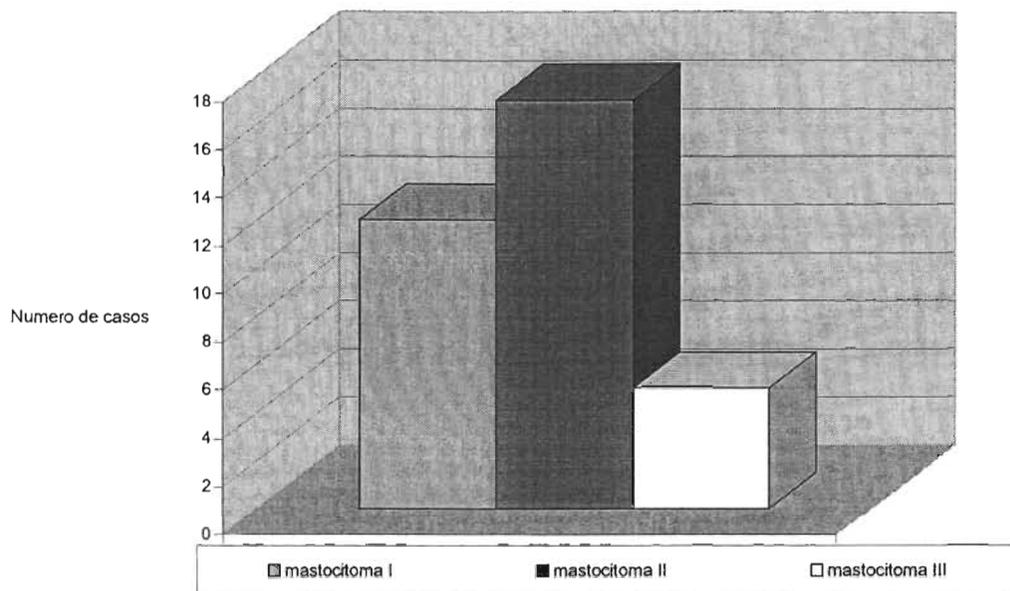


Figura 11. Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos con la tinción de azul de toluidina en los diferentes grados de diferenciación.

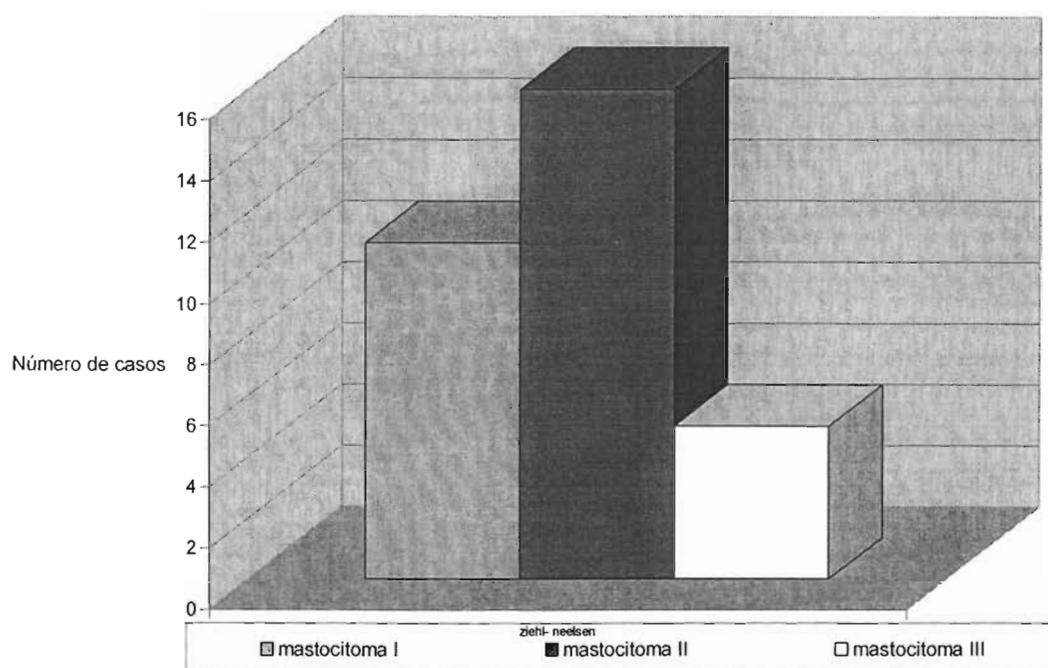


Figura.12 Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos con la tinción de Ziehl- Neelsen en los diferentes grados de diferenciación.

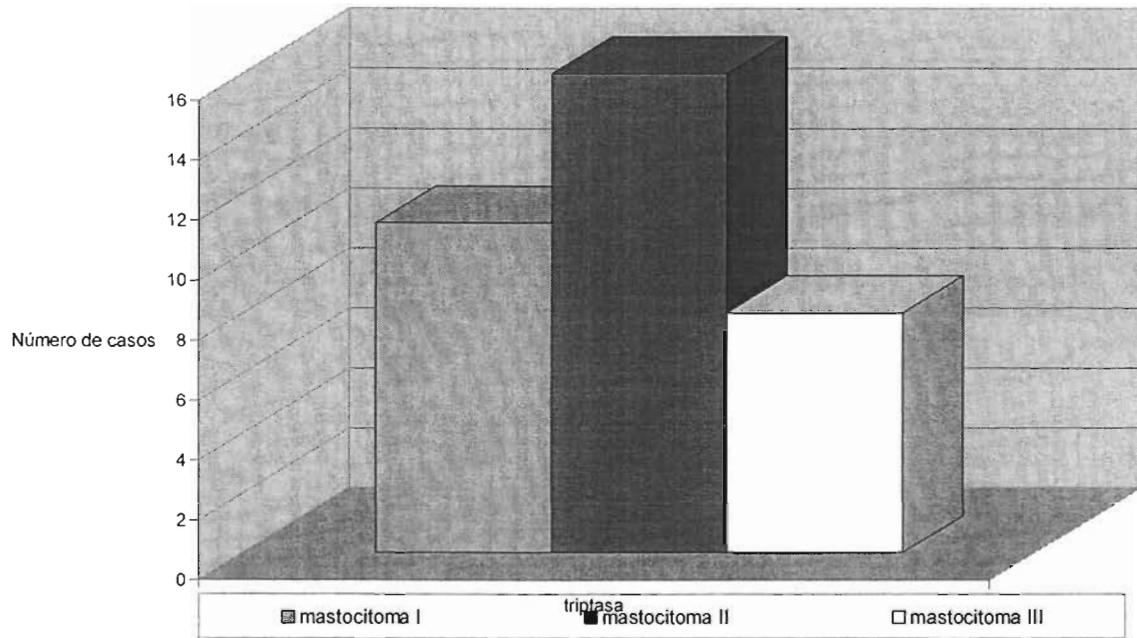


Figura 13. Número de mastocitomas cutáneos caninos positivos a triptasa por la técnica de streptavidina biotina inmunoperoxidasa en los diferentes grados de diferenciación.

APÉNDICE

Cuadro 1. Clasificación de 41 mastocitomas cutáneos caninos diagnosticados mediante histopatología

Mastocitomas grado I	12
Mastocitomas grado II	17
Mastocitomas grado III	12
Total de las muestras	41

Cuadro 2. Clasificación de 41 mastocitomas cutáneos caninos por grado de diferenciación y positividad para las técnicas histoquímicas e inmunoperoxidasa

GRADO DE DIFERENCIACIÓN	AZUL DE TOLUIDINA	ZIEHL-NEELSEN	INMUNOHISTOQUÍMICA PARA TRIPTASA
GRADO I	12/12 ^a	11/12 ^a	10/12 ^a
GRADO II	17/17 ^a	16/17 ^a	15/17 ^a
GRADO III	5/12 ^a	5/12 ^a	8/12 ^a

Diferentes literales en una columna indican diferencia estadística

Cuadro 3. Sensibilidad de las técnicas histoquímicas e inmunoperoxidasa para el diagnóstico de mastocitomas cutáneos por grado de diferenciación.

GRADO DE DIFERENCIACIÓN	AZUL DE TOLUIDINA	ZIEHL-NEELSEN	INMUNOPEROXIDASA TRIPTASA
GRADO I	100%	92%	92%
GRADO II	100%	94%	94%
GRADO III	42%	42%	67%
Total de las muestras	82%	78%	85%