

**Mastocitoma en caninos tratados con acetogeninas extraídas de *Annona muricata*:
Evaluación histopatológica**

Edison Yovan Sánchez Sánchez

Corporación universitaria lasallista

Facultad de ciencias administrativas y agropecuarias

Programa de medicina veterinaria

Caldas - Antioquia

2018

**Mastocitoma en caninos tratados con acetogeninas extraídas de *Annona muricata*:
Evaluación histopatológica**

Trabajo de grado Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Autor

Edison Yovan Sánchez Sánchez

Asesora

Juliana Mira Hernández

Medica Veterinaria, MCS.

Corporación universitaria lasallista

Facultad de ciencias administrativas y agropecuarias

Programa de medicina veterinaria

Caldas - Antioquia

2018

Agradecimientos

“Hoy quiero agradecerle en primer lugar a Dios por permitirme culminar esta etapa tan importante de mi vida, donde él más que nadie, fue testigo del sacrificio y la entrega continua en cada momento de mi carrera. Agradecerle a toda mi familia en especial a mi hermana Andrea por creer en mi cuando nadie mas lo hizo, por apoyarme y ser ese pilar para seguir hacia adelante.

Agradezco también a mi tutora por guiar cada uno de mis pasos profesionales y por sus consejos, todo valió la pena”.

A cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo de grado, muchas gracias.

Tabla de contenido

	Pag
Introducción	12
Justificación	14
Objetivos	16
Marco teórico	17
Signos	18
Etiología	19
Diagnóstico	21
Tratamiento	23
Nuevas expectativas de tratamientos	24
Metodología	27
Tipo de estudio	27
Tamaño de la muestra y localización del estudio	27
Recepción de los casos	27
Citología exfoliativa	28
Punción por aguja fina PAAF	28
Histopatología	30
Toma de la biopsia	32
Análisis y procesamiento de las muestras	33
Tinción hematoxilina y eosina	33
Desparafinado	34
Lectura y análisis de las placas	36

	5
Distribución de datos	38
Tratamiento	39
Extracción de las acetogeninas	39
Preparación de la formulación liposomal	39
Rota evaporación	40
Hidratación de los fosfolípidos	41
Extrusión	42
Preparación de la crema	42
Seguimiento de los pacientes	43
Aplicación del tratamiento	44
Análisis estadístico	45
Resultados	46
Localización de las masas	48
Sexo	49
Edad	50
Raza	50
Clasificación histopatológica	52
Conclusiones y discusión	63
Referencias	78

Lista de tablas

	Pag
Tabla 1. Mediadores secretados por los mastocitos.	20
Tabla 2. Procedimiento para tomar un aspirado con aguja fina.	29
Tabla 3. Procedimiento de tinción con coloración Hemacolor.	29
Tabla 4. Materiales para la extracción de la biopsia incisional.	31
Tabla 5. Preparación del reactivo Hematoxilina.	33
Tabla 6. Preparación del reactivo Eosina.	34
Tabla 7. Proceso de coloración de las placas.	35
Tabla 8. Clasificación histopatológica en la escala de Patnaik.	37
Tabla 9. Clasificación histopatológica en la escala de Kiupel.	38
Tabla 10. Descripción de grupos según el tratamiento elegido	38
Tabla 11. Información de cada paciente según su tratamiento	47
Tabla 12. Diagnóstico de los pacientes	48

Lista de imágenes

	Pag
Imagen 1. Mastocitoma cutáneo en la piel de un perro labrador de 3 años.	19
Imagen 2. Imagen citológica en 40X de un aspirado con aguja fina de un mastocitoma en un canino.	30
Imagen 3. Preparación de la masa para la toma de la biopsia.	32
Imagen 4. Bloques incluidos en parafina con las distintas muestras.	34
Imagen 5. Micrótopo TBS Shurt/cut Gentech®, USA.	35
Imagen 6. Recipientes con las distintas coloraciones histopatológicas.	36
Imagen 7. Placas histológicas coloreadas con H&E.	36
Imagen 8. Extracto de acetogeninas.	39
Imagen 9. Sistema de rota-evaporación	40
Imagen 10. Fotografía de un film de fosfolípidos.	40
Imagen 11. Valones volumétricos.	41
Imagen 12. Precipitado de liposomas.	42
Imagen 13. aplicación tópica de la formulación liposomal.	44

Lista de figuras

	Pag
Figura 1. Histopatología de mastocitoma canino.	22
Figura 2. Resumen del desarrollo metodológico.	43
Figura 3. Casos presentados durante la recolección de muestras.	46
Figura 4. Casos de mastocitomas encontrados en el proyecto.	48
Figura 5. Variable de localización.	49
Figura 6. Variable de sexo.	49
Figura 7. Variable de edad.	50
Figura 8. Variable de raza.	51
Figura 9. Histopatología Paciente 1. Grado I, ANTES.	54
Figura 10. Histopatología Paciente 1. Grado I, DESPUES (A).	55
Figura 11. Histopatología Paciente 1. Grado I, DESPUES (B).	56
Figura 12. Histopatología Paciente 1. Grado I, DESPUES (C).	57
Figura 13. Histopatología Paciente 3. Grado II, ANTES (A).	57
Figura 14. Histopatología Paciente 3. Grado II, ANTES (B).	58
Figura 15. Histopatología Paciente 3. Grado II, DESPUES.	58
Figura 16. Histopatología Paciente 4. Grado III, ANTES (A).	59
Figura 17. Histopatología Paciente 4. Grado III, ANTES (B).	60
Figura 18. Histopatología Paciente 4. Grado III, DESPUES (A).	61
Figura 19. Histopatología Paciente 4. Grado III, DESPUES (B).	62

Anexos

	Pag
Anexo 1. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (1): Hemograma: (Osama Antes).	66
Anexo 2. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (1): Hemograma: (Osama Después).	67
Anexo 3. Resultado de la citología del paciente 1 (Osama).	68
Anexo 4. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (2): Hemograma: (Jerry Antes).	69
Anexo 5. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (2): Hemograma: (Jerry Después).	70
Anexo 6. Resultado de la citología del paciente 2 (Jerry).	71
Anexo 7. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (3): Hemograma: (Ricardito Antes).	72
Anexo 8. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (3): Hemograma: (Ricardito Después).	73
Anexo 9. Resultado de la citología del paciente 3 (Ricardito).	74
Anexo 10. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (4): Hemograma: (Medusa Antes).	75
Anexo 11. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (4): Hemograma: (Medusa Después).	76
Anexo 12. Resultado de la citología del paciente 4 (Medusa).	77

Resumen

Entre los tumores de piel en perros el mastocitoma es una de las neoplasias más frecuentes en esta especie, los mastocitomas se caracterizan por ser tumores derivados de células mastocíticas, que migran para desarrollarse en el tejido conectivo de diversos órganos entre ellos la piel. En la actualidad la citología e histopatología son herramientas fundamentales en el diagnóstico de mastocitomas, en especial la histopatología, para establecer el grado histopatológico mediante una biopsia, además de permitir conocer el comportamiento y la progresión de la neoplasia. Los tratamientos actuales representan un riesgo latente para los mismos animales, por lo que se hace necesaria la utilización de nuevos productos quimioterapéuticos, como los biocompuestos. El objetivo de este estudio es evaluar los hallazgos histopatológicos del mastocitoma en caninos, antes y después de ser tratados con acetogeninas encapsuladas en liposomas, las cuales son biomoléculas derivadas de la guanábana. Se emplearon 4 perros diagnosticados con mastocitoma cutáneo, a los que se les aplicó tópicamente las acetogeninas, para posteriormente extraer biopsias del tumor y realizar un análisis histopatológico para diferenciar los distintos grados de malignidad que se pudieran presentar, así mismo como la progresión y comportamiento de la enfermedad.

Palabras clave: mastocitoma cutáneo, perros, acetogeninas, biopsia.

Abstract

Among cutaneous tumors in dogs, mast cell tumors are one of the most frequent neoplasms in this species, mastocytomas are characterized by tumors derived from mast cells, which migrate to develop in the connective tissue of various organs, including the skin. Currently, cytology and histopathology are fundamental tools in the diagnosis of mastocytomas, especially histopathology, to establish the histopathological grade through a biopsy, in addition to knowing the behavior and progression of the neoplasm. Current treatments represent a latent risk for the same animals, so it is necessary to use new chemotherapeutic products, such as biocomposites. The objective of this study is to evaluate the histopathological findings of the mastocytoma in canines, before and after being treated with acetogenins encapsulated in liposomes, acetogenins are biomolecules derived from the soursop. Four dogs diagnosed with cutaneous mastocytoma were used, to which acetogenins were applied topically, to then extract biopsies from the tumor and perform a histopathological analysis to differentiate the different degrees of malignancy that could occur, as well as the progression and behavior of the disease.

Key words: mast cell, dogs, acetogenins, biopsy.

Introducción

En la actualidad una de las preocupaciones de propietarios de animales son las enfermedades crónicas, que pueden llegar a afectar a sus mascotas como son los mastocitomas, los cuales representan una de las causas de muerte en perros mayores de 5 años (Matz, 2015). Este tipo de neoplasia es uno de los principales problemas de salud en la especie canina, su tratamiento se ha convertido en un reto para la medicina veterinaria. Como en la mayoría de los tipos de cáncer, los tratamientos que se emplean en los mastocitomas son la cirugía, la radiación y la quimioterapia; cada uno de ellos a ser realizado en pacientes según el grado y el curso de la enfermedad, representando riesgos para la salud de las mismas mascotas, como la anestesia en pacientes geriátricos (Coppo y Mussart, 2005), o el uso del tratamiento convencional donde los fármacos tradicionalmente utilizados presentan altos niveles de toxicidad, debido a su baja selectividad sobre células cancerígenas (Mayorga y Torres, 2014). Todos estos métodos podrían resultar onerosos para los propietarios por lo que es necesario abordar nuevas alternativas de tratamientos como los son los compuestos derivados de productos naturales. Dentro de los beneficios de emplear la medicina natural, a base de biocompuestos de plantas en la medicina veterinaria, se encuentra la fácil obtención del material vegetal, la diversidad de propiedades medicinales y el aprovechamiento de los recursos naturales de nuestro país. Entre la biodiversidad de la naturaleza, las plantas poseen gran cantidad de compuestos que pueden ser útiles en la cura y prevención del cáncer (Viegi y Ghedira, 2014).

Hoy en día se cuenta con medicamentos antineoplásicos provenientes de compuestos naturales, como los alcaloides de Vinca (*Catharantus roseus*), la vincristina y la vinblastina, el taxol de *Taxus brevifolia*, antibióticos como doxorubicina (adriamicina) de *Streptomyces peucetius* y la bleomicina de *Streptomyces verticillus*, entre muchos otros (Itokawa et al., 2008). Las acetogeninas son una potencial alternativa por su amplio rango de potencial biológico y su capacidad de bloquear la obtención de energía de la célula cancerígena (Schlie, González & Luna, 2009). Teniendo en cuenta lo anterior y siendo el mastocitoma una de las principales patologías cutáneas en caninos, la presente propuesta de investigación tiene objetivo evaluar y caracterizar hallazgos histopatológicos del mastocitoma en caninos tratados con acetogeninas como posible terapia alternativa.

Por lo tanto, la pregunta que se pretende responder es:

¿Pueden los extractos de *Annona muricata* (acetogeninas) causar cambios histológicos en caninos con mastocitoma cutáneo?

Justificación del proyecto

En la actualidad los perros como animales de compañía, han cobrado gran valor más que años atrás, solo en Colombia, seis de cada diez familias cuentan con una mascota entre ellas principalmente perros (Fenalco, 2015). Todo esto debido a múltiples factores entre ellos básicamente su fácil adaptación, las conductas que tienen estas mascotas y al vínculo emocional que se ha creado entre perros y humanos. A consecuencia de todo lo anterior la población de mascotas ha crecido, así mismo ha incrementado la demanda en servicios veterinarios. Lo que ha hecho que los propietarios se interesen cada vez más por la salud de sus animales de compañía (Atehortua, Orozco y Gómez, 2007).

Una de las principales enfermedades crónicas que sufren los perros son las neoplasias, siendo el mastocitoma de piel una de las más frecuentes, aunque todos los mastocitomas son potencialmente malignos y muchos de ellos tienen capacidad metastásica a otras estructuras consecuentes como lo son los ganglios linfáticos, por ser tumores que pueden llegar a alcanzar un crecimiento infiltrativo y posteriormente un mayor acceso a vasos linfáticos (Nieto, 2009). De acuerdo con lo anterior se hace necesario conocer la importancia de un diagnóstico oportuno para instaurar el tratamiento adecuado. En la actualidad la citología e histopatología son herramienta fundamentales en el diagnóstico de mastocitomas, en especial la histopatología, debido a que es un examen que proporciona mayor información que la citología, gracias a que se puede observar proliferaciones clonales de linfocitos y su patrón de distribución de sus gránulos citoplasmáticos, por lo que es necesario establecer el grado histopatológico mediante una biopsia (Merlo, 2000) además para conocer el comportamiento y la

progresión del mastocitoma (Blackwood et al., 2012; Rech et al., 2004). Entre las alternativas que se encuentran en la actualidad para tratar los mastocitomas se encuentra principalmente la escisión quirúrgica, la radioterapia y quimioterapia (Rios, 2008). Es por esto por lo que resulta importante evaluar los cambios histopatológicos en perros que sean tratados con una nueva molécula para determinar el grado de efectividad del tratamiento.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los hallazgos histopatológicos del mastocitoma en caninos, antes y después de ser tratados con acetogeninas.

Objetivos específicos

Clasificar histológicamente las lesiones cutáneas compatibles con mastocitomas en caninos según la escala de Kiupel y Patnaik.

Describir cambios histológicos en lesiones cutáneas compatibles con mastocitomas en caninos tratados y no tratados con acetogeninas.

Marco teórico

Actualmente las neoplasias constituyen uno de los mayores problemas de salud en las especies domesticas a nivel mundial. En los Estados Unidos, el cáncer continúa siendo la neoplasia más frecuente en perros mayores de 2 años, estimando que 1 de cada 4 perros podría morir de cáncer (Matz, 2015). En Colombia se reporta que el cáncer de piel es la neoplasia con mayor incidencia en caninos seguido de los tumores de la glándula mamaria (Ferreira, Pedraza y Arango, 2008).

El cáncer en caninos se ha comprobado que tiene gran predilección por diferentes tejidos en especial la piel y el tejido subcutáneo. Entre los tumores de piel en perros el mastocitoma es una de las neoplasias más frecuentes en esta especie, se estima que estos tumores abarcan más del 6% de todos los tumores en los perros (Giraldo, Aranzazu, Rodríguez y Pérez, 2003). El mastocitoma se caracteriza por ser uno de los tipos de neoplasias de piel y tejido subcutáneo con mayor incidencia en los caninos con un 18,8% entre los distintos cánceres de piel. (Withrow,Page y Vail, 2013).

Los tumores derivados de las células mastociticas en los caninos no tienen predisposición por sexo, pero se ha reportado predisposición por perros de raza Labrador principalmente, además de otras razas como el Bóxer, Boston terrier, Bull terrier, Cocker, Golden Retriever, Pit Bull y Sharpei, aunque puede aparecer en cualquier raza, la edad media de presentación es de entre 8 a 10 años, aunque han habido reportes de perros más jóvenes con esta presentación (Ríos, 2008) (Perpiñán y Durnnell, 2007).

Signos:

El mastocitoma cutáneo (MCTs) se distingue por ser un tipo de cáncer que afecta de manera común a perros y gatos, presentándose de manera solitaria o multicéntrica, además de una forma visceral, menos común, en el hígado, bazo o médula ósea. Se encuentran con mayor frecuencia en el tronco 50% (ver imagen 1.), extremidades 40% y cabeza y cuello 10%, rara vez se presentan en cavidad oral y conjuntivas (Gross; et al. 2008) (Ríos, 2008), en la manifestación clínica pueden presentarse como cualquier tipo de lesión primaria o secundaria de la piel, lo que puede dificultar su diagnóstico (Goldschmidt y Shofer, 1992); a nivel local pueden aparecer signos relacionados con la liberación de las sustancias vasoactivas, como eritema e inflamación incluso durante la misma manipulación de la masa, efecto conocido como “Signo de Darier” (Ríos, 2008), así como edema local. Entre la signología sistémica se presentan anomalías como la gastritis causada por la liberación excesiva de histamina y a su unión a los receptores H-2 de las células parietales del estómago, encardas de la producción de ácido clorhídrico; causando además anorexia, vomito, melena, dolor abdominal, y úlceras gástricas (Torres y Eslava, 2006) (Fox; et al. 1990).

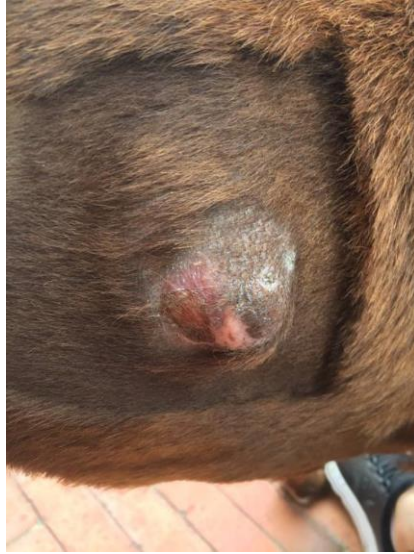


Imagen 1. Mastocitoma cutáneo en la piel, en la región del tórax de un perro labrador de 3 años. La piel muestra edema y úlceras cutáneas. Fuente propia.

Etiología:

El MCTs es un tumor derivado de células mastocíticas las cuales son células hematopoyéticas originadas de una célula progenitora mieloide pluripotencial (Reyes; et al. 2013), que migran para desarrollarse en el tejido conectivo de diversos órganos que se someten al contacto con antígenos externos, entre ellos el sistema digestivo, respiratorio y la piel, en este último se focaliza principalmente en la dermis o el tejido subcutáneo (Goldschmidt y Hendrick, 2002) (Oliveira; et al. 2013). Los mastocitos están relacionadas con procesos alérgicos, como una respuesta del sistema inmune tipo 2, asociada a los linfocitos T *helper* (TH2), esta respuesta se encuentra mediada por la inmunoglobulina E (IgE) la cual provoca la secreción o el almacenamiento de gránulos primarios y secundarios, equipados con sustancias como histamina, heparina, citoquinas proinflamatorias, proteasas, factores quimiotáxicos para neutrófilos y eosinófilos,

mediadores lipídicos; importantes además para el mantenimiento de la homeostasis a partir de su actividad inmunomoduladora, así como la reparación del tejido lesionado, incluso combaten contra bacterias y parásitos. Ver tabla 1. (Navia y Vásquez-López, 2011).

Tabla 1. Mediadores secretados por los mastocitos. Tomado y editado de (Feltrin, 2007) (Heredia,2014).

Sustancia	Mediador	Acción
Histamina	Primario	Aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción de la musculatura lisa del bronquio; aumento de producción de moco
Heparina	Primario	Anticoagulante (función no esclarecida en los mastocitos).
Condroitin sulfato	Primario	Función desconocida.
Aril-sulfatase	Primario	Inactivación de leucotrienos limitando la respuesta inflamatoria.
Proteasas neutras	Primario	Desdoblamiento de proteínas, activación del complemento y aumento de respuesta inflamatoria.
Factor quimiotáctico de eosinófilos	Primario	Quimiotáctico para eosinófilos.
Factor quimiotáctico de neutrófilos	Primario	Quimiotáctico para neutrófilos.
Leucotrienos C4 y D4	Secundario	Vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular, contracción de la musculatura lisa del bronquio.
Prostaglandinas D2	Secundario	Contracción de la musculatura lisa del bronquio, aumento de la secreción de moco.

El stem cell factor (SCF) o factor de crecimiento de células progenitoras, es uno de los factores descritos mas importantes en la formación, crecimiento y diferenciación de los mastocitos. El protooncogén c-Kit actúa como receptor transmembrana de tipo tirosin cinasa, cuya unión al SCF generan una fosforilación del mismo produciendo una serie de efectos bioquímicos encargados de la supervivencia de los mastocitos (Grimbaldeston; et al. 2005) (Reyes; et al. 2013); el gen que codifica c-Kit se conoce como KIT y una mutación en este gen seria el responsable de una proliferación excesiva en estas células, siendo una de las principales causas del mastocitoma, además de ser asociado con inflamaciones crónicas o aplicación excesiva de sustancias irritantes (Ríos, 2008) (Furitsu; et al. 1993) (London; et al. 1999).

Diagnostico:

Como métodos diagnósticos para el hallazgo de mastocitomas se han llevado a cabo a través de dos técnicas principalmente citología e histopatología, por otro lado, estudios inmunohistoquímicos sugieren la presencia de marcadores moleculares como c-Kit en estas neoplasias datos importantes para la identificación de este tumor (Zemke, Yamini y Yuzbasiyan-Gurkan, 2002) (Alleman y Bain, 2000).

La histopatología se realiza a partir de muestras obtenidas por una biopsia de tipo incisional o excisional. Normalmente se realiza una aspiración con aguja fina por citología exfoliativa para un diagnóstico previo de mastocitoma, pero la histopatología brinda una información más amplia acerca de diversos criterios, así como el grado de malignidad y pronostico del tumor. Para el diagnostico se emplean coloraciones como hematoxilina y eosina (H&E), donde se evidencia gránulos citoplasmáticos intensamente basófilos; sin

embargo, debido a su alta hidrosolubilidad es necesario el uso de fijadores especiales para su observación en el microscopio óptico, como métodos adicionales se emplean fijadores y coloraciones metacromáticas de azul de toluidina, tricrómico de Masson, azul alciano, Giemsa entre otros (Mondragón y Arango, 2010) (Heredia; et al. 2015).

Actualmente se encuentran dos sistemas para la clasificación tumoral del MCTs, el sistema tradicional propuesto por Patnaik, 1984. Ver figura 1, el cual clasifica en 3 grados de diferenciación celular, siendo el grado I el mas diferenciado y de mejor pronostico (mortalidad del 10%), grado II de diferenciación intermedia (mortalidad del 20 al 50%) y el grado III menos indiferenciado y de peor pronóstico (mortalidad del 80%) (Bostock, 1986); mientras Kiupel, 2011 plantea una nueva escala de clasificación mas objetiva con solo dos grados de clasificación, alto y bajo grado. Ver tablas 8,9.

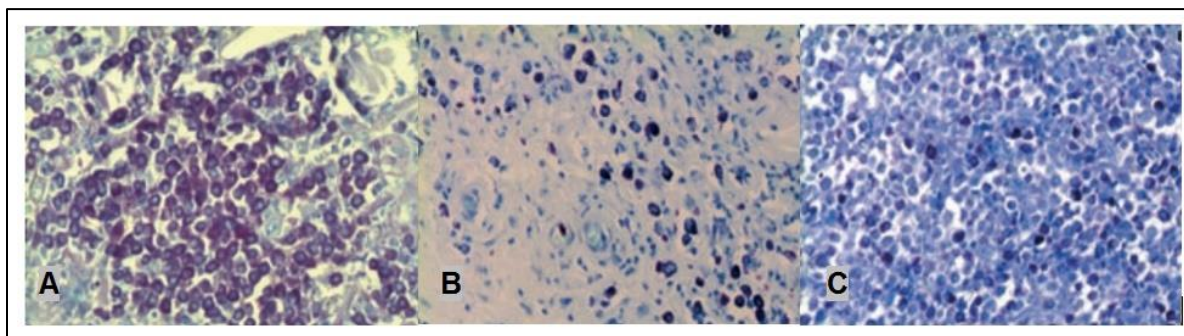


Figura 1. Histopatología de mastocitoma canino. Representación fotográfica de los distintos grados mastocitomas según la escala de Patnaik. A) Histología (tinción de Azul de Toluidina). Grado I: Evidencia la metacromasia de los gránulos de los mastocitos. B) Histología (tinción de Azul de Toluidina). Grado II: Aumento del grado de infiltración con respecto a los mastocitomas de grado I y un menor número de células positivas a Azul de Toluidina. C) Histología (tinción de Azul de Toluidina). Grado III: Obsérvese el escaso número de células teñidas con Azul de Toluidina (Nieto. 2009).

Tratamiento para el MCTs

El tratamiento convencional del MCTs es la cirugía a nivel local, ya que permite una extracción total de la masa y a su vez de las células cancerosas en el mismo procedimiento, se ha descrito una extracción amplia de la masa con mínimo 3 centímetros de margen libre alrededor de cada masa; se reporta mayor porcentaje de éxito cuando la masa se encuentra localizada en el tejido subcutáneo a comparación de las masas que se encuentran en zonas de difícil abordaje quirúrgico, como extremidades y cavidad oral, donde se recomienda el uso de tratamientos paliativos como quimioterapia.

El principal objetivo de la quimioterapia es evitar la diseminación o metástasis a órganos, es el tratamiento ideal para las mastocitosis de grado II y III cuando es difícil el abordaje quirúrgico; Los quimioterapéuticos más utilizados en el MCTs son: Prednisolona, Vinblastina, Lomustina y los inhibidores de tirosin quinasa (Toceranib Fosfato y Masitinib). Además, se ha descrito el uso de drogas como Ciclofosfamida o Clorambucil (Varela-Vargas, 2016).

Por otro lado, la radioterapia se emplea como otra alternativa para el tratamiento de estas neoplasias debido a que actúa de manera local dañando el ADN de las células cancerosas; no obstante, el uso de corticoides como la prednisolona esta indicada por la inducción de apoptosis en las células mastocíticas gracias a la unión de los glucocorticoides a receptores ubicados en la matriz citoplasmática de los mastocitos (Finotto, Mekori y Metcalfe, 1997)

Nuevas expectativas de tratamientos

El uso de extractos derivados de plantas ha sido la base de la medicina tradicional mucho antes de la llegada de la medicina occidental. Se ha podido demostrar que entre las más de 500 mil especies de plantas que existen, se podría encontrar en solo una especie más de 5 mil compuestos químicos (Tringali, 2000). Entre esta amplia gama de estructuras, se ha demostrado que cada una de ellas posee distintas funciones sobre el organismo, lo que podría brindar a la medicina gran diversidad de moléculas eventualmente para la producción de nuevos productos terapéuticos. Las civilizaciones antiguas usaban las plantas por sus bondades en la salud. En la actualidad, las plantas aún siguen siendo utilizadas debido a sus propiedades curativas y preventivas (Laza, Rodríguez y Sardiña, 2003).

La *Annona muricata*, también conocida como guanábana, proviene del árbol de la familia Annonaceae, Se domesticó en las tierras bajas de América del Sur como una planta de jardín; siendo un árbol de ramificación baja y espesa, midiendo aproximadamente de 4 a 8 metros de altura cuando ha culminado su desarrollo, sus tallos son redondeados y de consistencia rugosa, sus hojas poseen peciolo cortos, estas son ovales de 14 a 16 cm de largo y de 5 a 7 cm de ancho, su flor es considerada una de las más grandes del género Annonaceae midiendo de 3.2 a 3.8 cm de longitud (Pinto; et al 2005). La guanábana se ha cultivado en muchos países tropicales por sus frutos comestibles.

La guanábana se considerada además una fruta con múltiples bondades como agente antiparasitario y anticancerígeno (Quispe.; Ángel et al. 2006). Los primeros estudios se llevaron a cabo a partir de 1970 de los que se logró aislar alcaloides

isoquinolínicos en toda la planta. Se reporta que la *Annona muricata* posee más de 50 annonacinas con diferentes actividades biológicas encontradas en frutos, corteza y hojas (Kim; et al 2006).

Las acetogeninas son derivados policétidos con la particularidad de poseer una cadena alifática de hasta tres anillos de tetrahydrofurano (THF) los que algunas veces son reemplazados por anillos de epóxido o dobles enlaces, y con un anillo de γ -lactona insaturado metil sustituido como grupo terminal (Quispe.; Angel et al. 2006). El campo de la investigación se ha enriquecido ampliamente con el estudio de estas moléculas desde la primera acetogenina (uvaricina), reportada en 1982, se ha generado una expansión masiva con estas plantas por sus bondades biológicas, como lo es su capacidad citotóxica, pesticida, antiparasitaria y antitumoral (Tormo y González. 1999), en la extracción de compuestos naturales extraídos de plantas se reportan varios métodos a partir de fluidos supercríticos, y diversos disolventes como metanol, etanol, clorometano entre otros (Ortega-Barbosa, 2014).

Así mismo, en el campo de la oncología, las acetogeninas han sido blanco de múltiples estudios in vitro, en líneas celulares de cáncer por su alta capacidad citotóxica con resultados exitosos en líneas de células tumorales de cáncer prostático, carcinoma pancreático (Hopp; et al. 1996), carcinoma de glándula mamaria, carcinoma epidermoide, carcinoma pulmonar, adenocarcinoma de colón y células de hepatoma humano (Chang; et al. 2003)

La encapsulación liposomal de sustancias, es el uso de fosfolípidos para formar una monocapa vesicular con características de un medio interno acuoso, con el fin de encapsular diversas sustancias hidrofílicas y lipofílicas, el uso de la encapsulación

liposomal por medio de fosfolípidos ha demostrado mejorar el paso de moléculas activas a través de la piel (Sharma; et al. 2010), (Sanchoval-Arias, 2015).

Metodología

Tipo de estudio

Experimental

El presente estudio se realizó a partir de las biopsias obtenidas de los ensayos clínicos del macroproyecto “Nanotecnología farmacéutica: una estrategia de innovación”.

Tamaño de la muestra y localización del estudio

como resultado de los ensayos clínicos se muestrearon en total 41 perros, compatibles con masas a nivel cutáneo entre los diferentes municipios del área metropolitana del Valle del Aburra, Abejorral y Amaga del departamento de Antioquia, algunos se citaron en las instalaciones de la clínica veterinaria Hno. Marco Antonio Serna f.s.c de la Corporación Universitaria Lasallista, y otros se acudió directamente hasta el domicilio para su atención.

Recepción de los casos

Se realizó una reseña del paciente, donde se tomaron todos los datos específicos como edad, raza, sexo, estado reproductivo, procedencia, enfermedades previas, entre otros, con el fin de obtener la mayor información posible de cada individuo.

Posteriormente y tras una exhaustiva anamnesis se valoró el estado general del paciente para describir las lesiones accesibles, elaborando una lista de diagnósticos diferenciales y pudiendo así emitir un diagnóstico presuntivo, además de verificar su estado de salud general; se dispuso a tomar una muestra de la masa a partir de un

aspirado con aguja fina (PAAF), para confirmar el diagnóstico de MCTs; y posteriormente diagnosticados se realizó un diagnóstico histopatológico para determinar el grado de malignidad de dicha neoplasia.

Citología exfoliativa

Las muestras fueron dirigidas al Centro de Estudios Clínicos Veterinarios Hno. Marco Antonio Serna f.s.c de la Corporación Universitaria Lasallista, donde se procesaron para su evaluación macro y microscópica.

Punción con aguja fina:

El aspirado con aguja fina o punción con aguja fina (PAAF), es definido como la remoción de células, usando una aguja fina, en una masa sospechosa para propósitos diagnósticos. Sus ventajas se resumen en ser simple, eficaz, rápido y económico. Ver tabla 2. No deja cicatriz ni interfiere con la realización de otros estudios, es una manera eficaz para diagnosticar mastocitomas cutáneos en los que se ve la evidencia de células redondas con gránulos metacromáticos dispersos en su citoplasma. Ver imagen 2. Además, la presencia de eosinófilos ayuda a confirmar el diagnóstico a través esta herramienta (Cruz y Martínez 2002).

Materiales para realizar el PAAF

Para la toma de las muestras se empleó: Jeringa descartable de 3 mL de volumen, aguja de calibre 21, guantes de nitrilo, láminas portaobjetos, algodón, alcohol.

Tabla 2. Procedimiento para tomar un aspirado con aguja fina (Zamorano y Sepúlveda, 2002).

Asepsia con alcohol en la zona de la nodulación.
Se sostiene la masa entre el índice y el pulgar.
Se introduce la aguja en la masa.
Se mueve el extremo de la aguja con desplazamiento cortos para desprender las células del tejido.
Ejerciendo una presión negativa sobre el émbolo de la Jeringa se efectúa la aspiración $\frac{3}{4}$ partes de la jeringa.
Se saca la aguja y se desconecta de la jeringa.
Se llena de aire la jeringa y se reconecta la aguja, se deposita el contenido en el portaobjetos.
Se extiende la muestra con una segunda lámina.

Tinción de placas para citología exfoliativa

La preparación de la muestra se realizó a partir de la tinción Hemacolor la cual consta de colorantes hematoxilina y eosina (H&E). Ver tabla 3.

Tabla 3. Procedimiento de tinción con coloración Hemacolor (Cowell; et al. 2009).

Se realiza la fijación de la muestra en metanol para lo cual solo se requiere una inmersión corta en el frasco dispensador.
Esperar a que se seque la muestra
Luego se realizan 3 inmersiones cortas en el recipiente de eosina.
Luego se realizan de 5-6 inmersiones cortas en el recipiente de hematoxilina.
Luego se enjuaga y se deja secar durante 5 minutos.

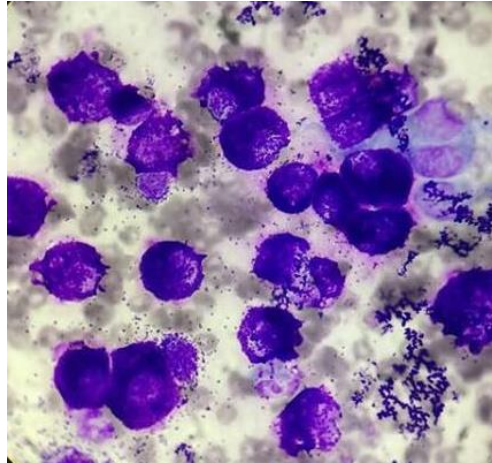


Imagen 2. Imagen citológica en 100X de un aspirado con aguja fina de un mastocitoma en un canino, donde se observa la presencia de células redondas cuyo núcleo no está bien definido por la presencia de gránulos citoplasmáticos basofílicos además de la presencia de eosinófilos, células que suelen aparecer en las citologías de mastocitomas. Fuente propia.

Histopatología

Luego del diagnóstico de MCTs a partir del PAAF, se procede a realizar nuevamente una anamnesis y un perfil básico en el paciente, el cual incluye exámenes rutinarios como hemoleucograma y bioquímica sanguínea, antes de realizar el procedimiento de toma de la biopsia, con el fin de determinar su estado hemodinámico y sistémico funcional.

Tabla 4. Materiales para la extracción de la biopsia incisional

Aguja hipodérmica de calibre 21
Jeringa de 3mL preferiblemente de rosca.
Sacabocados 7 mm
Anestésico local: lidocaína 2-4 mg/Kg
Sedación según el caso: acepromacina 0.08mg/Kg y tramadol 2mg/Kg
Guardianes
Pinza de disección con dientes
Tijeras
Sutura Corpalon® 2-0,
Gasas tejidas estériles
Marcador a prueba de agua
Hoja de bisturí # 22
Mango para bisturí #4
Frasco plástico boca ancha (tubos de citoquímico)
Solución salina al 0,9% 1º mL
Formalina al 10% 5 mL
Tapabocas
Batas de insumo y elementos de sujeción del animal.
Jeringa 3 mL
Porta objetos
Antibiótico de larga acción: Amoxicilina LA, a una dosis de 15 mg/Kg Subcutáneo (SC)
Analgésico: Meloxicam a una dosis de 0.2 mg/Kg SC

Preparación del paciente:

Se procede a tranquilizar el perro por medio de una premedicación con acepromacina a dosis de 0.08mg/Kg intramuscular y tramadol a 2mg/Kg intramuscular, se le coloca un bozal al perro y se dispone a localizar la masa, se realiza una tricotomía de la zona con tijera y posteriormente una limpieza con agua, se marca la zona donde se va a extraer la masa con marcador a prueba de agua. Ver imagen 3.



Imagen 3. Preparación de la masa para la toma de la biopsia. Fuente propia.

Toma de biopsia:

Se toman los materiales necesarios, ver tabla 4. Se inyecta mínimo 0.5 ml de lidocaína en el espacio subcutáneo, haciendo un bloqueo de los puntos trazados, se presiona con el sacabocados la zona, ejerciendo presión contra la piel y girando a 360° para elevar, se realiza un corte de 7 mm³, donde se debe tomar borde sano y parte tumoral; se remueve el resto de la pieza con hoja de bisturí y se deposita en el recipiente con formalina al 10%, se sutura usando sutura Corpalon® 2-0, se aplica una dosis de Amoxicilina LA, como antibiótico a dosis de 15 mg/Kg Subcutáneo (SC) y meloxicam como analgésico a dosis de 0.2 mg/Kg SC; todos los pacientes se mandan con collar isabelino mínimo por 10 días.

Análisis y procesamiento de las muestras

Las biopsias fueron tomadas antes y después del tratamiento elegido para cada grupo, posteriormente fueron dirigidas al Centro de Estudios Clínicos Veterinarios Hno. Marco Antonio Serna f.s.c de la Corporación Universitaria Lasallista, donde se procesaron para evaluación histopatológica. Las muestras fueron previamente fijadas con formol al 10%, se llevaron a un centro de inclusión con parafina, (TBS Tec II CP, Gentech®, USA) y procesador de tejidos (TBS GeneralData, Gentech®, USA), (imagen 4). Se cortaron a 4 µm de espesor en un micrótomo (TBS Shurt/cut Gentech®, USA) (imagen 5), y teñidas con Hematoxilina – Eosina (H&E), ver imágenes 6,7. Además de Giemsa y azul de toluidina para su diagnóstico diferencial según protocolo de tinción, (Luna, 1968), para la posterior descripción microscópica de la lesión y confirmación del diagnóstico; se fotografiaron los distintos epitelios y tipos de células con la ayuda de un microscopio de luz en objetivo de 100X con cámara fotográfica digital incorporada (Carl Zeiss, Microscopy GmbH®), en el laboratorio de microbiología industrial de la Corporación.

Tinción hematoxilina y eosina:

Tabla 5. Preparación del reactivo Hematoxilina

Adicionar 5,36 g del contenido de la parte A y 4,68 g de la parte B dentro de un frasco con capacidad de 150 mL.

Adicionar 100mL de agua destilada o desionizada.

Agitar hasta que disuelvan los reactivos.

Dejar reposar de 1 a 12 horas.

Adicionar de 3 a 5 mL de ácido acético para la conservación de la hematoxilina.

Filtrarlo antes de usar (Es normal observar una nata en la superficie de la preparación).

Tabla 6. Preparación del reactivo de Eosina

Adicionar .5,45 gramos de Eosina en un frasco oscuro.

Adicionar 100 mL de alcohol al 70%

Mezclar por 15-60 minutos hasta que el contenido se haya disuelto.

Usar inmediatamente o almacenar en un recipiente oscuro con tapa

Desparafinado:

1. Desparafinar en estufa a 58°C por 30 minutos.
2. Colocar las placas en xilol, durante 2 minutos por lavado.
2. Hidratar en una serie decreciente de alcohol 96, 90 y 80% por un minuto cada uno.



**Imagen 4. Bloques incluidos en parafina con las diferentes muestras.
Fuente propia.**

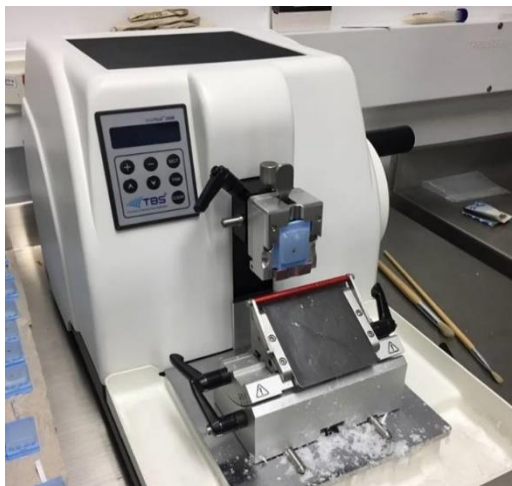


Imagen 5. Micrótopo TBS Shurt/cut Gentech®, USA. Fuente propia.

Tabla 7. Proceso de coloración de las placas.

Con gotero aplicar la solución colorante (hematoxilina) y dejar por 5 minutos o en frasco sumergir los portaobjetos.

Lavar en agua corriente en un recipiente hasta que no suelte colorante.

Sumergir en alcohol ácido para eliminar exceso de colorante por 2 segundos.

Lavar en recipiente con agua corriente de inmediato.

Adicionar agua alcalina y esperar a observar color azul, 1 minuto (96 mL de agua destilada + 4 mL de amoníaco al 1%).

Lavar en agua corriente de inmediato.

Con gotero adicionar Eosina al 1% por 30 segundos.

Lavar en agua corriente hasta que no quede colorante.

Deshidratar con etanol al 96% en cubetas verticales por 1 minuto por tres veces.

Luego con etanol absoluto 3 veces por 2 minutos cada uno.

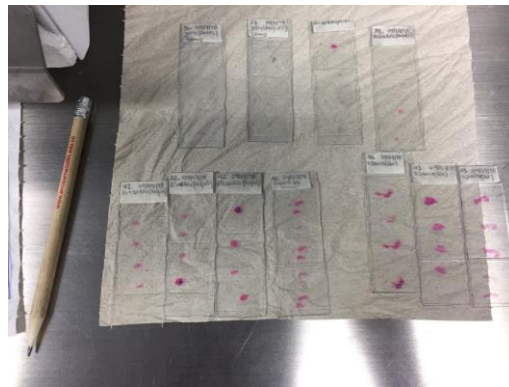
Aclarar con Xilol 3 veces por 1 minutos cada uno.

Colocar cubreobjetos con 1 gota de bálsamo de Canadá o la cantidad necesaria para colocar el cubreobjetos.

Limpia el borde del cubre objetos con xilol.



**Imagen 6. Recipientes con las distintas coloraciones histopatológicas.
Fuente propia.**



**Imagen 7. Placas histopatológicas coloreadas con H&E y azul de Toluidina.
Fuente propia.**

Lectura y análisis de las placas:

Se Inicia con observación a 10X (núcleos se observan de color azul, citoplasma y otras estructuras rosado). Se caracterizan según los criterios de clasificación dados por Kiupel y Patnaik, ver tablas 8,9. En el objetivo de mayor aumento se cuentan las mitosis por mínimo 5 campos, describe la morfología celular, se describen la presencia de gránulos, sino se caracterizarán con la tinción de Azul de Toluidina, se analiza además

la presencia de eosinófilos además de colagenolisis, esclerosis, edema, necrosis e inflamación, Para la clasificación histomorfológica de las muestras se llevaron a cabo a través del grado de diferenciación celular. Las neoplasias se agrupan en tres categorías donde se evalúan características como: Grado de lesión, celularidad (morfología), Índice mitótico (figuras mitóticas) y cambios a nivel del estroma celular (Patnaik et al. 1984).

Tabla 8. Clasificación histopatológica en la escala de Patnaik (Patnaik, A., Ehler, y McEwen, 1984).

<u>Bien diferenciado o Grado I:</u>	Su localización es principalmente dérmica, se distinguen mastocitos bien diferenciados con bordes citoplasmáticos definidos, separados por fibras de colágeno, son circunscritos, con núcleos redondos, se encuentra poca presencia de figuras mitóticas, presencia de abundantes gránulos citoplasmáticos Metacromáticos.
<u>De diferenciación intermedia o Grado II:</u>	Se caracterizan por poseer un patrón de crecimiento agresivo y con un pleomorfismo celular marcado, se encuentran acúmulos de células empaquetadas, con límites citoplasmáticos poco íntegros, se encuentra actividad mitótica atípica de moderada a alta y escasos gránulos citoplasmáticos, son raras las figuras mitóticas (0 a 2/campo de mayor aumento) además se pueden encontrar áreas de edema y necrosis.
<u>No diferenciado o Grado III:</u>	Son tumores anaplásicos e infiltrativos, similar al Grado II a excepción de la alta actividad mitótica que presenta este grado de neoplasia, además del patrón de crecimiento exageradamente alto y discontinuo, con presencia de células pleomórficas, anisocariosis e infiltración en dermis y tejido subcutáneo, (3 a 6 mitosis / campo de mayor aumento), predomina la presencia de células multinucleadas y células gigantes, y áreas de edema, hemorragia y necrosis frecuentemente

Tabla 9. Clasificación histopatológica en la escala de Kiupel (Kiupel; et al. 2011).

Lectura de 10 campos en 400X de aumento	
ALTO GRADO	BAJO GRADO
≥7 mitosis	Si no cumple con los criterios anteriores.
≥3 células tumorales multinucleadas	
≥3 células tumorales con núcleos anómalos	
≥10% de las células tumorales con cariomegalia	

Distribución de datos

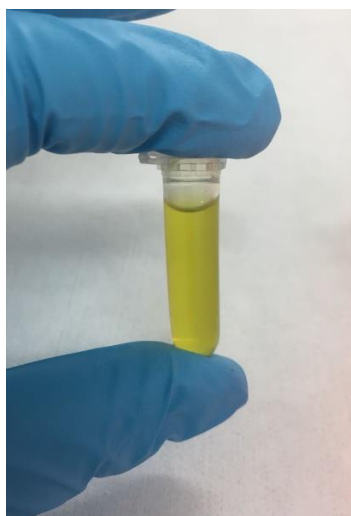
Los perros fueron divididos en dos grupos: 2 perros tratados tópicamente con acetogeninas a 50 mg/cm² y dos perros tratados con el tratamiento convencional, prednisolona con una disminución gradual, empezando a 2 mg/Kg por 24 horas, luego a 1 mg/Kg por 24 horas, luego a 0.5 mg/Kg cada 48 horas durante 10 días (Heredia N., 2014). Las biopsias fueron tomadas en dos momentos: antes y después del tratamiento, finalmente se les ofreció a los propietarios de los perros realizar la cirugía para la extracción de la masa luego del tratamiento. Ver tabla 10.

Tabla 10. Descripción de grupos según el tratamiento elegido.

GRUPO	Tratamiento	Vía de administración	Dosis
1	Acetogeninas encapsulación liposomal (LipoAnn) presentación de 0,5 cc	Tópica	Aplicación de la crema cada 8 horas, durante 10 días.
2	Prednisolona	Oral	1mg/Kg, cada 24 horas, haciendo disminución de la dosis durante 10 días.

Tratamiento:**Extracción de las Acetogeninas**

la extracción de las acetogeninas se realizó a partir de las semillas por medio de fluidos supercríticos en el laboratorio de fluidos supercríticos de la corporación universitaria lasallista, donde se obtuvo un extracto no purificado de acetogeninas. Ver imagen 8.



**Imagen 8. Extracto de acetogeninas a partir de fluidos supercríticos.
Fuente propia.**

Preparación de la formulación de liposomal

Para la encapsulación de las annonacinas en el liposoma LipoAnn, se empleó 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine DMPC, como fosfolípido para la encapsulación, se determinó que para la eficiencia de encapsulación era necesario 0.018g de DMPC para 10 μ M de annonacinas Ann, se adicionan en tubos de 1.5 ml separados y se resuspenden las Ann en 500 μ L de cloroformo, se agitan y mezclan por vórtex a 3000 rpm por 1 minuto, para luego adicionarse al tubo con DMPC y se le realiza nuevamente

vórtex en las mismas revoluciones y por el mismo tiempo. Luego se adiciona la mezcla a un balón volumétrico de 5 ml.

Rotaevaporación:

Este proceso consiste en remover todo el cloroformo de la mezcla y formar a partir de allí el ensamblaje de los liposomas, se coloca el balón de 5 ml en el condensador y se pone a evaporar con el fin de obtener un film delgado de fosfolípidos, ver imágenes 9,10.



Imagen 9. Sistema de rota-evaporación. Fuente propia.



Imagen 10. Fotografía donde se muestra dentro del rectángulo rojo un film uniforme de fosfolípidos. Fuente propia.

Hidratación de los fosfolípidos:

Se adiciona la solución hidratante (buffer fosfato pH 7,4 10 mM) 3 mL al matraz que contiene la mezcla de lípidos seca para obtener una suspensión primaria multilamelar de liposomas, todo esto se realiza dentro de cabina, para asegurar un ambiente estéril.

Posteriormente se realiza vórtex a 1000 rpm durante 1 minutos con el fin de que los lípidos presentes en el matraz se dispersen en el fluido de hidratación y mantener en baño María a 40°C (se coloca el balón dentro de un beaker con agua sobre una plancha de calor). Esto se realiza por aproximadamente 1 hora o hasta que despegue bien la película. Ver imagen 11.



Imagen 11. Balones volumétricos sobre la plancha de calor. Fuente propia.

Extrusión:

Se realiza a través de membranas con un tamaño de poro 0,8 micras, realizando aproximadamente 21 extrusiones, para obtener vesículas de un tamaño uniforme, luego se centrifugan los liposomas a 5000rpm a 4°C para obtener un precipitado en el fondo con los liposomas. Ver imagen 12.



Imagen 12. Fotografía donde se muestra dentro del círculo rojo, el pellet o precipitado de liposomas. Fuente propia.

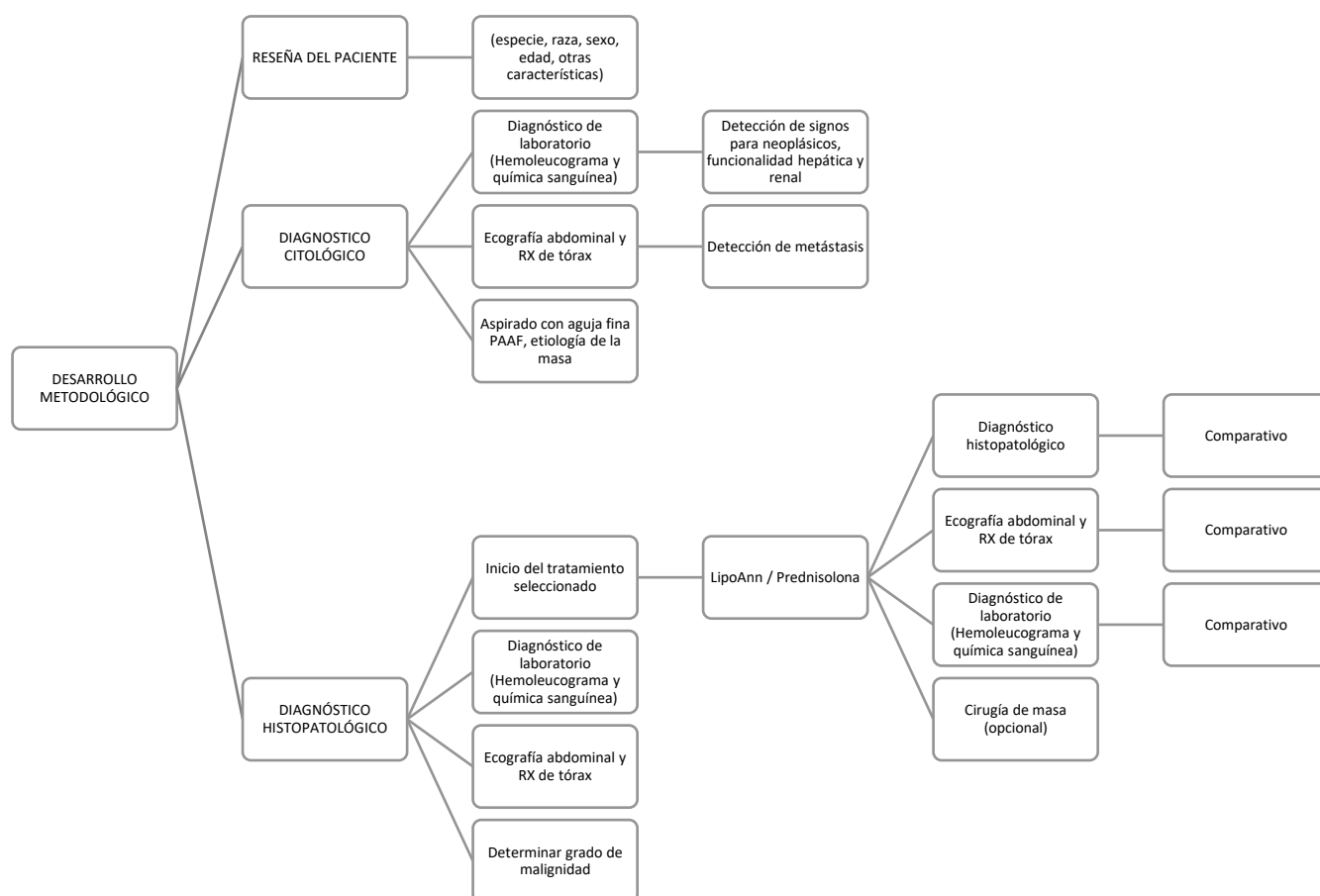
Preparación de la crema:

Se compro una crema base y se mezcló con las acetogeninas encapsuladas a menos 50°C para obtener una preparación al 10%.

Seguimiento de los pacientes

Antes y después de iniciar el tratamiento, se realizaron pruebas diagnósticas como Hemoleucograma, bioquímica sanguínea, ecografía abdominal y radiografía de tórax con el fin de realizar un seguimiento de cada paciente. Ver figura 2.

Figura 2. Resumen del desarrollo metodológico. Fuente propia.



Aplicación del tratamiento

LipoAnn: Diez días después de haberse realizado la biopsia inicial para el diagnóstico, se dio la aplicación tópica de la formulación, dos veces al día durante 8 días, finalizado el tratamiento se tomó una biopsia de la masa tratada, ver imagen 13.



Imagen 13. Fotografía donde se evidencia la aplicación tópica de la formulación de LipoAnn. Fuente propia.

Prednisolona: Diez días después de haberse realizado la biopsia inicial para el diagnóstico, se inicia la administración oral de prednisolona 1mg/Kg cada 24 horas haciendo una disminución gradual durante 10 días, finalizado el tratamiento se tomó una biopsia de la masa tratada. Ver tabla 11.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Microsoft Office Excel para la tabulación y organización de los datos a partir de la estadística descriptiva, debido a que no se determinaron hallazgos congruentes antes y después de los tratamientos, no se evaluaron las variables en términos de distribución de frecuencias, medidas de tendencia central y de dispersión, además de las diferencias entre grupos a partir de pruebas de Chi square, Fisher, ANOVA o kruskall wallis según hubiese sido caso.

Resultados

Del total de los 41 perros muestreados fueron positivos a MCTs 6 perros de los cuales solo se tomaron en cuenta las citologías de 4 perros diagnosticados, ver anexos 3,6,9,12. Esto debido a que 2 individuos diagnosticados con MCTs, además presentaban diferentes condiciones crónicas como enfermedad renal, hipotiroidismo y alteraciones hepáticas, por lo que se decidió excluirlos del proyecto; por otro lado, 11 perros fueron diagnosticados con lipoma, 9 perros no mostraron criterios de atipia celular, 3 con inflamación granulomatosa, 3 presentaron alta atipia celular no concluyente, 2 con quiste epidermal, 1 perro diagnosticado con tricoblastoma, 1 con melanocitoma, 1 con hiperplasia mamaria, 1 presentó inflamación purulenta y 5 con adenomas sebáceos. Ver figura 3.

Figura 3. Casos presentados durante la recolección de muestras

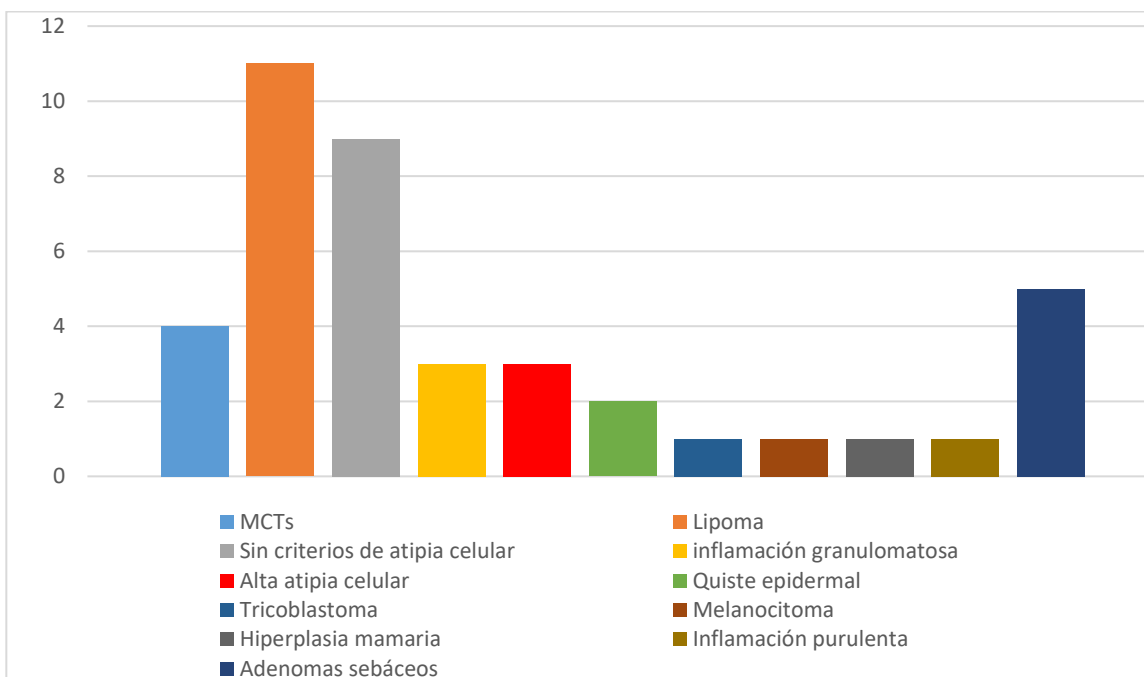


Tabla 11. Información de cada paciente según su tratamiento.

Perro	Raza	Sexo	Edad Años	Descripción de la masa	Municipio de procedencia	Diagnostico	Grupo	Tratamiento
A	Labrador	Macho	3	Masas nodulares múltiples en la región del tronco, cabeza y extremidades, de aproximadamente 5 cm de diámetro, con presencia de edema, eritema e inflamación.	Abejorral	Mastocitoma	1	LipoAnn
B	Pug	Macho	8	Masa nodular solitaria en la región del lomo, de aproximadamente 1 cm de diámetro con presencia de eritema y pigmentación.	Caldas	Mastocitoma	1	LipoAnn
C	Labrador	Macho	8	Masa nodular solitaria en la región del tronco, de aproximadamente 3 cm de diámetro, con presencia de inflamación y eritema.	Envigado	Mastocitoma	2	Prednisolona
D	Pit Bull	Hembra	10	Masas nodulares múltiples en la región de la pierna, de aproximadamente 6 cm de diámetro, con presencia de úlceras, inflamación, edema y eritema.	Medellín	Mastocitoma	2	Prednisolona

Por otro lado, la citología exfoliativa arrojó diagnósticos para mastocitomas en los cuatro pacientes. Ver anexos 3,6,9,12. Mientras la histopatología solo demostró un diagnóstico certero para MTCs en solo 3 perros. Ver Tabla 12.

Tabla 12. Diagnóstico de los pacientes.

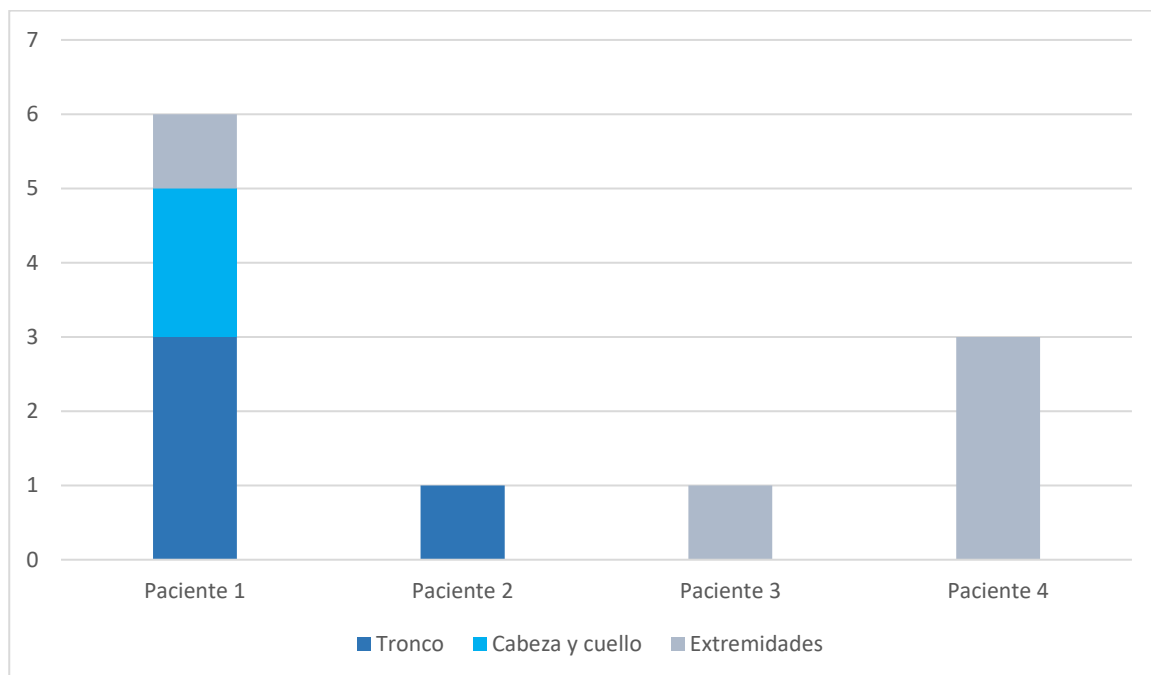
Perro	Raza	Sexo	Citología	Histopatología
1	Labrador	Macho	Mastocitoma	Mastocitoma
2	Pug	Macho	Mastocitoma	No concluyente
3	Labrador	Macho	Mastocitoma	Mastocitoma
4	Pit Bull	Hembra	Mastocitoma	Mastocitoma

Localización de las masas:

De los 4 perros diagnosticados, en 2 perros (50%) la localización de su masa se encontraba en la región torácica, mientras otros 2 perros (50%), sus masas se encontraban en las extremidades posteriores. Ver figuras 4,5.

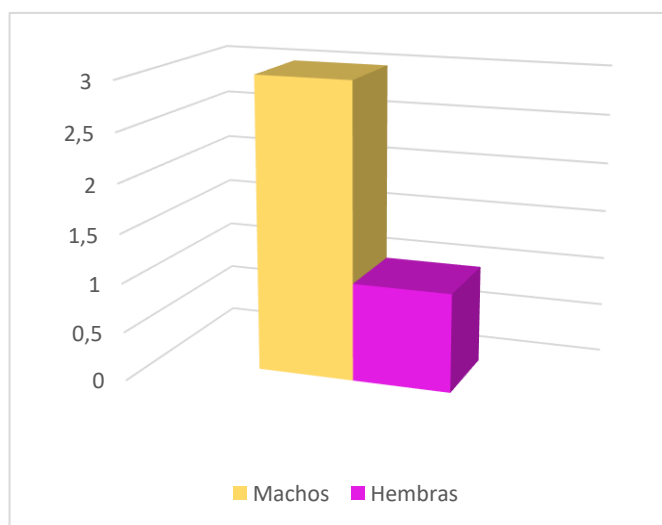


Figura 4. Casos de mastocitoma cutáneo confirmados por citología e histopatología, presentes en el proyecto. A) Masas múltiples de un mastocitoma multifocal presente en un perro raza labrador de 3 años, con presencia de ulceración y edema. B) Mastocitoma solitario en la zona del lomo de un perro raza pug de 8 años, con presencia de pigmentación en la zona de la masa. C) Mastocitoma solitario en perro raza labrador de 8 años, con presencia de eritema e inflamación de la masa. D) Masas múltiples de un mastocitoma en la región de la pierna de una perra raza pit bull de 10 años, con presencia de inflamación, úlceras y eritema. Fuente propia.

Figura 5. Variable de localización**Sexo:**

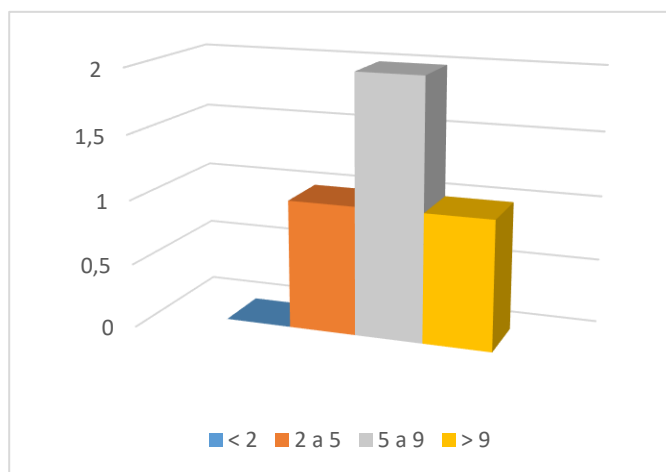
En cuanto al sexo 3 de los pacientes (75%) fueron machos, y 1 hembra (25%).

Ver figura 6.

Figura 6. Variable de sexo

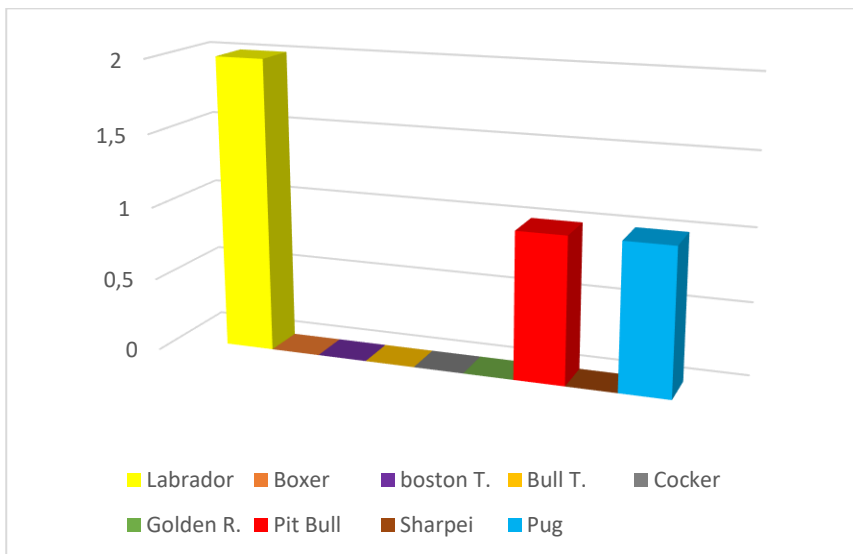
Edad:

Del total de perros encontrados con MCTs se clasificaron en 4 grupos etarios, menores de dos años de los que no se presentó ningún caso, de 2 a 5 años del que se presentó 1 caso, de 5 a 9 años de los que se presentaron 2 casos y mayores de 9 años, que se presentó 1 caso. Ver figura 7.

Figura 7. Variable de edad**Raza:**

Del total de pacientes compatibles con MCTs, se encontraron en 2 perros de raza Labrador (50%), 1 perro de raza Pug (25%) y un perro de raza Pit Bull (25%), en relación con las razas descritas (Ríos, 2008). Ver figura 8.

Figura 8. Variable de raza



En cuanto a los resultados de los hemogramas y químicas sanguíneas, el paciente 1 antes y después del tratamiento, se presentó en el cuadro hemático hallazgos normales; una neutrofilia relativa, la cual su valor absoluto se encontró dentro del rango, estando sobre el límite superior, ver anexos 1,2.

El paciente 2, antes y después del tratamiento se encontraron hallazgos normales en la línea roja y un ligero aumento en la línea blanca, denotando los gránulos cito-neutrófilos y monocitos levemente aumentados en ausencia de cambios tóxicos, ver anexos 4,5.

El paciente 3, antes de empezar el tratamiento presentó en la línea roja una moderada trombocitopenia, las plaquetas en el conteo automático se mostraban disminuidas, pero en el conteo microscópico se encontraron abundantes agregados plaquetarios que compensaban el resultado automatizado obtenido (trombocitopenia artefactual).

Los hallazgos mostraron además leucocitosis ligera con leve aumento de monocitos, en ausencia de cambios de activación. Estos resultados solo se presentaron antes de empezar el tratamiento, a excepción de un ligero aumento en la creatinina que se mantuvo en su valor en los exámenes posteriores a la terapia elegida, ver anexos 7,8.

El paciente 4, antes de empezar con el tratamiento no mostró ninguna alteración evidente en la línea roja, mientras que en la línea blanca evidenció una leve leucocitosis con aumento de neutrófilos y monocitos, luego del tratamiento el paciente presentó en la línea blanca una ligera neutrofilia además de una marcada linfopenia; esto es característico en pacientes que se les ha suministrado glucocorticoides, debido a un secuestro en tejido linfoide y en medula ósea de manera transitoria, así como una lisis de linfocitos no comprometidos en ganglios linfáticos (Latimer, 2011), la enzima hepáticas ALT, mostró además un marcado aumento, ver anexos 10,11.

Clasificación histopatológica:

Se realizó la clasificación histopatológica de las muestras, y no se determinó cambios evidentes en el grado histológico de la neoplasia antes y después de cada tratamiento, debido a esto ningún elemento ameritó hacerle análisis estadístico si de entrada al revisar histológicamente los tejidos, el grado de la neoplasia fue el mismo antes y después del tratamiento.

GRADO I según Patnaik y BAJO GRADO según Kiupel. (Paciente 1)

La población predominante de células neoplásicas era circunscrita de característica redonda a oval, con bordes celulares uniformes, agrupadas en cordones, ubicados en la

dermis superficial y dermis profunda, separadas por fibras de colágeno, con una cantidad abundante de citoplasma basófilo granuloso de color azul bien delimitado, un núcleo regular de redondo a ovalado que poseía cromatina condensada. Además, se encontró leve anisocitosis y anisocariosis, se observó 1 figura mitótica en diez campos de 40X. por otro lado, se encontró moderada presencia de eosinófilos, así como pocas áreas de edema, inflamación, colagenólisis y necrosis. Ver figuras 9,10,11,12.

GRADO II según Patnaik y BAJO GRADO según Kiupel. (Paciente 3)

En este paciente se destacó un mayor número de células neoplásicas con invasión profunda a tejido subcutáneo y planos más profundos de la piel, se encontró moderado pleomorfismo celular con cúmulos de células empaquetadas, el citoplasma celular se encontró de moderado a escaso, con límites citoplasmáticos poco íntegros, las células presentaron una mayor anisocitosis y el pleomorfismo también fue mayor, se encontraron 2 figuras mitóticas por campo de aumento en 40X y se acompañan de algunas áreas de edema y colagenólisis. Ver figuras 13,14,15.

GRADO III según Patnaik y ALTO GRADO según Kiupel. (PACIENTE 4)

Se presentó alta atipia celular con gran porcentaje de núcleos bizarros, con presencia de células multinucleadas, un patrón de crecimiento agresivo que infiltraba a planos más profundos de la dermis, tejido adiposo y músculo, con amplias áreas de necrosis, edema e inflamación. Se encontraron múltiples figuras mitóticas (4) por campo

de aumento en 40X, así mismo se observó multinucleolosis en algunas células. Ver figuras 16,17, 18, 19.

Figura 9. Histopatología Paciente 1: Grado I, ANTES

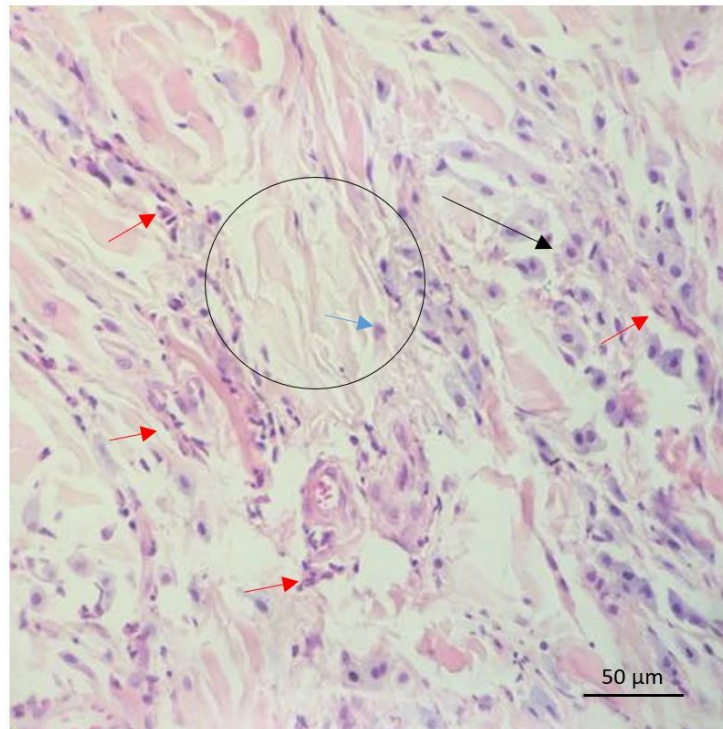


Figura 9. Microfotografía de mastocitoma canino de grado I, en perro de raza labrador de 3 años, H&E, 40X. Se observan mastocitos bien diferenciados distribuidos en cadenas o cordones, separados por fibras de colágeno señalados con la flecha negra, en el círculo de color negro se muestra áreas de edema y colagenólisis, además de un neutrófilo señalado con la flecha azul, se evidencia infiltración por parte de eosinófilos señalados con las flechas rojas. Fuente propia.

Figura 10. Histopatología Paciente 1: GRADO I, DESPUES (A)

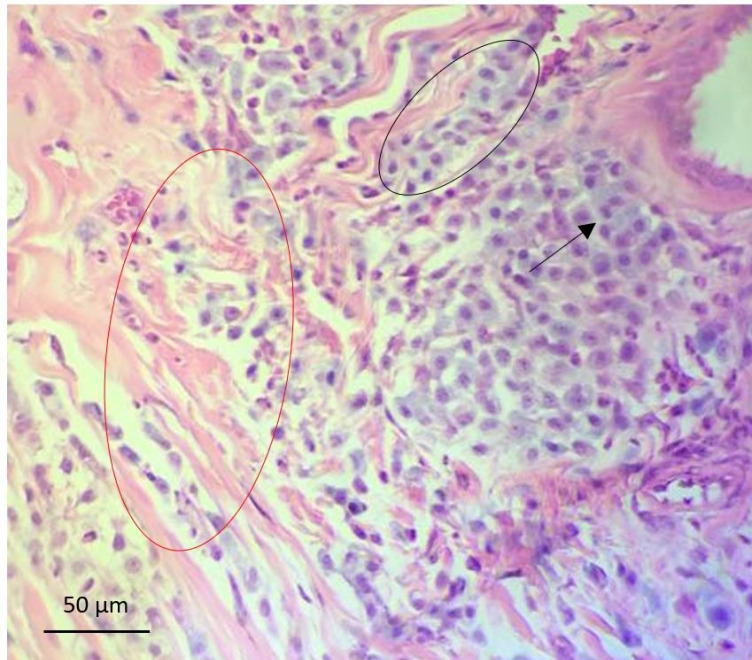


Figura 10. Microfotografía de mastocitoma canino de grado I, en perro de raza labrador de 3 años, H&E, 40X. Se evidencia un mastocito en mitosis señalado con la flecha negra, además de mastocitos bien diferenciados agrupados en cordones dentro del ovalo de color negro, así como alta celularidad, áreas de edema y colagenólisis dentro del ovalo rojo. Fuente propia.

Figura 11. Histopatología Paciente 1: GRADO I, DESPUES (B)

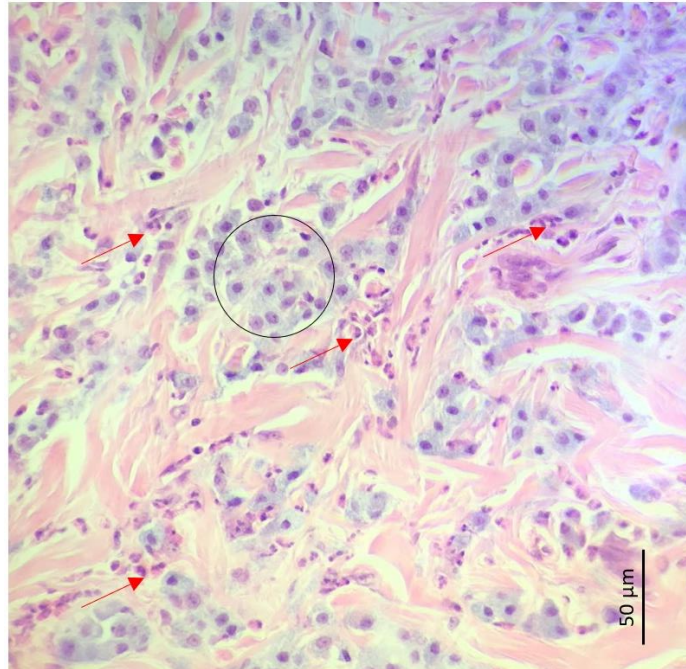


Figura 11. Microfotografía de mastocitoma canino de grado I, en perro de raza labrador de 3 años, H&E,40X. Se observan mastocitos bien diferenciados con amplio citoplasma granulado de color azul, escasas figuras mitóticas, dentro del círculo negro se muestran mastocitos con un solo nucléolo, además de infiltración de eosinófilos señalados con flechas rojas. Fuente propia.

Figura 12. Histopatología Paciente 1: GRADO I, DESPUES (C)

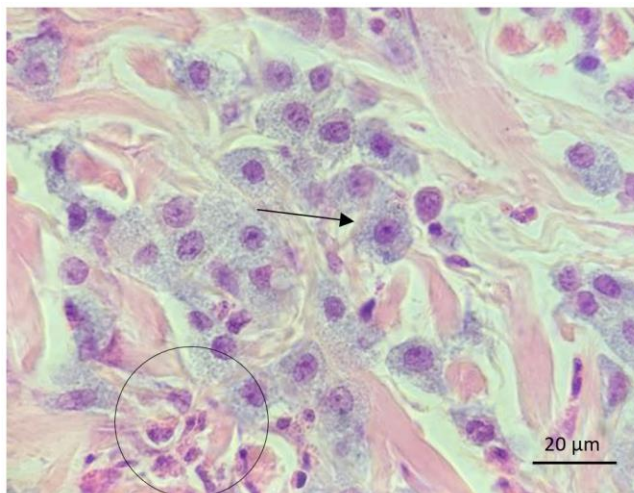


Figura 12. Microfotografía de mastocitoma canino de grado I, en perro de raza labrador de 3 años, H&E, 100X. Señalado con la flecha negra un mastocito bien diferenciado, con un núcleo prominente, un nucléolo voluminoso de color púrpura oscuro con un citoplasma abundante de característica granular de coloración azul, se observa también en el círculo de color negro infiltración por parte de eosinófilos. Fuente propia.

Figura 13. Histopatología Paciente 3: GRADO II, ANTES (A)

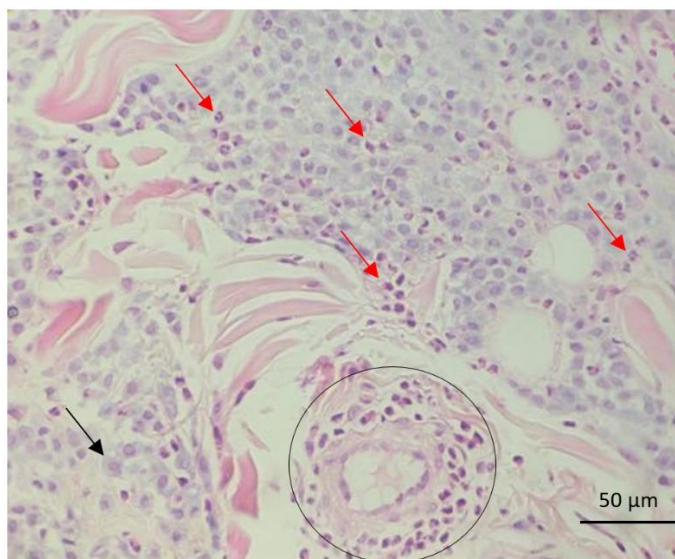


Figura 13. Microfotografía de mastocitoma canino de grado II, en perro raza labrador 8 años, H&E, 40X. Se observan mastocitos agrupados en islotes, un vaso linfático con inflamación perivascular dentro del círculo negro, pocas figuras mitóticas, así mastocitos atípicos y voluminosos con un citoplasma irregular señalado con flecha negra, también se muestra moderada infiltración de eosinófilos señalados con las flechas rojas. Fuente propia.

Figura 14. Histopatología Paciente 3: GRADO II, ANTES (B)

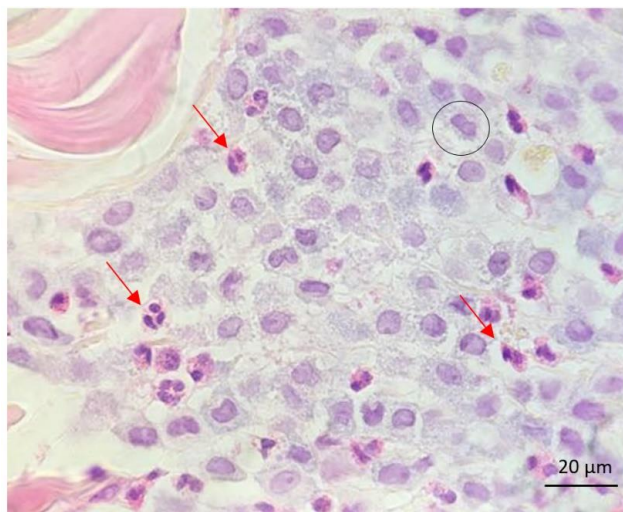


Figura 14. Microfotografía de mastocitoma canino de grado II, en perro de raza labrador de 8 años, H&E, 100X. Se muestra una figura mitótica dentro del círculo de color negro y presencia de eosinófilos señalados con las flechas rojas. Fuente propia.

Figura 15. Histopatología Paciente 3: GRADO II, DESPUÉS

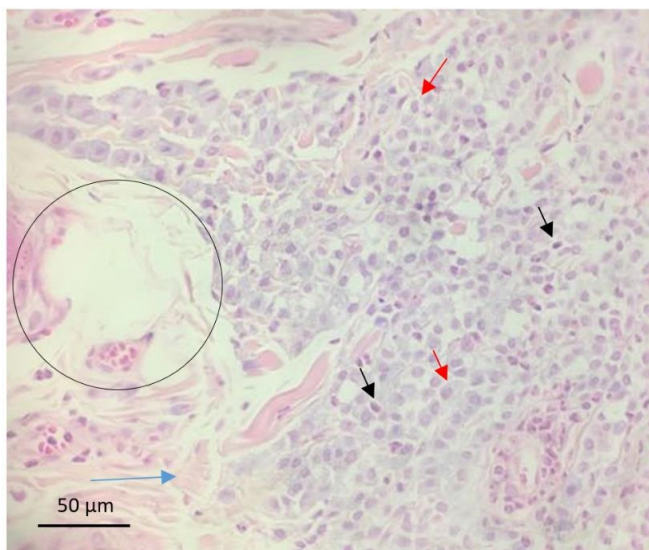


Figura 15. Microfotografía de mastocitoma canino de grado II, en perro de raza labrador de 8 años, H&E, 40X. Se observa alta proliferación de células redondas, con moderado pleomorfismo y atipia celular señaladas con las flechas rojas, se observa la presencia de algunas figuras mitóticas en las flechas negras, así mismo la presencia de edema señalado dentro del círculo de color negro y zonas de colagenólisis en la flecha azul. Fuente propia.

Figura 16. Histopatología Paciente 4: GRADO III, ANTES (A)

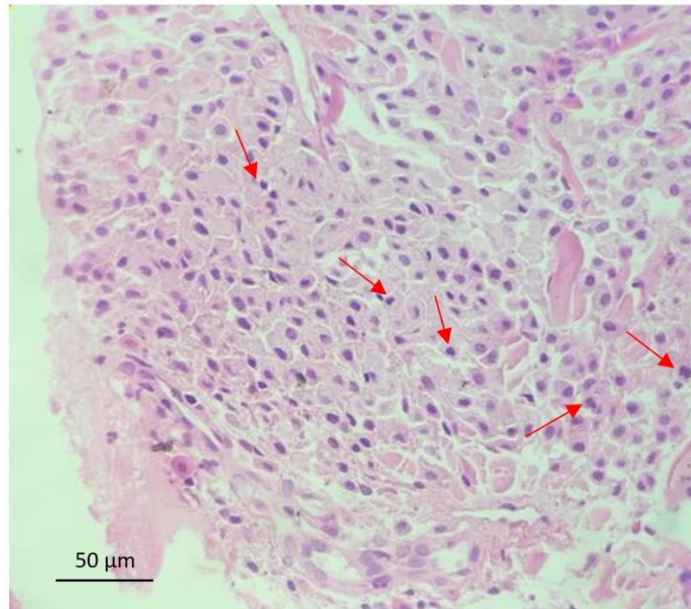


Figura 16. Microfotografía de mastocitoma canino de grado III, en perra de raza pit bull de 10 años, H&E, 40X. Se observa alto pleomorfismo celular y anisocariosis, los mastocitos se disponen a agruparse en un patrón de sabana con escasas fibras de colágeno y poca infiltración por parte de eosinófilos, se evidencia múltiples figuras mitóticas señaladas con las flechas de color rojo. Fuente propia.

Figura 17. Histopatología Paciente 4: GRADO III, ANTES (B)

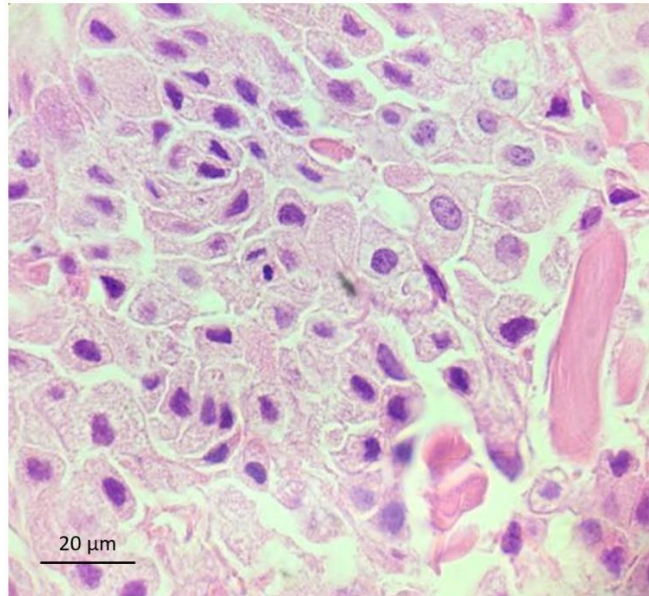


Figura 17. Microfotografía de mastocitoma canino de grado III, en perra de raza pit bull de 10 años, H&E, 100X. Se evidencia marcada anisocariosis, anisocitosis y pleomorfismo celular, así como escasa infiltración de eosinófilos. Fuente propia.

Figura 18. Histopatología Paciente 4: GRADO II, DESPUES (A)

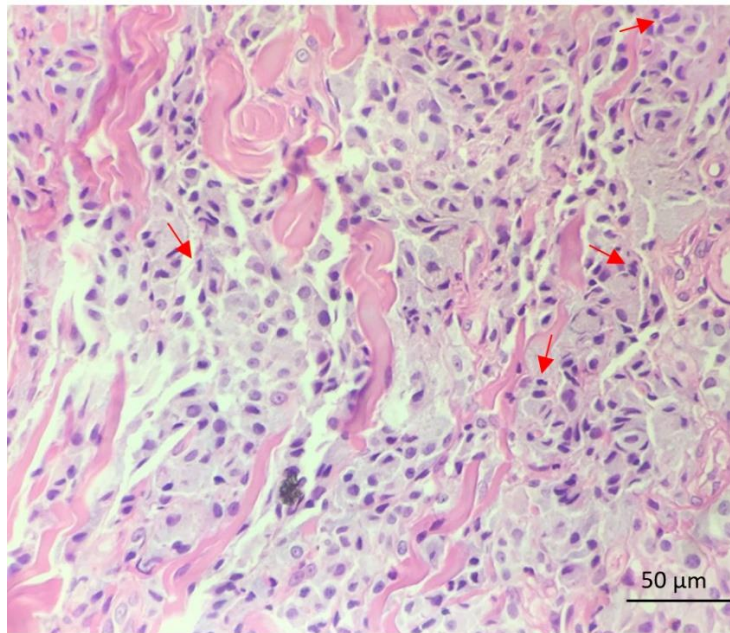


Figura 18. Microfotografía de mastocitoma canino de grado III, en perra de raza pit bull de 10 años, H&E, 40X. Se observa alta proliferación celular con formas atípicas, que van desde redondas-ovales a fusiformes, marcado pleomorfismo celular, así como múltiples figuras mitóticas señaladas con las flechas de color rojo. Fuente propia.

Figura 19. Histopatología Paciente 4: GRADO II, DESPUES (B)

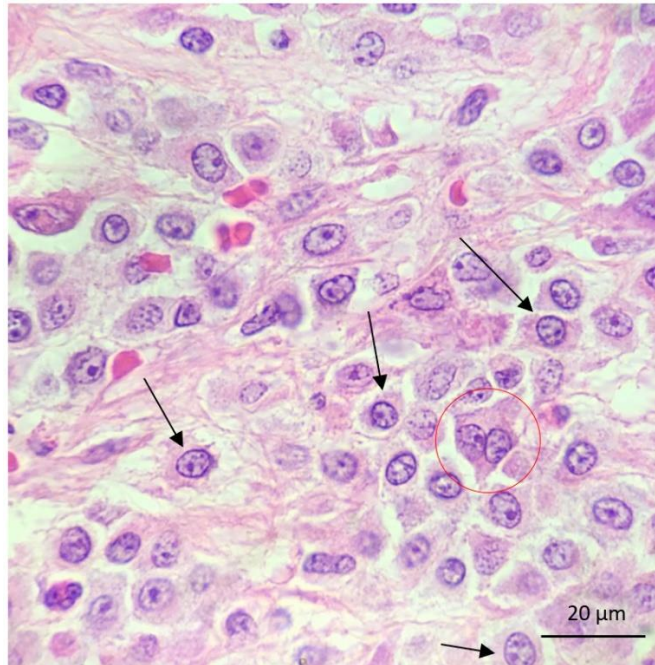


Figura 19. Microfotografía de mastocitoma canino de grado III, en perra de raza pit bull de 10 años, H&E, 100X. Se destacan mastocitos con una menor relación de su núcleo con respecto al citoplasma, se evidencia en las flechas negras multinucleolosis y una binucleación dentro del círculo rojo.

Conclusiones y discusión

El mastocitoma cutáneo es una de las neoplasias mas comunes en los caninos (Withrow, Page y Vail, 2013), aunque en este estudio se evidenció diferentes tipos de alteraciones cutáneas con una mayor frecuencia, como lo fueron alteraciones de tipo inflamatorio, tumores benignos (lipomas), además de muestras no concluyentes a partir de la citología exfoliativa, datos diferentes a los obtenidos en estudios anteriores realizados en nuestro país donde se reporta el MCTs con una mayor incidencia (Ferreira y Pedraza, 2003) (Bravo et al; 2010).

Conforme con lo descrito con North y Banks, 2009 el MTCs tiene una mayor frecuencia de manifestación en sitios como la región del tronco 50%, datos concordantes con los obtenidos en esta investigación, por otro lado, y conforme con los resultados de Thompson et al; 2011 correlaciona la presentación de MCTs en hembras con mayor frecuencia de localización en miembros, datos similares a los encontrados.

La mayor forma de presentación de MCTs fue la forma cutánea donde 2 perros tenían masas solitarias, según lo descrito por Rios, 2008 es la forma más común y con mayor porcentaje; sin embargo, los otros 2 perros poseían múltiples nodulaciones contrario a Kaldrymidou et al., 2002 donde se reportan bajas incidencias de presentación 9%.

La edad promedio de los perros con MCTs fue de 7,25 años, edad mayor a 5,8 años reportados por Heredia et al; 2015 y 6,8 años por Feltrin en 2007, pero inferior a los datos arrojados por Webster et al; 2007 donde la media de edad se encontró en 9.7 años y Patnaik en 1984 donde describió una edad media de presentación entre 8.2 y 10.5 años.

La mayor frecuencia en perros de raza Labrador concuerda con los resultados obtenidos por Gómez Contreras, 2015 y Mochizuqui et al; 2017, en el que además se reportó otras razas con alta predisposición como Bulldog y Bóxer entre otras.

En cuanto al sexo se encontró mayor tendencia en machos conforme a los reportes de Heredia et al; 2015, por otro lado, Feltrin, 2007 encontró mayor predisposición en hembras. Aunque se apunta que no existe relación entre el sexo y la de presentación del MCTs.

Las características histológicas de las muestras de MCTs fueron similares a las descritas por Patnaik, 1984 y Dores et al; 2018.

La clasificación histopatológica según las escalas de Kiupel y Patnaik clasificaron uno de los pacientes como bajo grado según Kiupel, grado II según Patnaik, esto muestra inconsistencias debido a que no se ha definido claramente el comportamiento clínico de los mastocitomas grado II en comparación con el tiempo de supervivencia, por lo que se recomienda como manera más segura para el pronóstico el uso de técnicas con marcadores de proliferación celular a partir de la inmunohistoquímica para obtener un pronóstico más certero (Gómez Contreras, 2015).

Las anonnacinas se han descrito por alta cualidad citotóxica sobre diversas líneas celulares de cáncer (Chang et al; 2003) (Hopp et al; 1996), sin embargo no mostraron ningún efecto in vivo sobre los sujetos de estudio antes y después del tratamiento con LipoAnn, esto se podría deber a la baja encapsulación de estas moléculas debido a varios factores contundentes como el método de extracción, el cual se realizó a partir de fluidos supercríticos, donde el extracto resultó en gran parte ser un compuesto oleoso y no purificado de múltiples acetogeninas, esto conllevó a una baja encapsulación

liposomal debido a que los liposomas se han descrito con una mayor encapsulación para sustancias hidrofílicas al ser vesículas anfifílicas basadas en los lípidos de las membranas biológicas (Lanio et al; 2009). Este hallazgo se debe describir tal cual (cualitativo) y discutir a la luz de los resultados ya reportados, de lo que falta aún por estandarizar en liposomas o tal vez evaluar mejores mecanismos de liberación y administración (por ejemplo, la vía oral) y defendiendo la utilidad de las acetogeninas de acuerdo a los resultados parciales in vitro en nuestro estudio aún sin reportar, donde las acetogeninas solas han demostrado actividad citotóxica a través del daño de membrana celular.

La prednisolona sigue siendo uno de los tratamientos ideales en primera instancia para combatir esta enfermedad según el grado de progresión del tumor según los resultados de Stanclift y Gilson, 2008, no obstante se deben tener medidas en cuanto a los posibles efectos secundarios del uso de estos glucocorticoides como lo son el síndrome de Cushing, diabetes, trastornos gastrointestinales, enfermedades oculares, leucopenia e inmunosupresión, alteraciones del equilibrio hidroeléctrico, problemas a nivel hepático entre otras (Macêdo, 2014).

En cuanto a las perspectivas a futuro se considera fortalecer más el campo de investigación para la resolución de este tipo de cáncer debido al comportamiento impredecible de esta enfermedad, tomando en cuenta las fallas metodológicas presentes para lograr desarrollar de manera más exitosa cualquier tipo de planteamiento en cuanto a nuevas alternativas como cura para el MCTs.

Anexos

Anexo 1. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (1): Hemograma: (Osama Antes)

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.44	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	15.9	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	45.2	%	37-55	Hipocromía	-	- a +++	Negativo
V.C.M	70	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	24.7	Pg	22-27	Plaquetas	236	$\times 10^9/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	35.1	g/dl	32-37	Proteínas P	68	g/l	55-75
ADE	14.9	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	12.500	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	375	/ μ l	0-200	Basófilos	3	%	0-1%
Eosinófilos	0	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	0	%	1-10%
Neutrófilos	9.875	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	79	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	1.875	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	15	%	12-30%
Monocitos	375	/ μ l	100-700	Monocitos	3	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritrocitaria normal.
Serie Blanca	Neutrofilia relativa
Serie Plaquetaria	Normal.

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	26	U/l	21-102
Creatinina	0.8	mg/dl	0.5-1.5

**Anexo 2. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente
(1):
Hemograma: (Osama Después)**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.43	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	15.0	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	43.7	%	37-55	Hipocromía	+	- a +++	Negativo
V.C.M	68	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	23.3	Pg	22-27	Plaquetas	335	$\times 10^9/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	34.3	g/dl	32-37	Proteínas P	64	g/l	55-75
ADE	15.3	%	12-18				
Metarrubricitos	1	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	10.210	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	408	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	4	%	1-10%
Neutrófilos	7.862	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	77	%	55-75%
Bandas	102	/ μ l	0-300	Bandas	1	%	0-3%
Linfocitos	1.225	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	12	%	12-30%
Monocitos	613	/ μ l	100-700	Monocitos	6	%	1-7%

Serie Roja	Hipocromía +.
Serie Blanca	Neutrofilia relativa.
Serie Plaquetaria	Macroplaquetas en cantidad escasa.

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	35	U/l	21-102
Creatinina	0.7	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones:

Anexo 3. Resultado de la citología paciente 1 (Osama)

MUESTRA ANALIZADA: Punción con aguja fina de múltiples masas cutáneas	DESCRIPCIÓN: La muestra analizada presenta abundante celularidad caracterizada por Mastocitos bien diferenciados, con profusa granulación azul púrpura metacromática que cubre gran parte de la célula y dispuestas individualmente o en agrupaciones densas. Se observa anisocitosis y anisocariosis. Algunas de las láminas analizadas presentan abundantes eritrocitos, bien conservados, y eosinófilos en cantidad moderada, acompañando las agrupaciones de Mastocitos. Escasas células fusiformes con citoplasma moderado, mal definido, de tonalidad azul clara y presentando núcleo fusiforme con cromatina cordonada, compatibles con fibroblastos. No se observan microorganismos.	INTERPRETACIÓN: Compatible con Mastocitoma.
--	--	--

**Anexo 4. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio de los pacientes (2):
Hemograma: (Jerry Antes)**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.37	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	14.8	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	45.0	%	37-55	Hipocromia	-	- a +++	Negativo
V.C.M	71	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	23.3	Pg	22-27	Plaquetas	292	$\times 10^9/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	32.9	g/dl	32-37	Proteínas P	70	g/l	55-75
ADE	15.1	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	14.780	μ l	7.000-14.000	Leucocitos $\times 100$			
Basófilos	148	μ l	0-200	Basófilos	1	%	0-1%
Eosinófilos	443	μ l	100-1.500	Eosinófilos	3	%	1-10%
Neutrófilos	11.528	μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	78	%	55-75%
Bandas	0	μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	1.921	μ l	1.000-4.500	Linfocitos	13	%	12-30%
Monocitos	739	μ l	100-700	Monocitos	5	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritroide normal
Serie Blanca	Leucocitosis ligera; Neutrofilia y monocitosis absoluta.
Serie Plaquetaria	Normal

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	55	U/l	21-102
Creatinina	1.0	mg/dl	0.5-1.5

Observación:

**Anexo 5. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio de los pacientes (2):
Hemograma: (Jerry Después)**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.92	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	16.4	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	47.8	%	37-55	Hipocromia	-	- a +++	Negativo
V.C.M	69	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	23.8	Pg	22-27	Plaquetas	340	x 10 ⁹ / μ l	200-500
C. Hb.C.M	34.4	g/dl	32-37	Proteínas P	72	g/l	55-75
ADE	14.9	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	19.300	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	386	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	2	%	1-10%
Neutrófilos	14.861	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	77	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	3.088	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	16	%	12-30%
Monocitos	965	/ μ l	100-700	Monocitos	5	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritroide normal
Serie Blanca	Leucocitosis ligera, neutrofilia y monocitosis absoluta.
Serie Plaquetaria	Normal

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	37	U/l	21-102
Creatinina	0.7	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones:

Anexo 6. Resultado de la citología paciente 2 (Jerry)

MUESTRA ANALIZADA: Punción con aguja fina de masa en lomo.	DESCRIPCIÓN: La muestra analizada evidencia profusa cantidad de Mastocitos dispuestos individualmente o en agrupaciones densas, caracterizados por abundante granulación azul púrpura metacromática que cubren casi la totalidad de la célula; Se observa anisocitosis y anisocariosis. Eritrocitos abundantes bien conservados junto con agregados plaquetarios escasos y eritrocitos policromatófilos. Moderada presencia leucocitaria de tipo mixto con aumento de eosinófilos. No se observan microorganismos.	INTERPRETACIÓN: Compatible con Mastocitoma.
---	--	--

**Anexo 7. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (3):
Hemograma: (Ricardito Antes).**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	7.04	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	17.3	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	50.4	%	37-55	Hipocromía	-	- a +++	Negativo
V.C.M	72	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	24.6	Pg	22-27	Plaquetas	164 *	x 10 ⁹ / μ l	200-500
C. Hb.C.M	34.3	g/dl	32-37	Proteínas P	82	g/l	55-75
ADE	14.6	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	15.220	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	609	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	4	%	1-10%
Neutrófilos	9.893	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	65	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	3.957	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	26	%	12-30%
Monocitos	761	/ μ l	100-700	Monocitos	5	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritrocitaria normal.
Serie Blanca	Leucocitosis ligera, monocitosis ligera.
Serie Plaquetaria	Se observan macroagregados plaquetarios en cantidad abundante.

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	58	U/l	21-102
Creatinina	1.6	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones:

**Anexo 8. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (3):
Hemograma: (Ricardito Después).**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.16	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	15.1	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	43.9	%	37-55	Hipocromía	-	- a +++	Negativo
V.C.M	71	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	24.5	Pg	22-27	Plaquetas	218	$\times 10^9/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	34.3	g/dl	32-37	Proteínas P	72	g/l	55-75
ADE	14.9	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	12.930	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	517	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	4	%	1-10%
Neutrófilos	9.051	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	70	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	2.715	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	21	%	12-30%
Monocitos	647	/ μ l	100-700	Monocitos	5	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritroide normal
Serie Blanca	Normal
Serie Plaquetaria	Normal

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	53	U/l	21-102
Creatinina	1.6 *	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones: *Confirmado por repetición

Anexo 9. Resultado de la citología paciente 3 (Ricardito)

<p>MUESTRA ANALIZADA: Punción con aguja fina de masa ubicada en la region de la pierna</p>	<p>DESCRIPCIÓN: Macroscópicamente se evidencia un rocío de material oleoso que no seca correspondiente con grasa; En la microscopia se evidencia un fondo con lípidos libres y gránulos gruesos libres; Se evidencia moderada presencia de elementos de estirpe redondo y caracterizados por amplio citoplasma con abundante granulación azul purpura metacromática característica de las células cebadas (Mastocitos), los cuales se encuentran dispuestos tanto individualmente como en acúmulos de pocos elementos no cohesivos. Muchas células se observan degranuladas.</p>	<p>INTERPRETACIÓN: Compatible con Mastocitoma</p>
	<p>Presencia leucocitaria en cantidad moderada con aumento de eosinófilos.</p>	
	<p>Se evidencia una moderada presencia de adipocitos dispuestos individualmente o en agrupados y caracterizados por un amplio citoplasma uniloculado que no colorea conteniendo un núcleo excéntrico de aspecto elongado con cromatina densa levemente reticulada sin nucléolos evidentes. Eritrocitos escasos medianamente conservados.</p>	
	<p>Se observan ocasionales células fusiformes con escaso citoplasma terminado en colas y núcleo elongado compatible con posibles fibroblastos con bajo grado de reactividad.</p>	

**Anexo 10. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente (4):
Hemograma: (Medusa Antes).**

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.57	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	16.3	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	47.5	%	37-55	Hipocromía	-	- a +++	Negativo
V.C.M	72	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	24.9	Pg	22-27	Plaquetas	472	$\times 10^3/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	34.4	g/dl	32-37	Proteínas P	66	g/l	55-75
ADE	14.6	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	14.280	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	143	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	1	%	1-10%
Neutrófilos	11.710	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	82	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	1.000	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	7	%	12-30%
Monocitos	1.428	/ μ l	100-700	Monocitos	10	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritroide normal
Serie Blanca	Leucocitosis ligera; Neutrofilia y monocitosis absoluta.
Serie Plaquetaria	Normal

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	26	U/l	21-102
Creatinina	1.1	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones:

Anexo 11. Resultados de los exámenes clínicos de laboratorio del paciente
(4): Hemograma: (Medusa Después).

Serie Roja	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Eritrocitos	6.02	mill/ μ l	5.5-8.5	Anisocitosis	-	- a +++	Escaso
Hemoglobina	15.1	g/dl	12.0-18.0	Policromasia	-	- a +++	Negativo
Hematocrito	43.3	%	37-55	Hipocromía	-	- a +++	Negativo
V.C.M	72	Fl	60-77	Howell-Jolley	-	- a +++	Negativo
H.C.M	25.1	Pg	22-27	Plaquetas	447	$\times 10^9/\mu$ l	200-500
C. Hb.C.M	34.8	g/dl	32-37	Proteínas P	70	g/l	55-75
ADE	14.6	%	12-18				
Metarrubricitos	0	En 100 leuc	0				

Serie Blanca	Valor	Unidad	V.R		Valor	Unidad	V.R
Formula Absoluta				Formula Relativa			
Leucocitos totales	11.580	/ μ l	7.000-14.000	Leucocitos x 100			
Basófilos	0	/ μ l	0-200	Basófilos	0	%	0-1%
Eosinófilos	116	/ μ l	100-1.500	Eosinófilos	1	%	1-10%
Neutrófilos	10.538	/ μ l	3.300-10.000	Neutrófilos	91	%	55-75%
Bandas	0	/ μ l	0-300	Bandas	0	%	0-3%
Linfocitos	232	/ μ l	1.000-4.500	Linfocitos	2	%	12-30%
Monocitos	695	/ μ l	100-700	Monocitos	6	%	1-7%

Serie Roja	Morfología eritroide normal.
Serie Blanca	Neutrofilia absoluta; linfopenia absoluta.
Serie Plaquetaria	Normal.

Analito	Resultado	Unidades	Valor de Referencia
ALT (Alanino aminotransferasa)	314	U/l	21-102
Creatinina	1.0	mg/dl	0.5-1.5

Observaciones:

Anexo 12. Resultado de la citología paciente 4 (Medusa)

MUESTRA ANALIZADA: Aspirado con aguja fina de masa ubicada en cara medial del muslo.	DESCRIPCIÓN: La muestra analizada evidencia abundante celularidad caracterizada por Mastocitos bien diferenciados dispuestos individualmente o en densos acúmulos y compuestos de abundante granulación azul purpura metacromática que cubre la mayor parte de la célula; se denota anisocitosis y anisocariosis. Eritrocitos en cantidad moderada, medianamente conservados, algunos aglomerados; Presencia leucocitaria escasa de tipo mixto sin evidencia de degeneramiento ni atipia celular. No se observan microorganismos.	INTERPRETACIÓN: Compatible con Mastocitoma (bien diferenciado).
---	---	--

Referencias

Alleman, A., & Bain, P. (2000). Diagnosing neoplasia: the cytologic criteria for malignancy. *Vet. Med*, 95, 204- 222.

Atehortua, H., Orozco, P., Gómez, G. (2007). La influencia de las mascotas en la vida humana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20 (3), 377-386. Recuperado de <http://udg.redalyc.org/articulo.oa?id=295023025016>

Blackwood, L., Murphy, S., Buracco, P., De Vos, J. P., De Fornel-Thibaud, P., Hirschberger, J., ... & Argyle, D. J. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(3), e1-e29.

Bostock, D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal*, 142(1), 1-19.

Bravo, D., Cruz-Casallas, P., & Ochoa, J. (2010). Prevalence of neoplasm in canines in the University of the Llanos, during 2004 to 2007. *Revista MVZ Córdoba*, 15(1), 1925-1937.

Chang, F. R., Liaw, C. C., Lin, C. Y., Chou, C. J., Chiu, H. F., & Wu, Y. C. (2003). New adjacent bis-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Planta medica*, 69(03), 241-246.

Coppo, J. A., & Mussart de Coppo, N. B. (2005). Valoración del riesgo anestésico-quirúrgico en pequeños animales. *Rev Electrón Veter*, 6, 1-8.

Cowell, R. L., Tyler, R. D., Meinkoth, J. H., & DeNicola, D. B. (2009). *Diagnóstico citológico y hematológico: del perro y el gato*(No. 619: 636.045). Elsevier,.

Cruz, N. A., & Martínez de Larios, N. H. (2002). La biopsia por aspiración con aguja fina en glándula mamaria: diagnóstico citológico y concordancia histológica y clínica. *Rev Hospital General M Gea Gonzáles*, 5, 79-84.

Dores, C. B., Milovancev, M., & Russell, D. S. (2018). Comparison of histologic margin status in low-grade cutaneous and subcutaneous canine mast cell tumours examined by radial and tangential sections. *Veterinary and comparative oncology*, 16(1), 125-130.

Feltrin M. (2007). Estudio da aplicabilidade de criterios morfológicos e morfométricos para a graduação de mastocitomas cutâneos em caninos. Tesis de Magíster. Pelotas: Univ Fed de Pelotas. 59 p.

Fenalco. (2015). El Espectador. En seis de cada 10 hogares colombianos hay mascotas [fecha de consulta: 07 de febrero de 2017] URL: <http://www.elespectador.com/noticias/economia/seis-de-cada-10-hogares-colombianos-hay-mascotas-articulo-540449>.

Ferreira, G., & Pedraza, F. (2003). Caracterización y análisis de las neoplasias registradas en el laboratorio de patología animal de la Universidad de Antioquía durante 30 años 1968 -1998. *Patología Veterinaria*, 573

Ferreira, G., Pedraza, F., & Arango, M. (2008). Neoplasias de glándula mamaria canina diagnosticadas en Medellín, Colombia, entre 1968 y 1994. *Vet. Méx.*, 28(3), 257-259.

Finotto, S., Mekori, Y. A., & Metcalfe, D. D. (1997). Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. *The Journal of clinical*

investigation, 99(7), 1721-1728.

Fox, L. E., Rosenthal, R. C., Twedt, D. C., Dubielzig, R. R., MacEwen, E. G., & Grauer, G. F. (1990). Plasma histamine and gastrin concentrations in 17 dogs with mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine*, 4(5), 242-246.

Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., ... & Kanayama, Y. (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *The Journal of clinical investigation*, 92(4), 1736-1744.

Giraldo, G., Aranzazu, D., Rodríguez, B., Pérez, M., Ramírez, M. (2003). Caracterización de las Regiones Organizadoras Nucleolares coloreadas con Plata (AgNORs) en tumores cutáneos caninos. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 16(2), 132-138.

Goldschmidt, M. H., & Hendrick, M. J. (2002). Tumors of the skin and soft tissues. *Tumors in domestic animals*, 45-117.

Goldschmidt, M. H., & Shofer, F. S. (1992). *Skin tumors of the dog and cat*. Pergamon Press Ltd.

Gómez Contreras, O. L. (2015). Estudio de Mastocitoma Cutáneo Canino y uso de la prueba de inmunohistoquímica (IHQ) ki67 para establecer su valor pronóstico. Trabajo de grado. Univ La salle. 55 p.

Grimbaldeston, M. A., Chen, C. C., Piliponsky, A. M., Tsai, M., Tam, S. Y., & Galli, S. J. (2005). Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *Kit^{W-sh/W-sh}* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology*, 167(3), 835-848.

Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J., & Affolter, V. K. (2008). *Skin diseases of*

the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. John Wiley & Sons.

Heredia N., R. (2014). Clasificación histopatológica y gradación del mastocitoma canino: período 2000-2006 en el laboratorio de histología, embriología y patología veterinaria de la facultad de medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado a partir de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3932/1/Heredia_nr.pdf

Heredia, R., Perales, R., Chavera, A., & Tabacchi, L. (2015). Frecuencia y clasificación histopatológica del mastocitoma canino en la casuística (periodo 2000-2006) de un laboratorio de histopatología veterinaria, Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(4), 712-718.

Hopp, D. C., Zeng, L., Gu, Z. M., & McLaughlin, J. L. (1996). Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). *Journal of natural products*, 59(2), 97-99.

Ito-kawa, H., Morris-Natschke, S., Akiyama, T., Lee, K-H. (2008). Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Nat. Med*, 62(3), 263-280.

Kaldrymidou, H., Leontides, L., Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N., & Karayannopoulou, M. (2002). Prevalence, distribution and factors associated with the presence and the potential for malignancy of cutaneous neoplasms in 174 dogs admitted to a clinic in northern Greece. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49(2), 87-91.

Kim, G.; Zeng, L., Alali, F., Rogers, L., Wu, F., Sastrodihardjo, S., McLaughlin, J. (1998). Muricoreacin and murihexocin C, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry*, 49(2), 565-71.

Kiupel, M., Webster, J. D., Bailey, K. L., Best, S., DeLay, J., Detrisac, C. J., ... &

Hendrick, M. J. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Veterinary pathology*, 48(1), 147-155.

Kiupel, M., Webster, J. D., Kaneene, J. B., Miller, R., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2004). The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary pathology*, 41(4), 371-377.

Lanio, M. E., Luzardo, M. C., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-Leal, Y., Pazos, F., ... & Alvarez, C. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cub. Física*, 26(1), 23-30.

Latimer, K. S. (Ed.). (2011). *Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*. John Wiley & Sons.

Laza, D., Rodríguez, I., Sardiña, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Me*, 8(3), 12.

London, C. A., Galli, S. J., Yuuki, T., Hu, Z. Q., Helfand, S. C., & Geissler, E. N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Experimental hematology*, 27(4), 689-697.

Luna, L. (2006). Manual of histologic staining method of The Armed Forces Institute of Pathology. 3rd, NewYork: McGraw-Hill, 1968. 258p.

Macêdo, T. R. (2014). *Comparação da eficácia do mesilato de imatinibe com a vimblastina associada a prednisona no tratamento do mastocitoma canino: estudo clínico, histopatológico, imunohistoquímico e molecular* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Matz, B. M. (2015). Current concepts in oncologic surgery in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(3), 437-449.

Mayorga-Niño, F., & Torres-Vidales, G. (2014). Canabinoides y endocannabinoides como herramienta para el desarrollo de posibles antineoplásicos en caninos: Una revisión. *Orinoquia*, 18(1), 68-78.

Merlo, E. (2000). Mastocitoma cutáneo canino: Un reto para el veterinario. *Profesión Veterinaria*, 12(47).
http://www.colvet.es/Madrid/revista/may_jun_00/casoclinico.htm

Mochizuki, H., Motsinger-Reif, A., Bettini, C., Moroff, S., & Breen, M. (2017). Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. *Veterinary and comparative oncology*, 15(3), 829-839.

Mondragón, E. A., & Arango, M. I. M. (2010). Mastocitoma dérmico canino Grado I para educación médica histológica. *Morfología*, 2(1).

Navia, C., & Vásquez-López, J. (2011). El mastocito: una célula funcional. *Revista facultad deficiencias de la salud-Universidad de Cauca*.

Nieto, A. (2009). Diferencias en la determinación del grado de malignidad entre las citologías y -las biopsias en los mastocitomas caninos. *AVEPA*, 29(3), 159-163.

North, S., & Banks, T. (2009). Introduction to small animal oncology. *Saunders. California, USA*, 159-160.

Oliveira, F. N., Elliott, J. W., Lewis, B. C., Mathews, G. G., Brown, R. M., Treadway, C. M., & Langohr, I. M. (2013). Cutaneous mast cell tumor with epitheliotropism in 3 dogs. *Veterinary pathology*, 50(2), 234-237.

Ortega Barbosa, J. P. (2014) *Estudio comparativo de métodos de extracción, en la obtención de extractos promisorios con actividad larvívica contra el mosquito Culex quinquefasciatus, a partir de residuos frutícolas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Patnaik, A. K., Ehler, W. J., & MacEwen, E. G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary pathology*, 21(5), 469-474.

Perpiñán, D., & Durtnell, R. E. (2007). Mastocitoma en un perro de 9 semanas. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, 27(2), 0105-107.

Pinto, A. D. Q., Cordeiro, M. C. R., De Andrade, S. R. M., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. D., Alves, R. E., & Kinpara, D. I. (2005). *Annona species*. International Centre for Underutilised Crops; University of Southampton.

Quispe M. Rojas, C., Posso, M., Zavala, C., Vaisberg, A. (2006). Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, 23(4), 265-269.

Rech, R., Graça, D., Kommers, G., Sallis, E., Raffi, M., Garmatz, S. (2004). Mastocitoma cutáneo canino. Estudio de 45 casos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 56(4), 441-448.

Reyes, M. T., Morichelli, M., Manzur, M. E., Rodríguez Cabral, A. M., & Stella, I. (2013). Mastocitoma solitario: a propósito de un caso. *Revista argentina de dermatología*, 94(2), 0-0.

Ríos A. (2008) Mastocitoma canino y felino. *Clínica veterinaria de pequeños animales*, 28(2): 135 – 42.

Sandoval Arias, J. A. (2015) *Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).

Schlie, M., González, A., Luna, M. (2009). Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 8(4),245-257.

Sharma, S., Mishra, L. I. S. H. U., Grover, I., Gupta, A. N. U. J., & Kaur, K. I. R. T. I. P. A. L. (2010). Liposomes: vesicular system an overview. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(4), 11-17.

Stanclift, R. M., & Gilson, S. D. (2008). Evaluation of neoadjuvant prednisone administration and surgical excision in treatment of cutaneous mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(1), 53-62.

Thompson, J. J., Pearl, D. L., Yager, J. A., Best, S. J., Coomber, B. L., & Foster, R. A. (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Veterinary pathology*, 48(1), 156-168.

Tormo, J., Gonzalez, M., Cortes, D., Estornell, E. (1999). Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins. *Arch. Biochem. Biophys*, 369(1), 119-26.

Torres Vidales, G., & Eslava Mocha, P. R. (2006). Mastocitoma canino. *Orinoquia*, 10(2).

Tringali, C. (2000). *Bioactive compounds from natural sources: isolation, Characterization and biological properties*. CRC Press.

Varela Vargas, V. (2018). Mastocitoma canino estudio de un caso clínico (tesis de grado presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor). Universidad de la república.

Viegi, L., & Ghedira, K. (2014). Preliminary Study of Plants Used in Ethnoveterinary Medicine in Tunisia and in Italy. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11(3), 189–199.

Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Miller, R. A., Kaneene, J. B., & Kiupel, M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary pathology*, 44(3), 298-308.

Withrow, S. J., Page, R., & Vail, D. M. (2013). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Zamorano, C., & Sepúlveda, J. (2002). Punción con aguja fina. *Universidad de Chile*.

Zemke, D., Yamini, B., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2002). Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. *Veterinary pathology*, 39(5), 529-535.