

**ESTUDIO RETROSPECTIVO DE LOS CAMBIOS VACUOLARES Y LAS
ALTERACIONES DE LOS PIGMENTOS PRESENTADOS EN ORGANOS
PARENQUIMATOSOS DE CANINOS REMITIDOS AL LABORATORIO DE
HISTOPATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS, ENTRE LOS AÑOS
2003 A 2010, POR MEDIO DE COLORACIONES ESPECIALES.**

TAMARA TRIGOS BELISARIO

Cód. 121002137

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

DIRECTOR:

GUSTAVO GONZALEZ PAYA

MV. esp.

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

2017

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco primeramente a Dios por darme la vida, a mis padres ORLANDO TRIGOS Y LUZ ANGELA BELISARIO por darme el privilegio de ser su hija y por estar siempre apoyándome en todos los aspectos de la vida incondicionalmente, a mis hermanos JUAN PABLO y ANDERSON por estar en este proceso como apoyo moral, a mis sobrinos JUAN SEBASTIAN Y MARIA DEL LLANO que los amo y gracias por ser cada día el motivo para salir adelante, a mi mejor amiga y colega CIELITO GUEVARA por estar en todo este proceso de formación como profesional y como ser humano, a mi director de tesis y gran amigo GUSTAVO GONZÁLEZ por ayudarme en todo mi proceso académico y profesional, a mis profesores en general y amigos que hice durante la carrera.

CONTENIDO

	Pag.
1. Lista de figuras	6
2. Lista de tablas	7
3. Resumen	8
4. Abstract	9
5. Introducción	10
6. Objetivos	11
6.1. Objetivo General	11
6.2. Objetivos Específicos	12
7. Justificación y planteamiento de problema	12
8. Revisión de literatura	14
8.1. Cambio Vacuolar	14
8.1.1. Glucogenosis	14
8.1.1.1. Tipos de glucogenosis	15
8.1.1.1.1. Glucogenosis tipo I	15
8.1.1.1.2. Glucogenosis tipo II	15
8.1.1.1.3. Glucogenosis tipo VII	16

8.1.2. Síndrome de Cushing	16
8.1.3. Diabetes Mellitus	16
8.1.3.1. Tipos de diabetes	17
8.1.3.1.1. Diabetes Mellitus tipo I	17
8.1.3.1.2. Diabetes Mellitus tipo II	17
8.1.3.1.3. Diabetes Mellitus atribuible a otros procesos	18
8.2. Acumulación Hemosiderina	19
8.2.1. Hemosiderosis	20
8.2.2. Hematocromatosis	21
9. Materiales y métodos	22
9.1. Área de Estudio	22
9.2. Descripción metodológica	23
9.3. Procesamiento muestras	23
9.3.1. Técnica coloración	23
9.3.1.1. Glucógeno	23
9.3.1.2. Hemosiderina	25
10. Resultados	26
10.1. Resultados PAS	26
10.2. Resultados Azul de Prusia	29

11. Discusión	31
11.1. Discusión glucógeno	31
11.2. Discusión Hemosiderina	32
12. Conclusiones	34
13. Bibliografía	36
14. Anexos	50

1. LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Mapa del campus de la Universidad de los Llanos sede Barcelona.	22
Figura 2. Resultados de los casos remitidos entre el año 2003 y 2010 en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos sometidos a coloración de PAS.	27
Figura 3. Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según la raza.	27
Figura 4. Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según el sexo.	28
Figura 5. Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según la edad.	28
Figura 6. Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según la raza.	29
Figura 7. Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según el sexo.	30
Figura 8. Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según la edad.	30

2. LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Tipos de diabetes para el perro y el gato	19
Tabla 2. Razas predispuestas a presentar diabetes	19

3. RESUMEN

Se revisó la casuística reportada con cambios vacuolares y alteraciones de pigmentos en tejidos parenquimatosos de caninos remitidos al laboratorio de histopatología de la Universidad de los Llanos, entre los años 2003 a 2010, y se realizó su respectiva confirmación mediante coloraciones especiales. En este estudio para los casos de caninos con acumulación de glucógeno se utilizó la tinción Acido Peryodico Schiff (PAS) en 7 casos, el 71% (5) resultaron positivos a PAS, de estos el 80%, (4 casos) eran de raza French Poodle, los machos fueron los más afectados con el 60% (3 casos) y una hembra 20%, las edades oscilaron entre los 3 meses y 5 años. En los casos de acumulación de pigmentos, se utilizó la coloración Azul de Prusia para determinar hemosiderina, solo 3 casos resultaron positivos, que correspondieron a las razas Bóxer, French Poodle y Pitbull, dos casos ocurrieron en hembras y uno en machos. Se realizó un archivo fotográfico de todos los casos. Finalmente, con el uso de estas coloraciones se logró en algunos casos demostrar la acumulación de glucógeno y hemosiderina.

Palabras claves: Cambios vacuolares, alteraciones de los pigmentos, coloraciones especiales, PAS, glucógeno, Azul de Prusia, hemosiderina.

4. ABSTRACT

We reviewed the casuistry reported with vacuolar changes and pigment alterations in parenchymatous tissues of canines sent to the histopathology laboratory of the Universidad de los Llanos between 2003 and 2010, and their respective confirmation was made through special colorations. In this study for canine cases with glycogen accumulation, Pericodic Acid Schiff (PAS) staining was used in 7 cases, 71% (5) were positive for PAS, 80% of these cases, (4 cases) were French Poodle, males were the most affected with 60% (3 cases) and a female 20%, ages ranged from 3 months to 5 years. In the cases of pigment accumulation, the Prussian Blue coloration was used to determine hemosiderin, only 3 cases were positive, corresponding to the Bóxer, French Poodle and Pitbull breeds, two cases occurred in females and one in males. A photographic archive of all the cases was made. Finally, with the use of these colorations it was possible in some cases to demonstrate the accumulation of glycogen and hemosiderin.

Keys words: Vacuolar changes, pigment alterations, special Colorations, PAS, glycogen, Prussian Blue, hemosiderin.

5. INTRODUCCIÓN

Los órganos parenquimatosos son generalmente de tipo macizo, están formados por los elementos de sostén o estroma y por los componentes celulares con características morfológicas y funcionales específicas que se denomina parénquima, el hígado es un ejemplo de este tipo de órgano, el cual participa en diferentes procesos metabólicos, por esta razón está expuesto a la acción de diversos agentes infecciosos, metabólicos y tóxicos, por consiguiente puede estar implicado en una serie de cambios patológicos, fisiopatológicos e histopatológicos tanto primarios como secundarios (Gallardo, 2003; Tejadas, 2010; Montalvo, 2011).

La hepatopatía vacuolar asociada al glucógeno (VH) es un síndrome común en perros frecuentemente asociado con la sobreproducción endógena de hormonas esteroidogénicas o al tratamiento con mediadores de glucocorticoides, pero también puede estar acompañando a trastornos inflamatorios, neoplásicos e infecciosos (Sepesy y col, 2006; Greenhalgh *et al*, 2014; Twedt and Collins, 2016).

En el caso de acumulación de pigmentos es importante lo que ocurre con el exceso de hierro que se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el bazo y el hígado (Forrellat y col, 2000; Pérez y col, 2005), esta acumulación puede presentarse de manera localizada (hematomas, insuficiencia cardiaca izquierda) o bien en acúmulos sistémicos (hemosiderosis por anemia hemolítica o hemocromatosis idiopática, etc.) (Martí y col, 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivo precisar en los casos remitidos al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad de los Llanos a qué corresponden los cambios vacuolares presentados en hígado y riñón por medio de la coloración de Ácido Peryodico de Schiff (PAS) y así determinar o no la presencia de glucógeno, asimismo confirmar o descartar la acumulación de hemosiderina en diferentes órganos mediante la coloración de Azul de Prusia.

Los casos y datos se obtuvieron del trabajo previo titulado “Estudio retrospectivo de patologías que afectaron a los caninos entre los años 2003 a 2010 de la Universidad de los Llanos” (datos no publicados), en este trabajo se reportó que el 6.27% de los casos mostraron presencia de pigmentos y el 5.44% tenía alteraciones con cambios vacuolares intracelulares, de estos casos se tomaron los bloques parafinados y se realizaron las respectivas tinciones diferenciales de PAS y azul de Prusia, luego, se observaron en microscopio óptico, para determinar si eran positivos o negativos.

6. OBJETIVOS

6.1. General.

Revisar la casuística en la que se reportaron cambios vacuolares y alteraciones de pigmentos en tejidos parenquimatosos de caninos remitidos al laboratorio de histopatología de la Universidad de los Llanos, entre los años 2003 a 2010, y realizar su respectiva confirmación mediante coloraciones especiales.

6.2. Específicos:

- Determinar la presencia de glucógeno mediante coloración especial Ácido Peryodico de Schiff (PAS) en las láminas de hígado y riñon que presentan cambios vacuolares.
- Identificar la presencia de hemosiderina mediante la coloración de Azul de Prusia para determinar hierro en los micropreparados.
- Realizar un archivo fotográfico de los resultados positivos y negativos de las coloraciones especiales.

7. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos se han realizado algunos estudios retrospectivos para valorar diferentes patologías en animales domésticos, el primero evaluó la presencia de amiloidosis detectada por histopatología en casos de necropsia (Hernández, 2008) y el segundo analizó la prevalencia de neoplasias en caninos (Bravo, 2010). El trabajo más reciente se enfocó en las diferentes patologías que afectaron a los caninos entre los años 2003 a 2010 (datos no publicados) 239 casos, en este trabajo se reportó que el 6.27% de los casos mostraron presencia de pigmentos y el 5.44% tenía alteraciones metabólicas de acumulación intracelular con cambios vacuolares; estos casos fueron abordados desde el punto de vista morfológico por medio de la técnica de rutina con Hematoxilina y Eosina, sin embargo, esta técnica no permite apreciar fibras elásticas o mastocitos, elementos que pueden acumularse en el citoplasma celular, ni diferenciar pigmentos, como ocurre con

el melánico y la hemosiderina, por esta razón es necesario recurrir a tinciones secundarias o especiales, entre estas el Ácido Peryódico de Schiff (PAS), esta coloración es la más comúnmente utilizada pues permite determinar algunos polisacáridos (particularmente, glucógeno) (Gregory, 2007; Cote, 2011; Hajar, 2013; Silvestri *et al*, 2017). Mientras que la coloración de azul de Prusia es utilizada para detectar la presencia de hemosiderina (Gaunt and Baker, 1986; Sprague *et al*, 2003; Weiss, 2005; Harvey, 2012; Zachary and McGavin, 2012; Raskin and Meyer, 2016). Este tipo de coloraciones especiales no son utilizadas rutinariamente en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos, por esta razón surge la necesidad de complementar el diagnóstico morfológico realizado con la técnica de H&E con coloraciones diferenciales que permitan precisar el diagnóstico de lesiones vacuolares y acumulación de pigmentos, ya que con estos hallazgos se podrá orientar y posiblemente especificar el proceso patológico presente, teniendo en cuenta que existen diferentes orígenes para los mismos como ocurre en la glucogenosis en las que pueden intervenir defectos en enzimas requeridas para la síntesis o degradación del glucógeno que puede originarse por hiperadrenocorticismos, tumores de la glándula adrenal o de la pituitaria, o en casos de tratamiento con glucocorticoides y por glucogenosis propiamente dicha; en el caso de la acumulación de hemosiderina se ha relacionado a congestión, diátesis de eritrocitos, fenómenos hemolíticos, anemia hemolítica autoinmune o enfermedades parasitarias (Jubb *et al*, 2007).

8. REVISIÓN DE LITERATURA

8.1. CAMBIOS VACUOLARES

Diversas sustancias pueden acumularse en el citoplasma de los hepatocitos lo que conduce a la formación de vacuolas, diferentes causas deben ser tenidas en cuenta como inductores, en animales mayores las vacuolas corresponden casi siempre a acumulación de lípidos o glucógeno, mientras, el cambio hidrópico corresponde a una lesión temprana asociada a procesos tóxicos, hipoxia o disturbios metabólicos (Cullen, 1980; Jubb *et al*, 2007).

La degeneración glucogénica, glucogenosis o hepatopatía por glucocorticoides corresponde a las lesiones vacuolares más severas por la acumulación de glucógeno que pueden ser causadas por hiperadrenocorticismo, tumores de la glándula adrenal, tumores de la pituitaria o en casos de tratamiento con glucocorticoides (Fittschen, 1984; Cullen, 2007; Ackerman, 2011; Novilla *et al*, 2014; Cullen, 2016), su identificación es importante porque de esta depende la orientación de la patogénesis, la tinción con PAS puede ayudar a confirmar la acumulación de glucógeno luego de usar la técnica de H&E (Cullen, 2007; Jubb *et al*, 2007; Gregory, 2007; Hajar, 2013; Silvestri *et al*, 2017).

8.1.1. Glucogenosis:

Las glucogenosis son un grupo de enfermedades hereditarias con una característica bioquímica común, una alteración del depósito de glucógeno en los tejidos afectados en los que puede estar aumentado o tener una estructura anómala. Se producen cuando

existe deficiencia genética de la actividad de alguna de las enzimas que lo degradan o lo sintetizan. Siendo los tejidos afectados aquellos en los que el metabolismo del glucógeno es mas importante como el hígado y el musculo (Moreno *et al*, 2000; Gregory *et al*, 2007).

8.1.1.1. Tipos de glucogenosis.

8.1.1.1.1. Glucogenosis tipo I o Enfermedad de Von Gierke: son un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias producidas por un defecto genético de algunos de los componentes del sistema enzimático de la glucosa-6-fosfatasa que es la encargada de defosforilar la glucosa-6P (G6P) en el hígado para su liberación al torrente sanguíneo y distribuirla por todas las células, la deficiencia de esta enzima provoca la acumulación de G6P intracelular lo que conlleva a que se deposite glucógeno en el hígado y riñón (Kishnani *et al*, 2001; Cornejo, 2006; Labrune, 2010; Specht *et al* 2011; Froissart *et al*, 2011; Lee *et al*, 2015). Las lesiones histopatológicas correponden a la presencia de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos (Jubb *et al*, 2007; Specht *et al*, 2011).

8.1.1.1.2. Glucogenosis tipo II o enfermedad de Pompe, es una falla congénita del metabolismo del glucógeno que afecta al gen encargado de dar la orden de síntesis de la enzima alfa-(1,4)-glucosidasa en los lisosomas (Gregory *et al*, 2007). Esta deficiencia puede tener consecuencias en diferentes tejidos, aunque el efecto más notable se produce en las células musculares, pues en estas se acumula gran cantidad de glucógeno residual que es absorbido por los lisosomas para su transformación en

glucosa, el depósito creciente de glucógeno en los lisosomas interfiriendo con la función llegando a causar daños en la misma (Hirschhorn and Reuser, 2001; Carnero, 2015).

8.1.1.1.3. Glucogenosis tipo VII o enfermedad de Tarui, es una enfermedad metabólica debida a una deficiencia en la enzima fosfofructocinasa, esta se encarga de convertir la fructosa 6-P a fructosa-1,6-bisfosfato en el paso 3 de la glucólisis, en esta enfermedad ciertas células como los eritrocitos y el músculo esquelético, pierden la habilidad de usar glucosa como fuente de energía (Skibild *et al* 2001; Gregory *et al* 2007)

8.1.2. Síndrome de Cushing

Es un conjunto de signos clínicos que puede presentarse de dos formas, una iatrogénica a partir de la exposición crónica o excesiva a glucocorticoides (Cook, 2008) y una espontánea por una inapropiada secreción de ACTH por parte de la hipófisis la que corresponde al 80%-83% de los casos (Hernández and Alzate 2006; Melián, 2014; Nelson and Couto, 2014), mientras entre el 17%-20% restante corresponde a los causados por una secreción excesiva de cortisol por parte de la corteza adrenal (Schaer, 2010; Lacroix *et al*, 2015; Soler y Castillo, 2016).

8.1.3. Diabetes Mellitus

La vacuolización es el reflejo de la acumulación de glucógeno y es una lesión específica de diabetes mellitus, pero ocurre solamente en casos que se desarrollan rápidamente y

que son severos, en el perro el glucógeno puede acumularse incluso en el núcleo del hepatocito (Levinthal and Tavill, 1999; Jubb, *et al*, 2007)

8.1.3.1. Tipo de diabetes mellitus

8.1.3.1.1. Diabetes mellitus (DM) tipo I (Insulino dependiente): 1 de cada 500 caninos padecen este tipo de diabetes y entre el 50 - 70% de los caninos con diabetes padecen DM tipo I (Hoenig 2003; Rand *et al*, 2004). Se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas, que en muchos casos es de etiología desconocida, aunque ciertas pruebas sugieren que la enfermedad es causada por la predisposición genética, lesiones tóxicas, inflamatorias, infecciosas o una respuesta inmunomediada, similar a lo que ocurre en la diabetes tipo 1 humana, que inician la destrucción de los islotes pancreáticos (Fleeman y rand, 2004; Lloret, 2009; Ackerman, 2011).

8.1.3.1.2. DM tipo II (no insulino dependiente): Afecta frecuentemente animales de media edad y geriátricos, machos y obesos, principalmente afecta a los gatos, aproximadamente 80 a 90 % de los gatos diabéticos tienen diabetes no dependiente de la insulina, no hay datos publicados que demuestren que la diabetes tipo 2 ocurra en perros o que la obesidad es un factor de riesgo para la diabetes canina (Rand *et al*, 2004; Barão *et al*, 2011; Pérez y Arenas, 2014). La sensibilidad de las células Beta a los cambios en la glucosa y la primera fase de la respuesta de secreción de insulina por la célula beta no se pierden en perros a pesar de años de resistencia a la insulina inducida por obesidad e hiperinsulinemia compensatoria (Verkest *et al*. 2011). La diabetes

resistente a la insulina puede producirse en presencia de alteraciones hormonales como el hiperadrenocorticismo y acromegalia inducida por progesterona (Fall, 2009) o por la administración de fármacos antagonistas de la insulina como los glucocorticoides (Tejada y Font, 2016).

8.1.3.1.3. Diabetes Mellitus atribuible a otros tipos de procesos, se puede desarrollar debido a la presencia de hormonas que producen resistencia a la insulina (glucocorticoides, progestágenos), o puede ser secundaria a enfermedades como pancreatitis o insuficiencia pancreática exocrina (Ackerman, 2011; Pérez y Arenas 2014). En aproximadamente, el 28% de los perros diabéticos, la diabetes se desarrolla por un daño pancreático importante, debido probablemente a una pancreatitis crónica, (Fleeman y Rand, 2004) y por último la **Diabetes Gestacional** en donde la progesterona que estimula la secreción de la hormona del crecimiento y de la glándula mamaria canina causa resistencia a la insulina, a través de un defecto post-unión debido a que disminuye el número de receptores de insulina o la velocidad de unión a los receptores, la resistencia a la insulina conduce a la hiperglucemia crónica que daña las células productoras de insulina, repercutiendo en una deficiencia de insulina (Fall, 2009; Mared, 2010; Pérez y Arenas 2014; Nelson and Reush, 2014). Los caninos pueden tener una masa adecuada de células b funcionales para mantener la tolerancia a los carbohidratos cuando no existe resistencia a la insulina (ejemplo, durante períodos de inactividad ovárica cuando las concentraciones de progesterona permanecen bajas (0,5 ng / ml)), pero no pueden segregar una cantidad adecuada de insulina para mantener la euglicemia en presencia de resistencia a la insulina (Fall *et al.*, 2008).

Tabla 1. Tipos de diabetes atribuibles al perro y al gato (Pérez y Arenas, 2014).

Diabetes	Perros	Gatos
Tipo 1	Frecuente	Rara
Tipo 2	No descrita	Muy frecuente
Otros tipos		
Corticoides	Poco frecuente (el 5-10% de los perros que desarrollan síndrome de Cushing presentan esta forma de diabetes)	Poco frecuente (el 90% de los gatos que desarrollan hiperadrenocorticismismo hipofisario o adrenal presentan esta forma de diabetes)
Progesterona	Frecuente	Rara
Pancreatitis	Frecuente	Frecuente
Hormona del crecimiento	Rara	Frecuente

Tabla 2. Razas predispuestas a presentar diabetes (Hoenig, 2003; Fall, 2009; Nelson and Reush 2014).

Australian terrier
Standard schnauzer
Samoyed
Miniature schnauzer
Fox terrier
Keeshond
Bichon frise
Finnish spitz
Cairn terrier
Miniature poodle
Siberian husky
Toy poodle
Mixed breed

8.2. ACUMULACIÓN DE HEMOSIDERINA

El hierro es un componente de la hemoglobina, la mioglobina y del citocromo, se almacena en el hígado como ferritina o hemosiderina (Schultheiss *et al*, 2002, Bohn,

2015) su acumulación ocurre primero en el sistema fagocitario reticuloendotelial, si el aporte es mayor se puede acumular en células parenquimatosas del hígado, páncreas y miocardio (Rand, 2000, Bohn, 2015); la acumulación difusa de hemosiderina sugiere la presencia de procesos hemolíticos por anemia hemolítica autoinmune o enfermedades parasitarias, mientras si su acumulación es localizada es compatible con procesos de tipo hemorrágico y también puede estar asociado directamente a procesos inflamatorios (Fuentealba *et al*, 1997; Schultheiss, 2002; Jubb *et al*, 2007; Valli, 2007).

La absorción excesiva de hierro ingerido puede ocurrir en dos situaciones, en primer lugar, cuando la ingesta de hierro es tan grande que sobrepasa el sistema de regulación de la absorción (hemosiderosis) y segundo, cuando existe una anomalía en el mecanismo de control de la absorción intestinal del hierro y se absorbe más de lo que el organismo requiere (hematocromatosis) (Piperno, 1998; Powel *et al*, 1998; Amatriain, 2000; Kaneko *et al*, 2008).

8.2.1. Hemosiderosis

Esta se define como el aumento de los depósitos de hierro en las células del hígado y bazo sin daño tisular asociado (Fuentealba *et al*, 1997; Schultheiss *et al*, 2002; Sprague, 2003; McCown, 2011), se da por eritrofagocitosis excesiva y posterior degradación de la hemoglobina. Puede observarse en trastornos benignos (mielipoma adrenal) (Tursi *et al* 2005, Christopher, 2003) y malignos (mielofibrosis en asociación con necrosis de médula ósea, neoplasia hemopoyética y anemia hemolítica congénita grave (Hoff *et al* 1991, Christopher, 2003). Así, como ocurre en la enfermedad crónica con secuestro de hierro. También puede ser el resultado de hemorragia asociada con

hematomas, hemangiomas y hemangiosarcomas, en el bazo el aumento de hierro se encuentra comúnmente acompañado de hiperplasia esplénica difusa o nodular y hematopoyesis extramedular (Christopher, 2003).

Una causa citada comúnmente es la hemólisis causada por la presencia de parásitos como la Babesia (*B. canis* y *gibsoni*) donde la hemoglobinuria, la eritrofagocitosis difusa y hemosiderosis sugieren hemólisis intravascular y extravascular, siendo la anemia hemolítica la manifestación primaria de la infección por este agente (Boozer and Macintire, 2003).

8.2.2. Hematocromatosis

La hemocromatosis es una enfermedad causada por la deposición excesiva de hemosiderina y ferritina en los hepatocitos, que puede ocurrir secundaria a un daño tisular y en la disfunción de la deposición de hemosiderina en las células parenquimatosas (Sprague, 2003; Harvey, 2006; Kaneko 2008; Bohn, 2015).

Existen dos tipos de hematocromatosis, la primaria (genética) que es de tipo hereditario y la secundaria que se presenta luego de múltiples transfusiones o la deficiencia de piruvato quinasa (PK) en perros (Giger, 1991; Holla, 1997; Schultheiss *et al*, 2002; Christopher, 2003); la deficiencia de esta enzima probablemente es causada por el aumento de la absorción intestinal de hierro asociada con la anemia hemolítica activa (Zaucha *et al*, 2001; Kaneko *et al*, 2008; Gultekin *et al*, 2012).

La piruvato quinasa es una de las enzimas regulatorias esenciales de la glicólisis anaeróbica, la deficiencia de esta causa una destrucción prematura de los eritrocitos, en los perros, la deficiencia de PK causa una anemia hemolítica crónica grave y

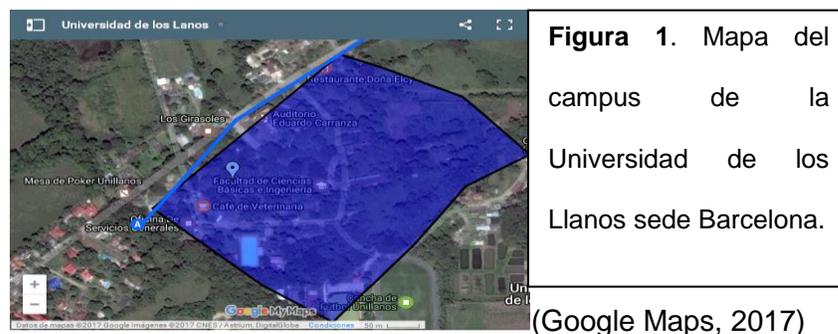
altamente regenerativa con osteosclerosis progresiva, mientras que en los gatos se caracteriza por una anemia hemolítica intermitente sin osteosclerosis (Hlava *et al*, 2012).

Las células parenquimatosas más frecuentemente afectadas en todos los tipos de trastornos por sobrecarga de hierro son las del hígado y el páncreas, posterior a la saturación de la transferrina (Sprague *et al*, 2003), los órganos principalmente afectados son hígado, bazo, nódulos linfáticos, riñón, cerebro y órganos glandulares (Kaneko *et al*, 2008).

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos, vereda Barcelona (figura 1), localizada a 12 Km de la ciudad de Villavicencio, Colombia, que se encuentra a una altitud de 418 m.s.n.m. y presenta una pluviosidad de 4050 mm anuales, con una humedad relativa del 75% y una temperatura promedio de 25°C.



El Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos recibe casuística de diferentes especies animales no solo del municipio sino de todo el departamento.

9.2. Descripción metodológica.

La base de datos fue la información obtenida en el estudio previamente citado y se recurrió a los archivos de bloques parafinados del Laboratorio de Histopatología Veterinaria. Inicialmente se realizó una descripción de los hallazgos, luego se determinaron positivos y negativos para cada coloración especial. Se hizo estadística descriptiva no paramétrica, los datos se reportaron por medio de tablas y gráficas, también, se hizo un registro fotográfico de cada tejido evaluado (en aumentos de 100x y 400x), fueron descartados los bloques de casos que presentaron diferentes fenómenos de deterioro, ya que en estos fue imposible obtener un corte adecuado para realizar las coloraciones.

9.3. Procesamiento de las muestras.

En todos los casos el procesamiento fue a partir de bloques parafinados. El protocolo que se utilizó es el mismo descrito por Carvajal en 1970.

9.3.1. Técnica de coloración:

9.3.1.1. GLUCÓGENO

- **Ácido Peryodico – Schiff (P.A.S)**

1. XILOL, alcohol de 100%, de 95% agua destilada
--

2. Se lavó en agua destilada
3. Ácido peryodico al 0.5% por 5 minutos. (oxidante)
4. Lavado en agua destilada
5. Se pusieron los cortes en solución de Coleman o de schiff por 15 o 30 minutos.
6. Se Lavaron en agua corriente durante 10 minutos, intensificando la coloración, hasta que los cortes tomaron un color rosa intenso.
7. Contraste con hematoxilina de Harris por 4-6 minutos o con verde brillante por pocos segundos.
8. lavado luego en agua destilada y diferenciar en alcohol acido de 2-3 pases rápidos. Lavado en agua corriente y neutralizar en agua amoniacal. Se lavó 5 minutos en agua corriente.
9. Alcohol del 85% alcohol del 100%, Xilol. Monte el permout.
10. Luego en agua corriente durante 10 minutos y finalmente lavar con agua destilada.
11. Se continuó con la solución de Schiff

El resultado para glucógeno dió una reacción positiva rojo o purpura rojizo (Anexo: Imagen 5 y 6).

9.3.1.2. HEMOSIDERINA

- ***Azul de Prusia***

Proceso de coloración:

1. Xilol, alcohol absoluto, alcohol de 95% y agua destilada
2. Se sumergen las láminas en una solución por partes iguales de ácido clorhídrico al 20% y ferrocianuro de potasio al 10% y se acelera la reacción en una estufa 20 minutos a 60°C
3. Dejando enfriar y lavando rápidamente en agua destilada
4. Se contrasta con nuclear fast red o eosina alcohólica
5. Lavado en agua destilada
6. Se deshidrató con 2 cambios de alcohol de 95%, alcohol absoluto y aclarado en xilol
7. Se montó en permout

El resultado positivo para hemosiderina fué un azul brillante (Anexo: Imagen 10).

10. RESULTADOS

10.1. ACIDO PERYODICO DE SCHIFF

De los trece casos reportados con cambios vacuolares en el Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad los Llanos entre los años 2003 y 2010 se descartaron 6 (seis), por las condiciones del bloque de parafina que no permitieron un corte óptimo para realizar la coloración de PAS. Así, que se tomaron en cuenta un total de 7 casos para el estudio.

Los resultados de acuerdo a la tinción diferencial para cambios vacuolares (glucógeno) PAS (Anexo: Imagen 3 y 4) quedaron de la siguiente manera, de los 7, 5 (71%) casos resultaron positivos y 2 casos (29%) fueron negativos (figura 2).

En los casos positivos la raza más afectada fue la French Poodle con 4 casos (80%) y en el caso restante no se reportó la raza (figura 3). En cuanto al sexo de los individuos afectados fueron más afectados los machos con 3 casos (60%), un caso correspondió a una hembra 20% y en el restante no se reportó el sexo en la historia clínica (Figura 4). Con respecto a la edad 3 de los casos positivos (60%) no se reportó la edad, los dos casos restantes fueron de un canino de 5 años y de 3 meses (Figura 5). Con relación a la severidad de la acumulación del glucógeno 2 casos (40%) fue considerado leve, 2 casos (40%) moderados y 1 severo.

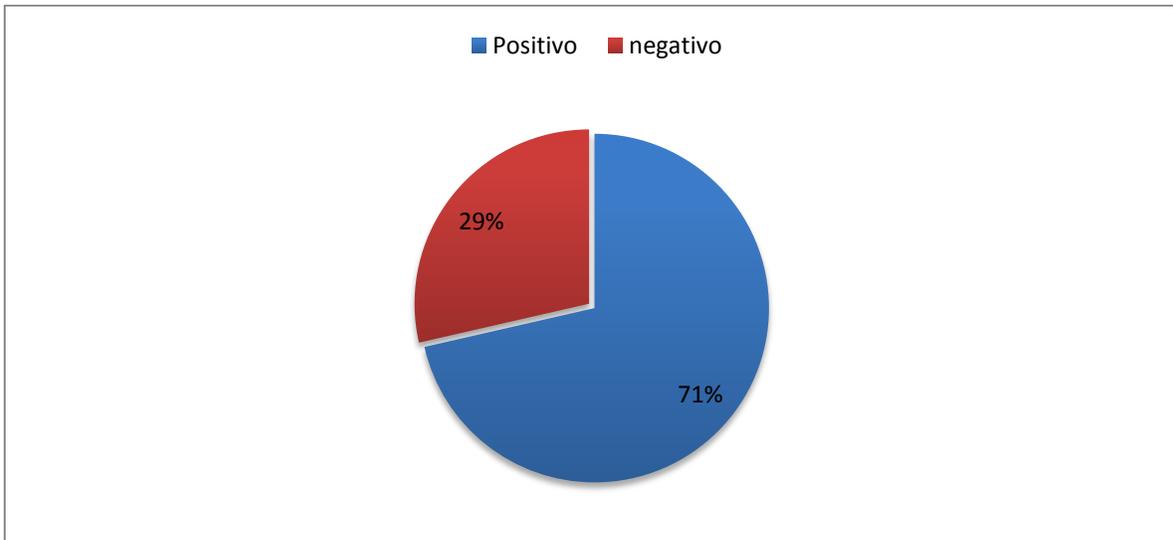


Figura 2. Resultados de los casos remitidos entre el año 2003 y 2010 en el Laboratorio de Histopatología de la Universidad de los Llanos sometidos a coloración de PAS.

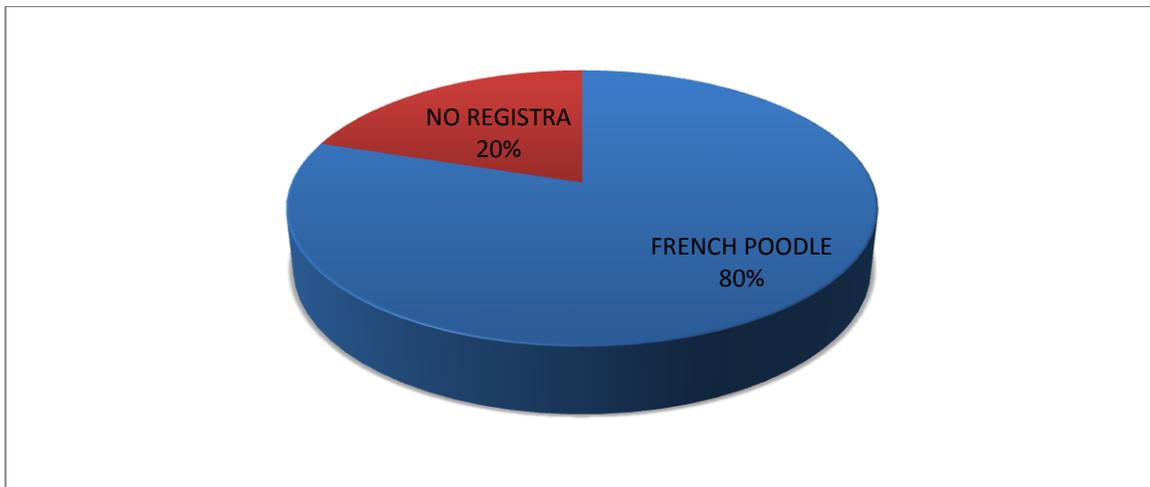


Figura 3: Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según la raza.

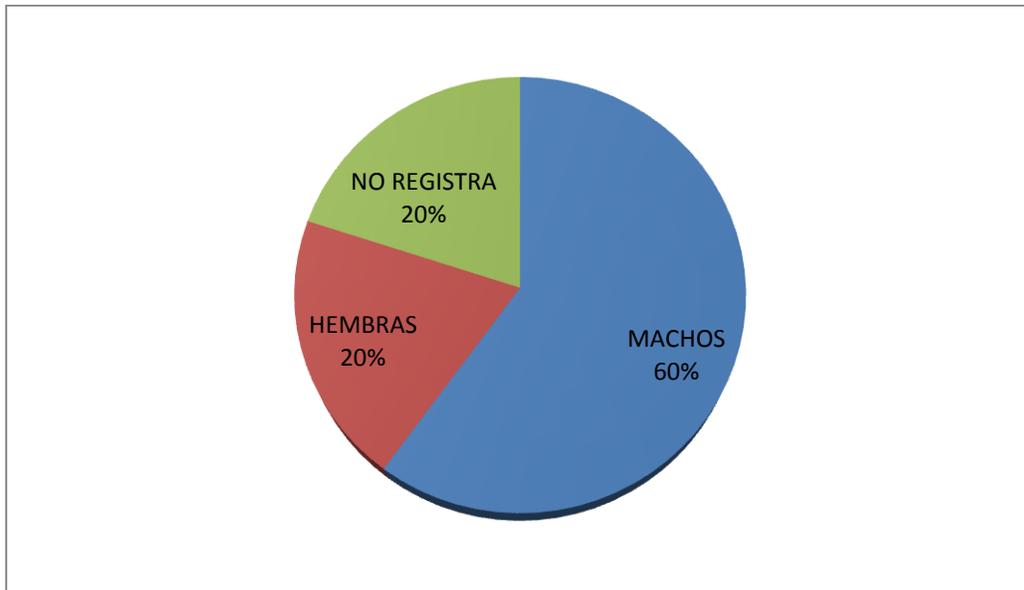


Figura 4: Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según el sexo.

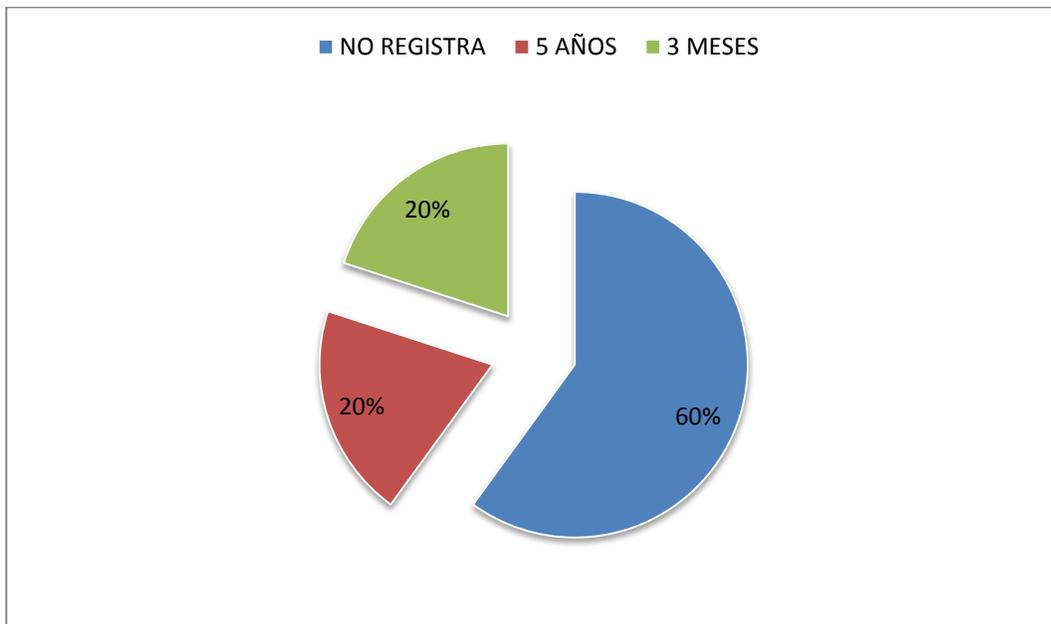


Figura 5. Distribución de los casos positivos a coloración de PAS según la edad.

10.2. AZUL DE PRUSIA

15 casos fueron reportados con alteración de los pigmentos en el Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad los Llanos entre los años 2003 y 2010, 8 casos eran sospechosos para acumulación de Hemosiderina, después de realizar los cortes se descartaron 5 casos por las condiciones de los bloques que no permitieron un corte óptimo para realizar la coloración de Azul de Prusia. Así, solo fueron incluidos 3 casos para el estudio

Después de realizar la coloración de Azul de Prusia (Anexo: Imagen 5) los tres casos fueron positivos, la distribución de las razas fue homogénea un caso para cada una, Bóxer, French Poodle y Pitbull (figura 6); dos casos correspondieron a hembras y una a machos (figura 7); con respecto a la edad dos casos fueron en caninos geriátricos uno de 10 años y el otro de 12 años, en un caso no se reportó este dato (figura 8); la acumulación fue considerada moderada en los 3 casos.

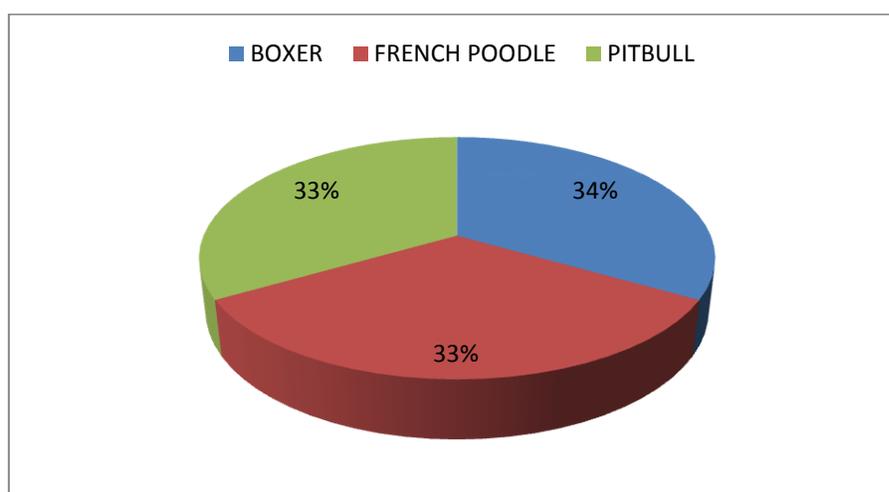


Figura 6: Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según la raza.

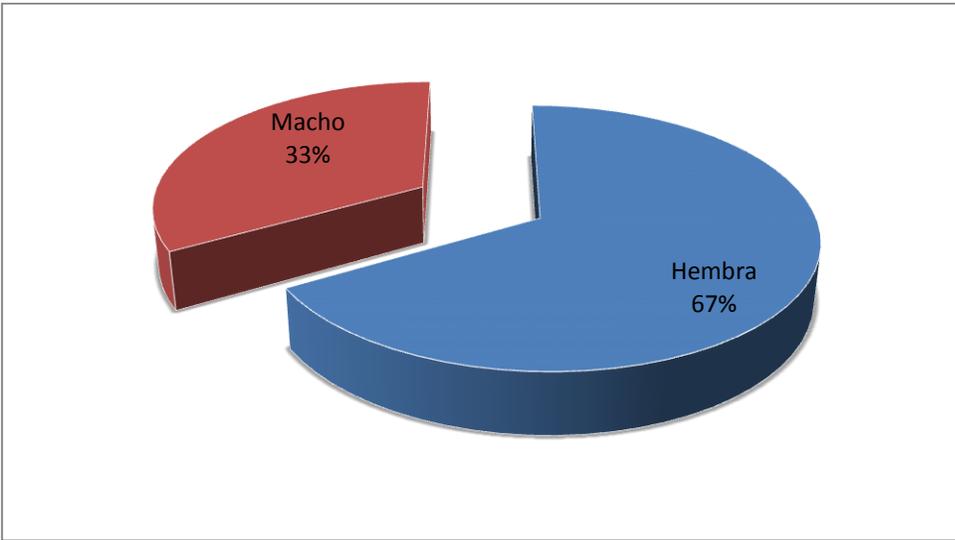


Figura 7. Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según el sexo.



Figura 8: Distribución de los casos positivos a coloración de azul de Prusia según la edad.

11. DISCUSIÓN

11.1. Glucógeno

De los 7 casos procesados para la coloración de PAS, el 71 % (5) resultaron positivos y los restantes no presentaron marcación, siendo la raza más afectada la French Poodle, algunos autores como Ackerman, (2011) cita como causas de acumulo de glucógeno a la diabetes mellitus tipo 1 y que esta se puede encontrar principalmente en las razas Poodle toy y Poodle. Al estudiar el hiperadrenocorticismismo (Síndrome de Cushing), la raza Poodle también ha sido citada (Melian, 2008); de igual manera Gregory (2007) en su estudio reporta que la acumulación de glucógeno es más común en perros de razas puras.

Desafortunadamente, de los cinco casos positivos para coloración de PAS en 3 casos (60%) no se contó con el dato preciso de la edad, uno correspondió a un animal joven y el otro a un geriátrico. Algunos autores han reportado que los cambios vacuolares son comunes en edades entre los 3 y los 4 años (Akol, 2012). Otros estudios citan la presencia de cambios vacuolares en animales de edad avanzada o que progresan con la edad (Sepesy, 2006; Ackerman, 2011; Cortright *et al*, 2014). Cullen, (2016) reporto cambios vacuolares positivos a PAS en un canino de 9 años tratado con fenobarbital - prednisolona. Sin embargo, al tener en cuenta los cambios vacuolares ocasionados por enfermedades de almacenamiento son reportados más en animales jóvenes (Kahn y Scott, 2007; Specht *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2012).

Con respecto al sexo, 3 casos correspondieron a machos y 1 caso a una hembra. Varios autores citan que los cambios vacuolares son comunes en los machos, ya que en algunos casos pueden asociarse a prostatomegalia, aumento de andrógenos, tumores de hígado, aumento circulante de la hormona aldosterona y aumento en la concentración de androstenediona (Gilor and Graves, 2011; Akol, 2012; Cortright, 2014). Al revisar en las enfermedades por almacenamiento se han reportado casos en machos (Gregory, 2007).

11.2. Hemosiderina

De los 3 casos procesados para la coloración de azul de Prusia, el 100 % (3) resultaron positivos. La distribución de los casos fue en 3 razas diferentes, la French Poodle, la Bóxer y la Pitbull, aunque el número de casos no es suficiente para hablar de tendencias, la literatura ha reportado la presencia de hemosiderina en caninos de raza Poodle (Fuentealba, 1997; Gordon, 2010; Boscato *et al*, 2014; Lawrence, 2015; Herbach, 2016), pero también en otras como la Cocker Spaniel, Doberman pinscher, Pastoral Alemán, Dash hound, Labrador (Fuentealba, 1997; Isobe, 2008; Smedley *et al*, 2009; Gordon, 2010; Herbach, 2016).

En los 3 casos el grupo etario más afectado fue el geriátrico con dos casos uno de 12 años y otro de 14 años, como ocurre con la raza el número de casos no permite reportar tendencias. Al consultar la literatura Smedley *et al* (2009) en su estudio encontró 12 hembras entre los 4 y 11 años con presentación de hemosiderina en hígado, al tener en cuenta otras causas como los tumores de glándulas suprarrenales

en caninos han sido reportadas edades entre los 7 y los 13 años (Herbach, 2016), lo que coincide con las edades halladas en nuestro trabajo. Al indagar en casos de lesiones inflamatorias del hígado (Hepatitis crónica) y por uso el uso de corticoides la edad más reportada fue 11 años (Fuentealba, 1997, Schutheiss *et al*, 2002; Boscato *et al*, 2014). Isobe (2008) reportó 23 casos con presencia de acumulación de hemosiderina en hígado asociadas con la presencia de lipogranuloma en donde el 87% dio un resultado de edades entre 7 y 14 años.

En cuanto al sexo dos casos correspondieron a hembras y el restante a un macho. Fuentealba (1997) en su estudio reportó que un 70% de sus casos donde encontró acumulación de hemosiderina en hígado correspondían a hembras, Isobe (2008) reportó que el 61% de sus casos de acumulación de hemosiderina fueron hembras, Boscato (2014) también reporto la presencia de hemosiderina en una hembra, en un caso de hepatopatía difusa crónica causada por la utilización de corticoide. De igual manera lo ha reportado Herbach (2016) en acumulación de hemosiderina en relación con tumores de glándulas suprarrenales la presentación fue similar en machos que en hembras. Sprague (2003) reporta un caso de un macho positivo a hemosiderina, el cual presentó hematocromatosis por transfusión sanguínea.

12. CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió revisar la casuística en la que se reportaron cambios vacuolares y alteraciones de pigmentos en tejidos parenquimatosos que llegaron al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad de los Llanos en el periodo comprendido entre los años 2003 y 2010, se debe resaltar que los resultados del trabajo son de gran valor ya que la casuística de este laboratorio comprende principalmente caninos del municipio de Villavicencio-Meta. Se encontró que la mayoría de los hallazgos se comportan según lo reportado en la literatura, sin embargo, es necesario aclarar que muchos casos fueron descartados por la mala calidad de conservación de los bloques parafinados lo que llevo a un número bajo de casos que no permite hablar de tendencias sino solo con referencia a la casuística recibida en el periodo estudiado al Laboratorio de Histopatología Veterinaria de la Universidad de los Llanos.

- Se logró identificar la acumulación de glucógeno en los casos valorados previamente por la técnica rutinaria mediante la coloración especial PAS.
- De la casuística sospechosa el 71% de los casos resultaron positivos para acumulación de glucógeno.
- La acumulación de glucógeno afecto a caninos juveniles y geriátricos.
- La raza que padece más esta anormalidad con un 80% fue la French Poodle.
- Los machos fueron más susceptibles a padecer este tipo de cambio vacuolar.

- La acumulación de hemosiderina en hígado, riñón, bazo y útero fue confirmada por medio de la coloración de Azul de Prusia.
- Todos los casos positivos ocurrieron en caninos mayores de 10 años de edad
- La distribución de las razas sugiere que puede ocurrir en cualquiera de ellas, como lo encontrado en nuestro trabajo.
- Es indispensable propender por un adecuado y completo diligenciamiento de las historias clínicas donde se incluya todos los datos de la reseña básica de un paciente.
- Son necesarios trabajos posteriores que complementen los hallazgos de esta tesis, buscando precisar a que corresponden los cambios vacuolares que marcaron como negativos.

13. BIBLIOGRAFIA

- ACKERMAN, L. (2011). The genetic connection a guide to health problems in purebred dogs. Second Edition. AAHA press Ed. Pg: 66-67
- AKOL, K. (2012) Scottish Terrier Degenerative Vacuolar Hepatopathy. Pacific Veterinary Specialists Monterey, Volume 7, Issue 1
- AMATRIAIN, M. (2000). Efectos del exceso de hierro sobre la salud. Med Naturista; N 2: 92-95.
- BARÃO, K. (2011). Actualización en el manejo de la diabetes mellitus. 3º Ed., Multimédica Veterinaria.
- BOHN, A. (2015). Diagnosis of Disorders of Iron Metabolism in Dogs and Cats. Clinics in Laboratory Medicine. Volume 35, Issue 3. Pg: 79-590
- BOOZER, L. and MACINTIRE, A. (2003). Canine babesiosis. The veterinary clinics small animals practice. 33: 885–904
- BOSCATO, M., BARTH, A., WOUTERS, F., NEGRÃO, T., SOUZA, S. e DRIEMEIER, D. (2014). Hepatopatia crônica associada a tratamento prolongado com fenobarbital em caninos. Ciências Agrárias, Londrina, Vol 35, No 1; Pg: 351-356

- BRAVO D, CRUZ, P. y OCHOA J. (2010). Prevalencia de neoplasias en caninos en la Universidad de los Llanos, durante 2004 a 2007. Rev. MVZ Córdoba, 15(1): 1925-1937
- CARNERO, M. (2015). Guía Nutricional: Glucogenosis Tipo II. Asociación española de enfermos de glucogenosis.
- CARVAJAL, N. (1970). Manual de fundamentos y técnicas en histoquímica. Universidad del Valle. Ciencias de la salud departamento de patología.
- CHRISTOPHER, M. (2003). Cytology of the spleen. Vet Clin Small Anim; 33: 135–152
- COOK, A. (2008). Trilostane: A therapeutic consideration for canine hyperadrenocorticism. ProQuest Agriculture Journals. Pg: 104-117.
- CORNEJO, V. and RAIMANN, E. (2006). Glucogenosis tipo I y III. Rev. chil. Nutr; Vol 33 No 2.
- CORTRIGHT, C., CENTER, S., RANDOLPH, J., MCDONOUGH, S., FECTEAU, K., WARNER, K., CHIAPELLA, A., PIERCE, R., GRAHAM, A., WALL, L., HEIDGERD, J., DEGEN, M., LUCIA, P. and ERB, H. (2014). Clinical features of progressive vacuolar hepatopathy in Scottish Terriers with and without hepatocellular carcinoma: 114 cases (1980-2013). J Am Vet Med Assoc ; 245(7):797-808.
- COTE, E. (2011). Clinical veterinary advisor dog and cats. Second edition; Elsevier. Pg: 1154.

CULLEN, J. (1980). Guide to Classification of Liver Disease in Dogs and Cats. Summary of the World Small Animal Veterinary Association Standardization Committee Pacific Veterinary Specialists & Emergency Service 41st Avenue Capitola, CA 95010

CULLEN, J. and KIDNEY, B. (2016). Diseases of the liver and páncreas. Western Conference of Veterinary Diagnostic Pathologists.

CULLEN, J. and VAN, T. (2007). Pathology of the Liver: What's New and What's Still True: Non-congenital/non-inherited biliary diseases and parenchymal liver diseases. C.L. Davis Foundation Pre-Meeting Worksho.

DAY, J. (2012). Clinical immunology of the dogs and cats. Second edition. Manson publishing ltd. Pg: 96.

FALL, T., HOLM, B., KARLSSON, A., AHLGREN, K., KA"MPPE, O. & EULER, H. (2008). Glucagon stimulation test for estimating endogenous insulin secretion in dogs. Veterinary Record 163: 266–270

FALL, T. (2009). Characterisation of Diabetes Mellitus in Dogs. Doctoral Thesis No 2009:45. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science. Acta universitatis Agriculturae Sueciae,

FITTSCHEN, C. and BELLAMY, J. (1984) Prednisone-induced morphologic and chemical changes in the liver of dogs. Vet Pathol. Jul; 21(4): 399-406.

- FLEEMAN, L. y RAND, J. (2004). Diabetes Mellitus canina: Estrategia nutricional. Enciclopedia de la nutrición clínica canina. Ed. Royal Canin A4306.0308.ES.
- FORRELLAT, M., GAUTIER, H. y FERNÁNDEZ, N. (2000) Metabolismo del hierro. Rev cubana Inmunol Hemoter; 16 (3):149-60
- FROISSART, R., PIRAUD, M., BOUDJEMLINE, A., SABAN, C., PETIT, F., BURON, A., EBERSCHWEILER, P., GAJDOS, V. and LABRUNE, P. (2011) Glucose-6-phosphatase deficiency. BioMed Central. Orphanet Journal of Rare Diseases. 6:27.
- FUENTEALBA, C., GUEST, S., HAYWOOD, S. y HORNEY, B. (1997). Chronic hepatitis: A retrospective study in 34 dogs. Can Vet J: 38: 365-373.
- GALLARDO, C., PAREDES, G. y PEREZ, J. (2003). Estudio histopatológico de hígado y riñón de caninos y su relación con las concentraciones de urea, creatinina, proteínas, enzimas (ALT y SAP) en sangre premortem y en humor acuoso a las 0 y 24 horas postmortem. Arch. med. vet. Vol.35 No.1.
- GAUNT, S. and BAKER, D. (1986) Hemosiderin in leukocytes of dogs with immune-mediated hemolytic anemia. Vet Clin Pathol.;15(3):8-10.
- GIGER, U. and NOBLE, N. (1991). Determination of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in Basenjis with chronic hemolytic anemia. J Am Vet Med Assoc 198:1755–1761

GILOR, C. and GRAVES, T. (2011). Interpretation of laboratory test for canine cushing's syndrome. Editorial Elsevier. Vol 26 No 2.

GOOGLE. (s.f.). [Mapa campus Universidad de los Llanos sede Barcelona en Google]. Recuperado el 28 de enero, 2017, de: <http://unillanos.edu.co/index.php/universidad/estructura-organica94/campus/campus-sede-barcelona>

GORDON, J. (2010). Inflammatory liver diseases in the dog (Proceedings). Web side Dvm360. (Revisado el 4 de marzo de 2017) En: <http://veterinarycalendar.dvm360.com/inflammatory-liver-diseases-dog-proceedings?id=&pageID=1&sk=&date=>

GREENHALGH, S., REEVE, J., JOHNSTONE, T., et al. (2014) Long-term survival and quality of life in dogs with clinical signs associated with a congenital portosystemic shunt after surgical or medical treatment. *J Am Vet Med Assoc*; 245:527- 533

GREGORY, B., SHELTON, D., BALI, D., CHEN, Y. and FYFE, J. (2007). Glycogen Storage Disease Type IIIa in Curly-Coated Retrievers. *J Vet Intern Med*; 21:40–46

GULTEKIN, G, RAJ, R., FOUREMAN P, et al. (2012) Erythrocytic pyruvate kinase mutations causing hemolytic anemia, osteosclerosis, and secondary hemochromatosis in dogs. *J Vet Intern Med*; 26:935–44.

- HAJAR, T., KRESCH, N., MORENO, G., ARENAS, R. y VEGA, M. (2013). Utilidad de la tinción PAS para el diagnóstico histopatológico. 11(1):13-18
- HARDY, R. (1988). Diabetes mellitus en el perro y en el gato. Revista de AVEPA. Vol. 8, No 2.
- HARVEY, J. (2006). Pathogenesis, laboratory diagnosis, and clinical implications of erythrocyte enzyme deficiencies in dogs, cats and horses. Vet. Clin. Pathol; 35: 144-156
- HARVEY, J. (2012). Veterinary Hematology: a diagnostic guide and color atlas. Ed. Elsevier. Pg: 256
- HERBACH, N., WIELE, K., KONIETSCHKE, U. y HERMANNNS, W. (2016) Pathologic Alterations of Canine and Feline Adrenal Glands. Open Journal of Pathology; 6:140-153.
- HERNANDEZ, C. and ALZATE, G. (2006). Pituitary tumor diagnosis using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in a dog with hyperadrenocorticism. A case report. Rev Colom Cienc Pecua Vol.19 No.4
- HERNÁNDEZ, F. y OCHOA, J. (2008). Estudio retrospectivo sobre amiloidosis detectada por histopatología en casos de necropsia en la Universidad de los Llanos desde enero de 2003 - junio de 2007”

- HIRSCHHORN, R. y REUSER, A. (2001). "Glycogen storage disease type II: Acid apha-glucosidase (acid maltase) deficiency", en Scriver, CR et al eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York. McGraw-Hill; Pg: 3389-3420.
- HLAVAC, N., LACERDA, L., CONRADO, F., HÜNNING, P., SEIBERT, M, GONZÁLEZ, F. and GIGER, U. (2012). Hemolytic anemia caused by hereditary pyruvate kinase deficiency in a West Highland White Terrier dog. Arch Med Vet; 44: 195-200.
- HOENIG, M. (2003). Mascotas con diabetes. Diabetes Voice. Volumen 48 No 1
- HOFF, J., LUMSDEN, V., VALLI, E. and KRUTH, S. (1991). Myelofibrosis: Review of clinical and pathological features in fourteen dogs Brent. Can Vet J; 32: 357-361
- HOLLAN, S. (1997). Transfusion-associated iron overload. Curr Opin Hematol; 4:436–441
- ISOBE, K., NAKAYAMA, H. & UETSUKA, K. (2008). Relation between lipogranuloma formation and fibrosis, and the origin of brown pigments in lipogranuloma of the canine liver. BioMed Central; doi:10.1186/1476-5926-7-5.
- JUBB K., KENNEDY, P. & PALMER, N. (2007). Patología de los animales domésticos. Quinta edición. ELSEVIER. Pp: 307-308.
- JUBB K., KENNEDY, P. & PALMER, N. (2007). Patología de los animales domésticos. Quinta edición. ELSEVIER. Pp: 418-419

- KAHN, C. and SCOTT, L. (2007). The Merck/Merial Manual for Pet Health. Merck Publishing and Merial. Pg: 124.
- KANEKO, J., HARVEY, J. and BRUSS, M. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Sixth Edition, Editorial Elsevier. Pg: 277-278.
- KISHNANI, P. et al. (1997). Isolation and nucleotide sequence of canine glucose-6-phosphatase mRNA: identification of mutation in puppies with glycogen storage disease type Ia. *Biochem Mol Med*; 61(2):168-177
- KISHNANI, P. et al (2001) Canine model and genomic structural organization of glycogen storage disease type Ia (GSD Ia). *Vet Pathol*; 38(1):83-91
- LABRUNE, P., TRIOCHE, P., BOUDJEMLINE, A. and GAJDOS, V. (2010). Glucogenosis: Enfermedad de almacenamiento de glucógeno por deficiencia de glucosa-6-fosfatasa tipo Ia. ORPHA: 79258
- LACROIX, A., FEELDERS, R. and NIEMAN, L. (2015). Cushing's syndrome. *The lancet*; Vol 386, No. 9996, pp: 913–927.
- LAWRENCE, Y. and STEINER, J. (2015). Canine Chronic Hepatitis: Diagnosis & Treatment. The World Small Animal Veterinary Association Liver Standardization Group; Vol 4, No 2. Pg: 26
- LEE, Y., KIMA, G., PANA, C., MANSFIELD, B. and CHOU, J. (2015). Minimal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity required to sustain survival and prevent

hepatocellular adenoma formation in murine glycogen storage disease type Ia. Ed. Elsevier; Vol 3: 28–32.

LEVINTHAL, G. and TAVILL, A. (1999). Liver Disease and Diabetes Mellitus. Clinical diabetes; Vol 17 No 2.

LLORET, A. (2009). Causas y diagnóstico de la diabetes mellitus. aspectos diferenciales en perros y gatos. Federación Iberoamericana de Asociaciones Veterinarias de Animales de Compañía

LÓPEZ, R. (2013). Hepatopatología para gastroenterólogos y hepatólogos. Rev Col Gastroenterol vol.28 no.2

MARTÍ, V., GUARINOS, J., AMINIAN, N., GUILLAUMET, E. y DOMÍNGUEZ, J. (2002) Insuficiencia cardíaca aguda irreversible debido a hemocromatosis cardíaca secundaria a transfusiones múltiples. Revista Médica de Chile; Vol 130: 430-432

MCCOWN, J. and SPECHT, A. (2011). Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. JAAHA. Vol 47 No. 3. Pg: 151-160.

MELIÁN, C. (2014). Diagnóstico del Hiperadrenorticismo (Síndrome de Cushing). Hospital Clínico Veterinario ULPGC. Clínica Veterinaria Atlántico.

MELIÁN, C., Pérez M. (2008). Manual de endocrinología de pequeños animales. Barcelona: Multimédica Ed Veterinarias.

- MARED, M. (2010). Glucose markers in healthy and diabetic bitches in different stages of the oestral cycle. Sveriges lantbruksuniversitet Fakulteten för Veterinär medicin och husdjurs vetenskap. Uppsala.
- MONTALVO, C. (2011). Estructura microscópica de los órganos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Departamento de Biología Celular y Tisular.
- MORENO, J., MANZANARES, J., DIAZ, M. and BENLLOCH, T. (2000). Glucogenosis: Protocolo de diagnóstico y seguimiento de pacientes con glucogenosis de afectación fundamentalmente hepática. Unidad de nutrición clínica. Universidad autónoma de Madrid.
- NELSON, R. and REUSCH, C. (2014). Animal models of disease: Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. J Endocrinol; Vol. 222 (3):T1-T9
- NELSON, R. and COUTO, C. (2014). Small animal internal medicine. Fifth Edition. Ed. Elsevier. Pg: 843-844
- NOVILLA, M., MEADOR, V. and JACOBSON, S. (2014). Pathological biomarkers in toxicology. Ed. Elsevier. Pg: 907–919
- PÉREZ, D. y ARENAS, C. (2014). Diabetes mellitus en pequeños animales. Ed. Intermédica. Pg: 5

- PÉREZ, G., VITTORI, D., PREGI, N., GARBOSSA, G. y NESSE, A. (2005).
Homeostasis del hierro: Mecanismos de absorción, captación celular y regulación.
Acta bioquím. clín. Latinoam; Vol.39 No. 3
- PIPERNO, A. 1998, Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica*; Vol 5:
447–455.
- POWELL, L., GEORGE, D., MCDONNELL, S. and KOWDLEY, K. (1998). Diagnosis of
hemochromatosis. *Ann Intern Med*; 129:925–931.
- RAND, J., FLEEMAN, L., FARROW, H., APPLETON, D. and LEDERER, R. (2004).
Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?. *J Nutr.* Aug;13 (4):2072-
2080.
- RAND, M., MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P. and RODWELL, V. (2000).
Plasma proteins, immunoglobulins, and blood coagulation. In: *Harper's
biochemistry*, 25th Ed., pp. 741–744.
- RASKIN, R. and MEYER, D. (2016). *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and
Interpretation Guide*. 3rd Edition. Ed. Elsevier. Pg: 75-102-118-177-207
- ROSAS, C., VÁSQUEZ, B. & DEL SOL, M. (2010). Descripción histológica e
histoquímica del hígado de cobayo (*Cavia porcellus*). *Int. J. Morphol.*, 28(1):151-
156.
- SCHAER, M. (2010). *Clinical Medicine of the dog and cat*. Londres: Manson publishing.

- Schultheiss, P., Bedwell, C., Hamar, D. y Fettman, M. (2002). Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. *J Vet Diagn Invest*; 14:396–402
- SEPESEY, L., CENTER, S., RANDOLPH, J. et al. (2006). Vacuolar hepatopathy in dogs: 336 cases (1993- 2005). *J Am Vet Med Assoc*; 229:246-252.
- SILVESTRI, S., LEPRI, E., DALL'AGLIO, C., MARCHESI, M. and VITELLOZZI, G. (2017). Nuclear Glycogen Inclusions in Canine Parietal Cells. Department of Veterinary Medicine, University of Perugia Italy. *Vet Pathol*.
- SKIBILD E, DAHLGAARD K, RAJPUROHIT Y, et al. (2001). Haemolytic anaemia and exercise intolerance due to phosphofructokinase deficiency in related springer spaniels. *J Small Anim Pract*; 42:298-300.
- SMEDLEY, R., MULLANEY, T. and RUMBEIHA, W. (2009). Copper-Associated Hepatitis in Labrador Retrievers. *Vet Pathol*; 46:484–490.
- SOLER, E. y CASTILLO, V. (2016). Síndrome de Cushing adrenal dependiente de hormona luteinizante. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*; Vol 53 (1): 36–41
- SPECHT, A., FISKE, L., ERGER, K., COSSETTE, T., VERSTEGEN, J., CAMPBELL, M., STRUCK, M., LEE, Y., CHOU, J., BYRNE, B., CORREIA, C., MAH, C., WEINSTEIN, D and CONLON, T. (2011). Glycogen Storage Disease Type Ia in

Canines: A Model for Human Metabolic and Genetic Liver Disease. Journal Biomed Biotechnol: 646257.

SPRAGUE, W., HACKETT, T., JOHNSON, J. and SWARDSON, C. (2003). Hemochromatosis Secondary to Repeated Blood Transfusions in a Dog. Vet Pathol; 40:334–337

TEJADA, F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. Rev Clin Med Fam; Vol.3 No.3

TEJADA, T. y FONT, A. Diabetes mellitus en un perro tratado con ciclosporina. Clin. Vet. Peq. Anim., 36 (3): 185 - 188

TURSI, M., IUSSICH, S., PRUNOTTO, M. And BURACCO, P. (2005) Adrenal Myelolipoma in a Dog. Vet Pathol; 42: 232–235.

TWEDT, D. and COLLINS, F. (2016). Idiopathic Vacuolar Hepatopathy. Colorado Pharmacology, toxicology & therapeutics. Fastest Veterinary Medicine Insight Engine.

VALLI, V. (2007). Veterinary comparative hematopathology. First Edition. Ed. Blackwell publish. Pg 65.

VERKEST, K., FLEEMAN, L., RAND, J. & MORTON, J. (2011). Evaluation of b-cell sensitivity to glucose and first-phase insulin secretion in obese dogs. American Journal of Veterinary Research; 72:357–366.

WEISS, D. (2005). Sideroblastic Anemia in 7 Dogs (1996–2002). *J Vet Intern Med*; 19:325–328.

YI, H., THURBERG, B., CURTIS, S. AUSTIN, S., FYFE, J., KOEBERL, D., KISHNANI, P. and SUN, b. (2012). Characterization of a canine model of glycogen storage disease type IIIa. *Disease Models & Mechanisms*; 5: 804-811.

ZACHARY, J. and MCGAVIN, N. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease: Pathologic Basis of Veterinary Disease. Fifth edition. Ed. Elsevier. Pg: 46*

ZAUCHA, J., YU, C., LOTHROP, C. et al. (2001) Severe canine hereditary hemolytic anemia treated by nonmyeloablative marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*; 7:14–24.

14. ANEXOS

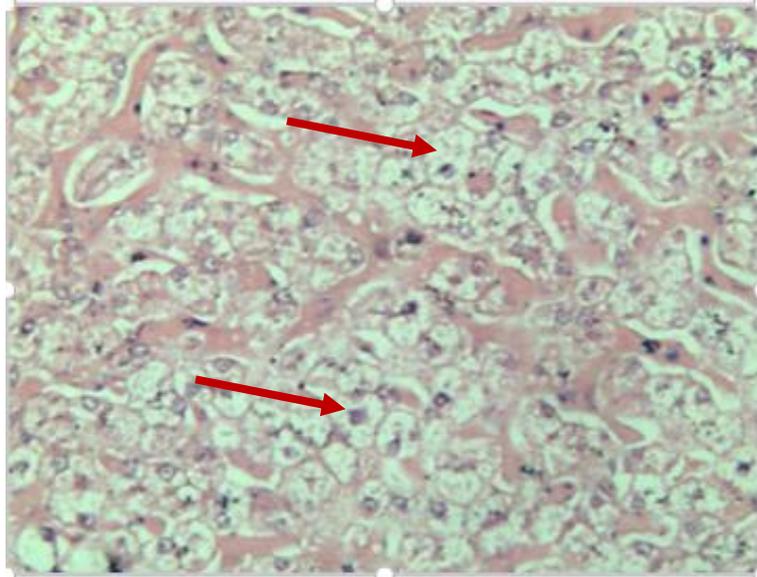


Imagen 1. Corte histológico de hígado mostrando en los hepatocitos cambio vacuolar, coloración de Hematoxilina y Eosina. 100x.

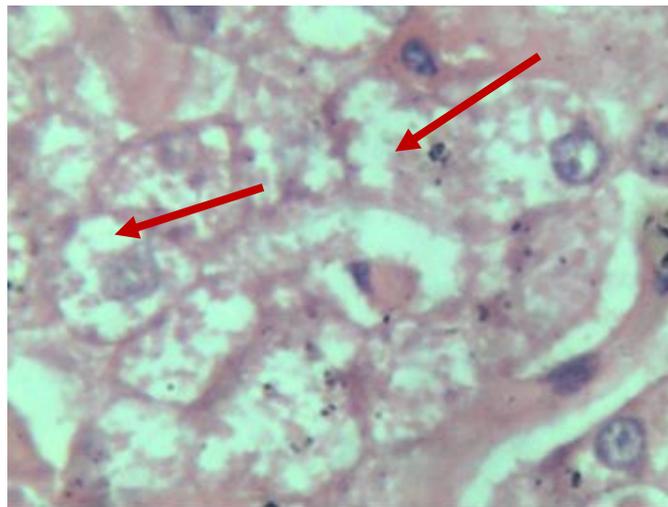


Imagen 2. Corte histológico de hígado mostrando en los hepatocitos cambio vacuolar, coloración de Hematoxilina y Eosina. 400x.

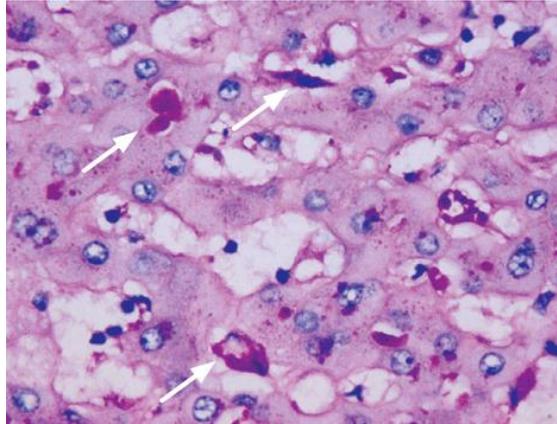


Imagen 3. Corte histológico de hígado mostrando células de Kupffer positivo a coloración de PAS. 40x. (López, 2013)

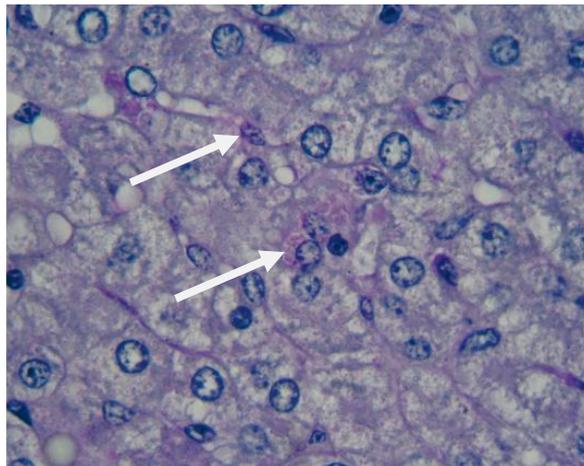


Imagen 4. Corte histológico de hígado mostrando células hepáticas positiva a coloración de PAS. 1000x. (Rosas y col, 2010)

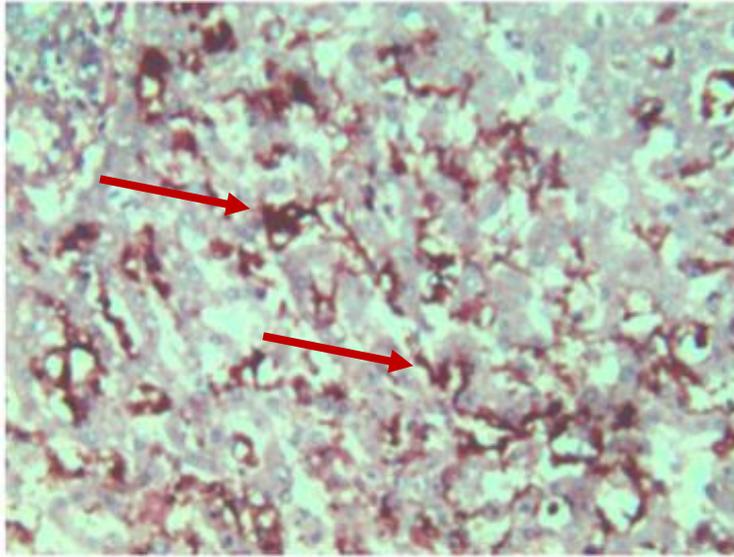


Imagen 5. Corte histológico de hígado mostrando en los hepatocitos y células de Kupffer marcación positiva a coloración de PAS. 100x.

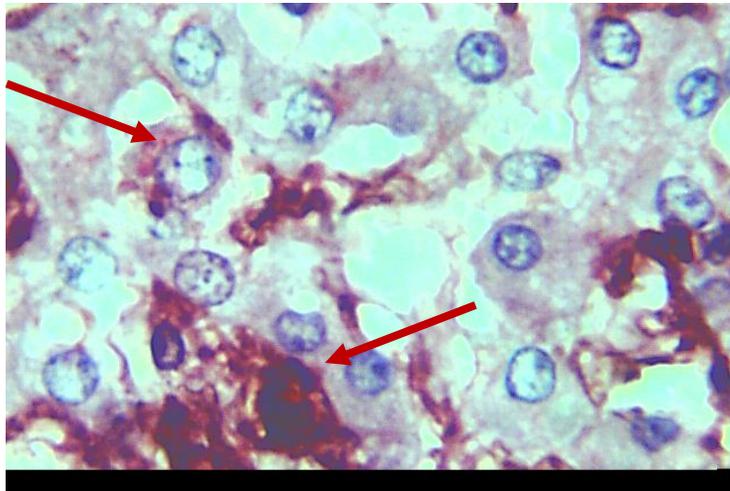


Imagen 6. Corte histológico de hígado mostrando en los hepatocitos y células de Kupffer marcación positiva a coloración de PAS. 400x.

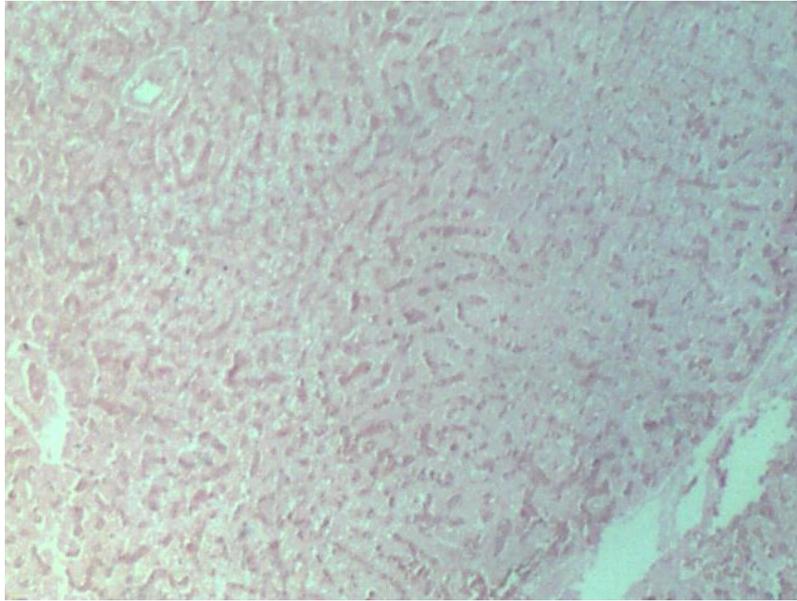


Imagen 7. Corte histológico de hígado negativo a coloración de PAS. 100x.

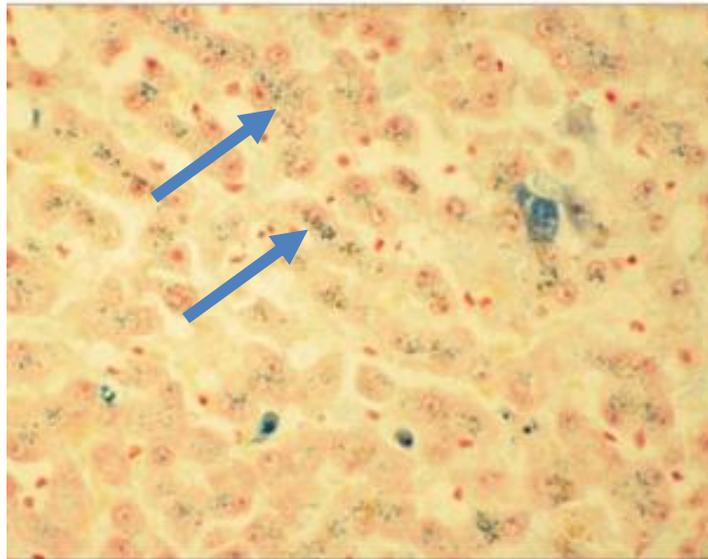


Imagen 8. Corte histológico de hígado células de Kupffer positivo para Azul de Prusia (Day, 2012)

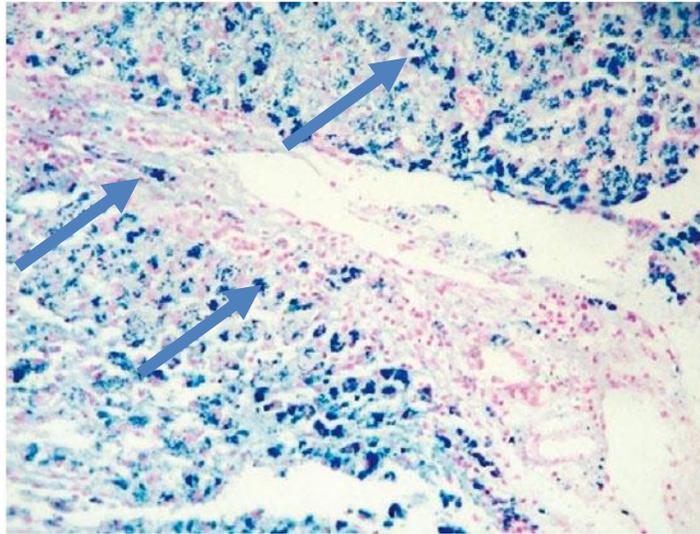


Imagen 9. Corte histológico de hígado con depósitos de hemosiderina en células de Kupffer, endotelio y tejido conectivo. (López, 2013)

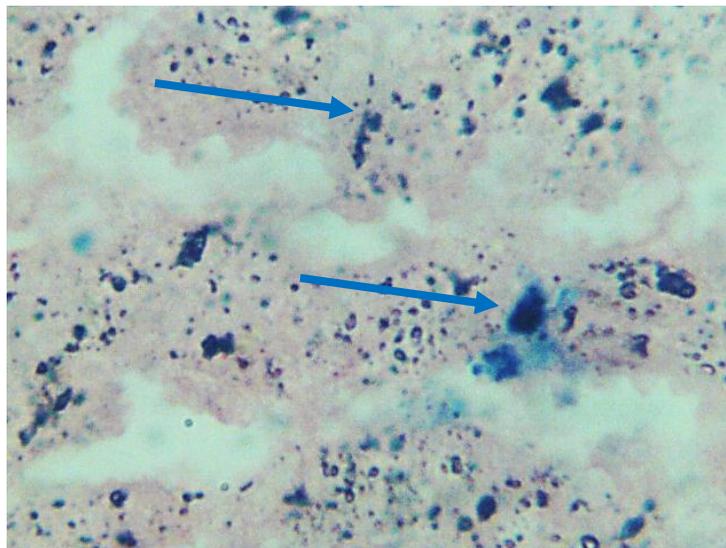


Imagen 10. Corte histológico de hígado mostrando marcación positiva para Azul de Prusia. 400x.