

## Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares coloreadas con plata (AgNORs) en tumores mamarios caninos

Gloria E Giraldo<sup>1</sup>, MV, MSc; Diego A Aranzazu<sup>1</sup>, MV, Esp; Berardo de J Rodríguez<sup>1</sup>, MV, Esp;  
Mónica M Pérez<sup>1</sup>, MV; María C Ramírez<sup>1</sup>, MV.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Patología Animal, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia,  
AA 1226, Medellín, Colombia.  
geg@epm.net.co

(Recibido: 11 marzo, 2002; aceptado: 14 febrero, 2003)

### Resumen

*La técnica de coloración de las Regiones Organizadoras Nucleolares con plata, conocida como coloración de AgNORs, se ha utilizado frecuentemente como un marcador tumoral eficiente en patología humana y con menor frecuencia en la patología veterinaria. En este trabajo se utilizó la coloración de AgNORs como una técnica para el diagnóstico de la neoplasia mamaria canina, considerada como una de las más frecuentes en esta especie. En el estudio se evaluaron 55 muestras que se obtuvieron de los archivos del laboratorio de Patología Animal y del Consultorio Veterinario de la Universidad de Antioquia; así como de otros consultorios de la ciudad de Medellín, Colombia. Las 55 muestras se colorearon con Hematoxilina -Eosina (H-E), y se clasificaron histológicamente de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), así: Adenocarcinoma Tubular (12), Adenocarcinoma Sólido (13), Adenocarcinoma Papilar (9), Tumor Mixto Mamario benigno (6) y Tumor Mixto Mamario maligno (15). Un segundo corte de cada muestra se coloreó con plata para marcar las AgNORs y luego se realizó su análisis morfológico por medio de un Sistema Automático Analizador de Imágenes (SAAI). Los resultados obtenidos fueron comparados utilizando el análisis de varianza (ANOVA), con una significancia de  $p < 0.05$ , y mediante el test de Fischer (F). El análisis estadístico mostró que los adenocarcinomas tubulares poseen un área nuclear estadísticamente mayor ( $p < 0.05$ ) al compararlos con los papilares y los sólidos, a su vez los papilares poseen un área de AgNORs menor que los otros dos tipos. Los tumores mixtos mamarios benignos poseen áreas nucleares y de AgNOR significativamente menores ( $p < 0.05$ ), que los tumores mamarios mixtos malignos. Ambos tumores, no presentaron diferencia estadística significativa con relación al número de AgNORs.*

**Palabras clave:** diagnóstico, marcador tumoral, neoplasias.

### Introducción

Los tumores de la glándula mamaria son las neoplasias más comunes en las hembras caninas, representando del 25% al 50% de todas las neoplasias en esta especie (22).

Estos tumores se originan de las células epiteliales que tapizan los conductos o los alvéolos, de las células mioepiteliales periféricas adyacentes a los conductos o del tejido conectivo intersticial (22).

La O.M.S propone una clasificación que ayuda a predecir el comportamiento biológico de los tumores con base a los tipos histológicos así: adenocarcinoma tubular, papilar, y cístico papilar; carcinoma sólido; carcinoma de células espinosas; carcinoma anaplásico; carcinoma de células escamosas y carcinoma mucinoso (11).

La evaluación histológica de muestras tumorales representa un porcentaje importante de los diagnósticos patológicos en Medicina Veterinaria (2).

Por esto es necesario la búsqueda permanente de técnicas rápidas, económicas y seguras que permitan al patólogo establecer diagnósticos y pronósticos cada vez más precisos y confiables.

Los marcadores tumorales se han utilizado en la caracterización de las neoplasias, en la clasificación de su malignidad y especialmente en el establecimiento de un pronóstico acertado. Entre estos marcadores están las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs); dichas regiones corresponden a conglomerados proteicos, compuestos de subunidades de RNA polimerasa I, una proteína designada C23 (nucleolina) y la proteína B23 (6). Las NORs se hacen evidentes a través de coloraciones argénticas, motivo por el cual son conocidas como AgNORs. Su coloración se ha utilizado en las tres últimas décadas como un marcador tumoral eficiente en la patología humana. En tanto en la patología veterinaria su utilización ha sido escasa (2, 3, 8).

El presente trabajo tuvo como propósito cualificar y cuantificar las AgNORs en tumores mamarios caninos, como una nueva herramienta diagnóstica en nuestro medio, para establecer parámetros histopatológicos que permitan un diagnóstico y un pronóstico más oportuno.

### Materiales y métodos

Para este estudio se seleccionaron en total 55 muestras de tumores mamarios caninos procedentes del laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, entre 1984 y febrero de 2000; así como muestras frescas obtenidas en el Consultorio Veterinario de la misma Universidad y en otros consultorios de la ciudad de Medellín.

Las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron a cuatro micras. Se realizaron dos cortes para cada tumor, uno fue coloreado con H-E (4) para confirmar el diagnóstico, y realizar la clasificación histopatológica. Esta se hizo con base en los criterios enunciados por la O.M.S.; el otro corte se coloreó con nitrato de plata mediante la técnica descrita por Ploton *et al* (18) y modificada por Aubele *et al* (1). En los diversos tipos de tumores la coloración se estandarizó con relación al tiempo de incubación. Las muestras fueron llevadas al microondas (Samsung electronics, Korea) durante tres segundos a 360 W sin control de temperatura para mejorar la fijación y

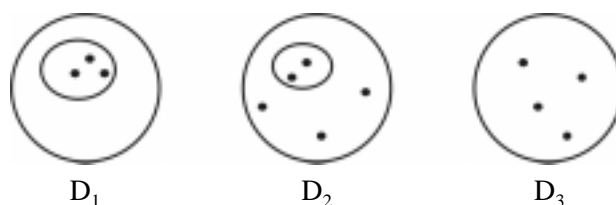
la coloración. Para la incubación, las placas fueron llevadas a baño maría (Indulab, Bogotá) que sirvió de cámara húmeda, a una temperatura de 390 °C.

El análisis morfométrico se llevó a cabo mediante microscopio óptico (Leica DLMB) con objetivo 100x y aceite de inmersión, el microscopio se adaptó a una cámara de video (Sony SCC-C 374 color video) la cual enviaba las imágenes a un SAAI, definido así previamente (Image-Pro plus version 4.0 Media Cybernetics) donde se realizó el conteo de seis células por campo para un total de 30 células por tumor. El número de la muestra se determinó mediante la técnica de estudio de variación de inestabilidad de valores medios con relación al tamaño de la muestra de la célula que los originó (10).

Para realizar el conteo y las mediciones de áreas AgNORs el procedimiento fue semiautomático, y la medición del área nuclear fue totalmente manual.

### Análisis cualitativo

La evaluación de la distribución AgNORs en la célula se expresó como  $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$ , donde  $D_1$  corresponde a AgNORs distribuidos en el nucléolo,  $D_2$ : AgNORs distribuidos en el núcleo y nucléolo,  $D_3$ : AgNORs distribuidos en el núcleo de acuerdo con Crocker *et al* (4) (véase Figura 1). Este parámetro se calificó en el SAAI.



**Figura 1.** Distribución de las AgNORs en las células neoplásicas según la localización nuclear y/o nucleolar.

### Análisis Estadístico

*Análisis cuantitativo.* El análisis estadístico se realizó bajo el programa para computadora Statgraphics version 3.1 Plus. Los adenocarcinomas se dividieron en tres grandes grupos dependiendo de su clasificación histopatológica en: 1) tubular, 2) sólido, 3) papilar; y el tumor mixto mamario en benigno y maligno. Los valores cuantitativos de AgNORs se expresaron en medias y desviación estándar (SD), como medida de tendencia central y

de dispersión, respectivamente. El ANOVA se utilizó para comparar los valores medios de los diferentes parámetros y se consideró el nivel de significancia estadística con un  $p < 0.05$ , evaluado por el test de Fischer (F). Cuando los parámetros presentaron una distribución no simétrica, fue necesario aplicar la transformación logarítmica o de raíz cuadrada (SQRT) para obtener una distribución simétrica y poder comparar los datos mediante el ANOVA (21).

Los resultados obtenidos para la distribución de AgNORs se presentaron en valores porcentuales (véase Tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución de AgNORs en el núcleo para tumores mamarios caninos.

Tipo de tumor	Número casos	Total células	Distribución (%)		
			1	2	3
Adenocarcinoma <sup>a</sup>					
Tubular	12	360	11.39	75	13.61
Sólido	13	390	12.82	79.49	7.69
Papilar	9	270	11.48	64.44	24.07
T.M.M. maligno	15	450	10.67	66.44	22.89
T.M.M. benigno	6	180	22.03	53.67	24.29

<sup>a</sup>Incluye los tres tipos tumorales  
T.M.M.: Tumor Mixto Mamario

## Resultados

### Coloración Hematoxilina-Eosina

Utilizando la coloración de rutina H-E se confirmó el diagnóstico histopatológico para 55 neoplasias mamarias, las cuales se clasificaron con base en los criterios de la O.M.S. como: Adenocarcinomas tipo tubular 12, sólido 13 y papilar nueve, y seis tumores mixtos mamarios benignos y 15 mixtos mamarios malignos (véanse Tabla 1 y Figura 2).

### Coloración AgNORs

En este estudio, tanto las muestras frescas como las de archivo de los tumores mamarios caninos permitieron la evaluación de las NORs a través de la coloración con plata debido a su alta especificidad (13, 18).

### Parámetros cualitativos

Las AgNORs en los diferentes tumores mamarios caninos se observan nítidamente, como puntos oscuros bien definidos, con un tiempo de coloración de 30

**Tabla 2.** Parámetros nucleares y de AgNORs para tumores mamarios caninos (Datos no transformados)

Tipo de tumor	Área nuclear (µm <sup>2</sup> )		Área AgNORs (µm <sup>2</sup> )		Número AgNORs	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Adenocarcinoma <sup>a</sup>	107.66	131.71	9.16	15.87	4.46	3.00
Tubular	148.17	136.88	12.11	17.02	4.81	3.32
Sólido	100.18	123.13	8.43	13.27	4.50	3.06
Papilar	64.62	121.04	6.29	17.10	3.95	2.68
T.M.M. maligno	275.88	146.03	13.03	14.99	3.98	2.18
T.M.M. benigno	219.23	147.16	9.35	12.87	3.68	2.20

<sup>a</sup>Incluye los tres tipos tumorales  
T.M.M.: Tumor Mixto Mamario  
SD: Desviación estándar

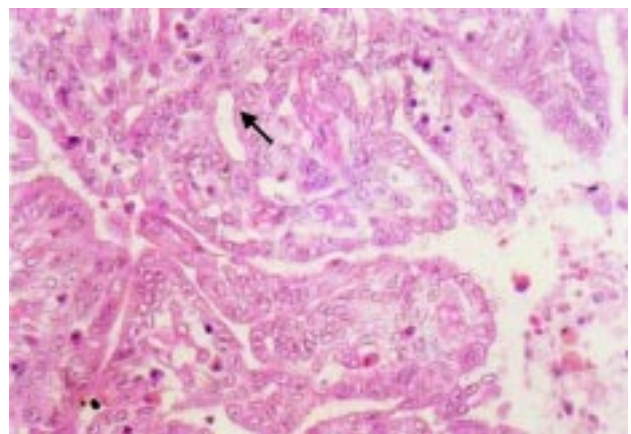
minutos luego de probar tiempos desde 20 minutos (véase Figura 3).

La técnica estadística que estudia la variación de inestabilidad de valores medios permitió establecer que el conteo de 30 células es suficiente para las mediciones AgNORs en los tumores mamarios caninos.

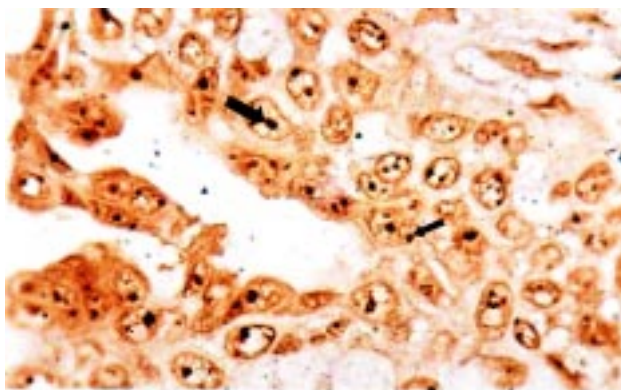
Para los diferentes tipos tumorales mamarios las AgNORs evaluadas por medio del SAAI, mostraron un alto predominio de distribución D<sub>2</sub>, que corresponde a la presencia de las NORs en núcleo y en nucléolo (véase Tabla 1).

### Parámetros cuantitativos

**Áreas.** Se midieron las áreas nucleares de las células tumorales de los adenocarcinomas y de los tumores mixtos mamarios para obtener una mejor clasificación histopatológica del tumor y relacionar este parámetro con las áreas AgNORs (véase Tabla 2).



**Figura 2.** Adenocarcinoma Papilar canino. La proliferación neoplásica muestra predominantemente células de tipo epitelial que mantienen una tendencia de organización papilar. H-E, 400X.



**Figura 3.** Tumor Mixto Mamario canino maligno. Se observan las AgNORs como puntos negros individuales, bien definidos en el núcleo (flecha delgada) y en el núcleo y nucléolo (flecha gruesa). Coloración de AgNORs. 1000X.

El adenocarcinoma tubular mamario presenta una mayor área nuclear estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), cuando se compara con las formas papilar y sólida, mientras que estos dos tipos poseen áreas similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ) (véanse Tablas 2 y 3).

Con relación al área AgNORs, el adenocarcinoma papilar presenta un área menor estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); los tipos sólido y tubular poseen áreas AgNORs similares estadísticamente ( $p > 0.05$ ) (véanse Tablas 2 y 3).

Los tumores mixtos mamarios presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para las mediciones del área nuclear y del área AgNORs, siendo menores en los tumores de comportamiento benigno (véanse Tablas 2 y 3).

**Número de AgNORs.** El número de AgNORs por célula (véase Tabla 2); es menor estadísticamente ( $p < 0.05$ ) en el adenocarcinoma papilar al compararse con los tipos tubular y sólido; para estos dos tipos no se presenta diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). La medición del número de AgNORs por célula no mostró diferencia significativa entre los tumores mixtos mamarios malignos y benignos ( $p > 0.05$ ) (véanse Tablas 2 y 3).

## Discusión

De acuerdo con lo reportado por otros investigadores, los tumores mamarios caninos son susceptibles de ser coloreados con plata para visualizar las proteínas formadoras de las NORs, definidas así previamente (2, 3, 8).

Los tumores mamarios evaluados en el presente trabajo necesitaron de 30 minutos como período de incubación, para ser visualizadas como puntos oscuros, bien definidos e individualizados. Este tiempo coincide con el reportado por otros autores (7, 13); Sin embargo, Bratulic *et al* (3) evaluando el valor pronóstico de las AgNORs en tumores mamarios caninos encontraron que se requerían 20 minutos para una óptima coloración; es de anotar que los autores reportaron cortes de 1 a 3 micras lo cual facilita la marcación de las proteínas propias de la NORs (3). Por otro lado, Bostock *et al* (2), evaluando igualmente el valor pronóstico de las AgNORs en tumores mamarios caninos, reportaron un tiempo de incubación de 35 minutos, para cortes a 4 micras (2). En este trabajo, un período de incubación superior a los 30 minutos provocó la unión de varios puntos AgNORs, perdiendo de esta manera su individualidad. De acuerdo con Derenzini y Theré (7), el tiempo de coloración se debe definir para cada muestra, con el propósito de obtener una lectura satisfactoria de las AgNORs, es decir que estas se presenten como puntos individuales.

El estudio de variación de la inestabilidad de valores medios permitió establecer que el conteo de 30 células es suficiente para las mediciones AgNORs en los tumores mamarios caninos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Orrel *et al* (16) y Evans *et al* (9), quienes para obtener una muestra mínima representativa utilizaron la media acumulada como herramienta estadística, encontrando que 30 células es el número apropiado.

**Tabla 3.** Parámetros nucleares y de AgNORs para tumores mamarios caninos (datos transformados a logaritmo)

Tipo de tumor	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )		Área AgNORs ( $\mu\text{m}^2$ )		Número AgNORs	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Adenocarcinoma <sup>a</sup>	3.66	1.50	0.95	1.62	4.46	3.00
Tubular	4.16	1.53	1.37	1.70	4.81	3.32
Sólido	3.64	1.44	0.92	1.58	4.50	3.06
Papilar	3.01	1.28	0.42	1.39	3.95	2.68
T.M.M. maligno	15.93*	4.67*	2.01	1.12	3.98	2.18
T.M.M. benigno	13.72*	5.56*	1.46	1.29	3.68	2.20

<sup>a</sup>Incluye los tres tipos tumorales

\*Transformación a raíz cuadrada

T.M.M.: Tumor Mixto Mamario

SD: Desviación estándar

Los resultados de este trabajo demuestran que el patrón de distribución de las AgNORs, para los diferentes tumores evaluados, es del tipo en el que las regiones se encuentran dispersas por el núcleo y el nucléolo de las células neoplásicas. De acuerdo con Shiro *et al* (20), este tipo de distribución es la más frecuente en los tumores de menor diferenciación. Por lo tanto en esta investigación los adenocarcinomas sólidos, fueron los tumores con un mayor porcentaje de células con este tipo de distribución (80%), a su vez que de los tumores evaluados son los que presentan una menor diferenciación histológica. De igual forma Giraldo (10), encontró que este patrón de distribución es el de mayor presentación en los linfosarcomas bovinos de los diferentes tipos celulares, siendo aún mayor su presentación en los del tipo linfoblástico (93.2%), cuando se compararon con los linfocíticos (61%).

El número medio de AgNORs por célula de 4.46 en los adenocarcinomas mamarios caninos, coincide con lo reportado por otros autores; quienes han encontrado entre 4.41 y 5.22 AgNORs/célula (2, 3, 8). La medición numérica de las AgNOR por célula, tanto en los adenocarcinomas como en los tumores mixtos mamarios fue posible a través del SAAI sin grandes dificultades, a diferencia de lo sugerido por Bratulic *et al* (3), quienes concluyeron que el SAAI no permite el conteo de las NORs en el nucléolo, procedimiento que se pudo realizar sin grandes dificultades en el presente trabajo. Por lo tanto se puede concluir que el SAAI es un método objetivo, que supera la subjetividad generada con la microscopía óptica, permitiendo que los resultados pueden reproducirse.

Un número menor de AgNORs por célula estadísticamente significativo en los adenocarcinomas papilares (3.95) al compararlo con los adenocarcinomas tubular y sólido, coincide con los datos de Bostock *et al* (2), que reportan 3.4, 5.1, 7.3 para los tumores papilares, tubulares y sólidos respectivamente. De acuerdo con estos autores el conteo de las AgNORs se aumenta con el grado de malignidad, excepto en los tumores diagnosticados como adenocarcinomas papilares, evento que también fue evidenciado en el presente trabajo.

Juntas y Pogacnik (12) evaluando los parámetros AgNORs entre las diferentes partes estructurales de los tumores mamarios caninos concluyeron que a

pesar de que no existe diferencia significativa de dichos parámetros, los resultados con relación al número de AgNORs en los diferentes grupos tumorales pueden ayudar a la clasificación de las neoplasias mamarias caninas.

En el presente estudio la medición de las áreas nucleares, permitió establecer que los adenocarcinomas tubulares poseen núcleos mucho más grandes que los sólidos y papilares, los cuales aunque no presentan diferencia estadística significativa con relación al mismo parámetro, poseen una diferencia numérica notoria. La evaluación de las áreas AgNORs mostró que los adenocarcinomas papilares, presentaban una menor área con relación a los otros tipos analizados. En el momento de relacionar ambas áreas se observa que una mayor área nuclear implica una mayor área de AgNORs, y a su vez un mayor número de éstas (véase Tabla 2). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por otros investigadores en diversos tipos de tumores glandulares (5, 15, 19). De esta forma, la evaluación de las alteraciones nucleares que ocurren en las células neoplásicas, se pueden cuantificar a través de su expresión AgNORs, como un indicador de su actividad proteica, evento que caracteriza a las células tumorales (7, 17, 18).

En los tumores mixtos mamarios no se encontró diferencia estadística significativa con relación al número de AgNORs por célula, que permita diferenciar las neoplasias benignas de las malignas. Estos resultados no coinciden con los reportados por Destexhe *et al* (8), quienes establecen un número medio de AgNORs/célula de 3.94 para tumores benignos y de 7.28 para tumores malignos. Es de anotar que el número de AgNORs encontrado para los tumores mixtos malignos en la presente investigación (3.98), es similar al reportado por los citados autores, para la forma benigna del mencionado tumor. Es posible suponer que estas diferencias puedan explicarse por el tamaño muestral; ya que la presente investigación evaluó 15 tumores mamarios mixtos malignos y seis benignos, en tanto que Destexhe *et al* (8) evaluaron un mixto maligno y siete benignos.

Aunque el número de AgNORs no ofreció diferencias estadísticas significativas entre los tumores mamarios mixtos maligno y benigno, las áreas nucleares y de AgNORs por célula si permitieron diferenciar estadísticamente estos tipos tumorales.

Los tumores mixtos mamarios malignos tienen áreas nucleares y de AgNORs mayores, cuando son comparados con los tumores mixtos mamarios benignos que poseen áreas menores. Estos hallazgos coinciden con los reportes de otros autores, con relación al comportamiento de las AgNORs en tumores glandulares (6, 8, 15).

De todo lo anterior se concluye que la transformación tumoral maligna esta asociada con cambios nucleares relacionados con el tamaño de los parámetros AgNORs, por lo tanto la evaluación simultánea de estos cambios, se convierte en una herramienta útil en el estudio de la patología tumoral mamaria.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes instituciones y personas quienes ayudaron a la realización de esta investigación: Comité para el desarrollo y la investigación (Codi), Universidad de Antioquia, Lida C. Álvarez, Ofelia Tobón, Anderson Garzón, Gustavo García, Ángel Giraldo, Guillermo Correa.

### Summary

#### *Nucleolar Organizer Regions in canine mammary tumors*

*The staining technique for the Nucleolar Organizer Regions using silver nitrate known as AgNORs stain is frequently used as a highly efficient tumor marker in human pathology and with less frequency in veterinarian pathology. The purpose of this study is to use AgNORs stain as a new technique to diagnose canine breast neoplasias which are considered to be highly frequent in this species. There were a total of 55 samples used in this study. These samples were obtained from the animal pathology laboratory archives and from the veterinarian center of the University of Antioquia as well as other local clinics in the city of Medellín, Colombia. The 55 samples were analyzed using the Hematoxylin-Eosin stain technique and further classified histopathologically in accordance with guidelines recommended by the World Health Organization (W.H.O.) thus: Tubular Adenocarcinoma (12), Solid Adenocarcinoma (13), Papillary Adenocarcinoma (9), Mixed Benign Breast tumors (6) and malignant (15) were diagnosed. A second cut (4  $\mu$ m) from each sample was stained with silver nitrate to label the AgNORs. The morphometric posterior analysis was performed using the automatic image analyzer (AIA). The results were statistically analyzed using the variance analysis (ANOVA) with statistically  $p < 0.05$  value additionally Fischer (F) test was used. The statistics analysis showed that tubular adenocarcinoma have a nuclear area bigger significant statistically ( $p < 0.05$ ) compared with papillary and solid, while the papillary have AgNORs area smaller than the others types. The benign breast mixed tumors have nuclear area and AgNORs area smaller significant statistically ( $p < 0.05$ ) than malignant breast mixed tumors. Both tumors malignant and benign mixed did not present statistics difference significant with relation to AgNORs numbers.*

**Key Words:** *diagnosis, neoplasia, tumoral marker.*

### Referencias

1. Aubele M, Biesterfel S, Derenzini M, et al. Guidelines of AgNOR quantitation. Zentral Für Pathol 1994; 140:107-108.
2. Bostock DE, Moriarty J, and Crocker J. Correlation between histologic diagnosis mean Nucleolar Organizer Region count and prognosis in canine mammary tumors. Vet Pathol 1992; 29:381-385.
3. Bratulic M, Grabarevic Z, Artukovic B, and Capak D. Number of nucleoli and Nucleolar Organizer Regions per nucleus and nucleolus-prognostic value in canine mammary tumors. Vet Pathol 1996; 33:527-532.
4. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol 1989; 158:185-188.
5. De Vico G, Papparella S, Di Guardo G. Number and size of silver-stained nucleoli (Ag-NOR Clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour. J Comp Pathol 1994; 110:267-273.

6. Derenzini M, Ploton D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Rev Intern Exper Pathol* 1991; 32:149-192.
7. Derenzini M, Threré D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J Pathol* 1991; 165:337-342.
8. Destexhe E, Vanmanshoven P, Coignoul F. Comparison of argyrophilic nucleolar organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *Am J Res* 1995; 56:185-187.
9. Evans AT, Orrell JM, Grant A. Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: A study with quantitation and pattern analysis. *J Pathol* 1991; 165:61-67.
10. Giraldo MGE. Regiões organizadoras nucleolares coradas pela prata (AgNORs) em linfossarcoma de bovinos adultos. Dissertação Mestrado Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 108p.
11. Hampe JF, Misdord W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull Wld Hlt Org* 1974; 50:111-133.
12. Juntas P, Pogacnik M. Morphometric analysis of AgNORs in tubular and papillary parts of canine mammary gland tumors. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22:185-192.
13. Linder LE. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions(AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41:439-445.
14. Luna LG. Manual of histologic staining method of The Armed Forces Institute of Pathology. 3rd, New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
15. Nyska A, Zusman I, Klein T, et al. Assessment of the nucleolar organizer regions by automated image analysis in benign and malignant colonic tumours and adjacent tissues in rats. *J Comp Pathol* 1995; 113:45-50.
16. Orrel JM, Evans AT, Grant A. A critical evaluation of AgNOR counting in benign naevi and malignant melanoma. *J Pathol* 1991; 163:239-244.
17. Ploton D. Structure and molecular organization of nucleolus. *Zentr für Pathol* 1994; 140:3-6.
18. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18:5-14.
19. Preziosi R, Della Salda L, Ricci A, *et al.* Quantification of nucleolar organizer regions in canine perianal gland tumors. *Res vet sci* 1995; 58:277-281.
20. Shiro T, Toshihito S, Naitoh Y, *et al.* A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1993; 71:44-49.
21. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods* 8ed, Iowa: Iowa State University Press/Ames, 1989; 282-296.
22. Theilen GW, Madewell BR. *Veterinary cancer medicine* 2 de Philadelphia: Lea & Febiger 1979. 436p.