



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Y PECUARIAS.**



**“ACTIVIDAD ANTI-ANGIOGÉNICA DE TALIDOMIDA EN TUMOR VENÉREO  
TRANSMISIBLE CANINO”.**

**MARIELA ALEJANDRA CABELLO VÁSQUEZ.**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

**PROFESOR GUÍA: Dra. ESTEFANÍA FLORES PAVEZ**

**SANTIAGO, CHILE**

**2006**

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los perros y gatos ocupan un lugar indiscutido en el núcleo familiar. Siendo objeto del afecto y la preocupación de quienes disfrutan de su compañía, exigen del médico veterinario cuidados en salud de óptima calidad. Un estándar de sanidad establecido mediante deparasitación, alimentación, manejo vacinal apropiado y la disponibilidad de tratamientos eficaces para las enfermedades infecto-contagiosas, han dado lugar a otro tipo de patologías, asociadas a la longevidad : lesiones degenerativas, insuficiencias orgánicas, y cáncer. Las terapias antineoplásicas con las cuales se cuenta, como la quimioterapia y la radioterapia, son altamente lesivas, debido a que no seleccionan las células sobre las cuales ejercen su acción, dañando tejidos sanos. Superar esta desventaja es difícil ya que el tejido neoplásico proviene de células del propio organismo, por lo que los elementos destinados a su destrucción afectan también al tejido sano. Además estas terapias son de una eficiencia relativa y generan resistencia.

En la necesaria búsqueda de tratamientos alternativos o complementarios para el cáncer, se ha demostrado que el crecimiento tumoral y su capacidad metastásica están altamente relacionados con la capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos para sustentar su acelerado metabolismo. Poder intervenir en la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes) y su control, aparece como una posibilidad innovadora en el tratamiento del cáncer, en especial al enfocarla en la inhibición de esta capacidad tumoral.

Esta investigación busca aportar conocimientos al respecto, mediante el estudio del efecto de una droga de acción anti-angiogénica directa, la talidomida, sobre la microvascularización del Tumor Venéreo Transmisible (TVT) canino.

## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Tumor Venéreo Transmisible (TVT) Canino:**

El TVT es un tumor de células redondas, cuya presentación natural se describe en los miembros de la familia canidae. Tiene una distribución geográfica amplia, afecta principalmente zonas en subdesarrollo, urbanas tropicales y subtropicales (Flores *et al.*, 2000). En Santiago de Chile se ha descrito como la segunda neoplasia de mayor incidencia en caninos (Flores *et al.*, 1997). Se transmite a través de la implantación de células tumorales libres desde un perro a otro mediante el coito y por conductas típicas de los canidos, como el lamido, y el olfateo de genitales externos (Rogers, 1997). Afecta mayormente caninos jóvenes, sexualmente maduros de edades entre uno y diez años. Se ubica en la mucosa genital de ambos sexos (Weller, 1994; Flores *et al.*, 2000), en el macho en la mucosa peneana, pared prepucial y escroto, en la hembra en la mucosa vaginal, vulvar y vestibular. Se puede encontrar formas extragenitales, en la mucosa oral, nasal, conjuntival, anal y también a nivel cutáneo. El TVT puede adoptar diversas formas, nodulares, pedunculadas, sésiles o multilobuladas, bien irrigadas, solitarias, o profusamente distribuidas en la superficie mucosa, conformando masas sangrantes y friables, que desprenden con facilidad segmentos de tejido transplantable (Flores *et al.*, 2000).

El prediagnóstico clínico de TVT, es orientado por la morfología macroscópica y la localización, el sangramiento, y la anamnesis. El diagnóstico definitivo, sólo será dado por la citología o biopsia. La citología de TVT, es un excelente método de diagnóstico, rápido, seguro, fácil, inocuo y económico (Flores *et al.*, 2000). Al examen histopatológico, de acuerdo a su actividad mitótica, fibrosis y morfología celular, se puede clasificar el TVT en dos fases, la fase progresiva, caracterizada por grandes células tumorales dispuestas en

láminas, ordenadas en grupos o masas delimitadas por escasas fibras colágenas, y la fase regresiva, donde las células neoplásicas se rodean de una abundante cantidad de fibras de colágeno denso (Lombardi, 1995). La estadificación neoplásica, es necesaria para ver la evolución del tumor frente al tratamiento, no para el pronóstico de los pacientes con TVT (Carrión, 2001).

La remisión espontánea del TVT no ocurre en forma natural, es necesaria una terapia para su eliminación del individuo afectado ( Alcoba, 2001).

La escisión quirúrgica del TVT, es apropiada solamente para las formas nodulares o pedunculadas, pequeñas, y solitarias (Flores *et al.*, 2000), la resección de grandes superficies de mucosa, deriva en severas hemorragias y daños estructurales, con generación de cicatrices, que alterarían la función normal del segmento afectado.

La terapia más eficaz y práctica es la quimioterapia con Sulfato de Vincristina, alcaloide que inhibe la mitosis en metafase, mediante tratamientos endovenosos semanales en una dosificación de 0,03 mg/kg. (Flores *et al.*, 1997). La droga se une a la tubulina, impide la formación de microtubulos y obstaculiza la proliferación celular. Las improntas en fase regresiva posterior al tratamiento con vincristina, muestran una disminución de la celularidad tumoral (Flores *et al.*, 2000). El efecto final de la regresión tumoral por quimioterapia es fibrosis y estaría acompañado por un aumento de la densidad vascular del tumor. Este aumento sería relativo, ya que resultaría del colapso del parénquima tumoral (González *et al.*, 2000). Así, la regresión tumoral por vincristina no estaría asociada a un efecto anti-angiogénico secundario.

El TVT es una neoplasia que puede ser evitada, siendo muy importante las medidas a tomar para su prevención, que están fuertemente orientadas a los grupos de riesgo, y corresponden a manejos de tenencia responsable de los perros (Haleby, 2000).

## **2.2 Terapias antineoplásicas establecidas**

Tanto en medicina humana como también en medicina veterinaria, se han utilizado distintas modalidades de tratamiento, como cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia e hipertermia.

La cirugía es el tratamiento de elección especialmente para cualquier tipo de neoplasia sólida, excluyendo a las hematológicas y linforreticulares, es una herramienta importante en el diagnóstico y seguimiento de algunas condiciones y puede ser asociada a otros tipos de terapia, en los tumores que pueden metastizar ( Flores *et al.*, 2000 ).

La quimioterapia se recomienda principalmente en neoplasias hemopoyéticas y linforreticulares, para prevención y terapia de metástasis. Sus complicaciones se asocian a resistencia de las células cancerosas a las drogas y a sus efectos tóxicos: reacciones de hipersensibilidad, toxicidad dermatológica, cardiotoxicidad, toxicidad pulmonar, toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, toxicidad hematológica, y neurotoxicidad (Weller, 1994).

La modulación del sistema inmune o inmunoterapia es otra forma de tratamiento. Sin embargo al administrar un modificador biológico exógeno a un paciente, se afecta todo el sistema y su habilidad endógena de controlar modificadores y células efectoras.

La radioterapia, se usa como terapia local o regional. Su combinación con quimioterapia e hipertermia, potencia su efecto. Además de dañar las células tumorales, afecta otras células expuestas, gastrointestinal, médula ósea y folículos pilosos, e induce una necrosis irreversible del tejido normal.

La hipertermia, es experimental, comenzó a ser considerada alrededor del año 1800, al observar que los pacientes con cáncer, que cursaban con fiebre alta, podían presentar remisiones espontáneas de sus tumores (Dewhirst y Sim, 1984).

### **2.3 Terapia anti-angiogénica**

A diferencia de las anteriores, no está dirigida a células tumorales, sino que a los vasos sanguíneos que las nutren. Judah Folkman en el año 1971, postuló que el crecimiento tumoral y metástasis eran dependientes de la neoformación de vasos sanguíneos y que bloquear la angiogénesis podría ser una estrategia para detener el crecimiento tumoral. El concepto de que el crecimiento tumoral es angiogénesis-dependiente es hoy respaldado por más de 2500 reportes científicos según la Angiogenesis Foundation (Ramos, 2004).

### **2.4 Factores anti-angiogénicos**

Entre los factores angiostáticos o anti-angiogénicos que se han identificado en los últimos años están el extracto de cartílago, la protamina, el factor plaquetario-4, la medroxiprogesterona, antibióticos (minociclina, la fumagilina y la eponemicina), algunos corticoides (cortisona, dexametasona, tetrahydrocortisol) (Ramos, 2004), inhibidores de las metaloproteinasas (TIMPs), interferones, trombospondina-1, vitamina D, y la Talidomida. También se han aislado factores de tejidos tumorales como la angiostatina y la endostatina.

### **2.5 Angiogénesis**

La angiogénesis es la neoformación de vasos sanguíneos a partir de la microvasculatura existente. La angiogénesis se presenta no solo en tumores sólidos o del tipo hematológico, sino también en otras patologías como enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), inflamación crónica (artritis reumatoídea), diabetes (retinopatía diabética), soriasis, endometriosis y obesidad (Carmeliet y Jain, 2000), como también en procesos fisiológicos como desarrollo embrionario, reparación de heridas y el ciclo menstrual.

Las investigaciones en angiogénesis, han derivado en tres líneas de aplicación: la cuantificación de la angiogénesis como método de diagnóstico y pronóstico, aceleración de la angiogénesis durante la reparación y la inhibición de la angiogénesis.

En el proceso de angiogénesis tumoral participan múltiples mecanismos que se pueden clasificar en tres grandes grupos de eventos, cada uno regulado por varias moléculas que contribuyen significativamente al proceso que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Griffioen y Molema, 2000):

**Inicio de la respuesta angiogénica:** la activación de células endoteliales es el primer proceso en ocurrir, cuando moléculas pro-angiogénicas predominan sobre las anti-angiogénicas. Algunas señales que gatillan este desbalance son la hipoxia, presión de células en proliferación, células inflamatorias y mutaciones genéticas. Entre las moléculas que participan en esta fase están el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el óxido nítrico (NO).

**Migración y proliferación de células endoteliales:** las células endoteliales activadas proliferan, penetran la matriz extracelular y se adhieren a componentes de ésta. La matriz es degradada por metaloproteinasas de matriz (MMPs). Otras moléculas que participan son integrinas y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-b).

**Maduración de la neovasculatura:** las interacciones entre células, y entre éstas y componentes de la matriz extracelular estimulan la formación de estructuras tubulares y el depósito de elementos periendoteliales. Entre las moléculas que participan están el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-a) y angiopoyetinas.

### **2.5.1 Determinación de la angiogénesis:**

La angiogénesis se puede usar como alternativa terapéutica y para determinar el riesgo de metástasis y recurrencia tumoral, realizando la cuantificación de los nuevos vasos formados, observados en un campo microscópico predeterminado (Índice de Densidad Microvascular), gracias al conteo del área vascular mediante el uso de un programa de análisis morfométrico.

### **2.5.2 Ventajas de la terapia anti-angiogénica:**

La terapia anti-angiogénica puede ser usada en combinación con otros tratamientos como radioterapia, cirugía y quimioterapia, con las ventajas de no tener efectos tóxicos sobre médula ósea y aparato gastrointestinal. Sus efectos secundarios serían de mediana magnitud y bien tolerados, como retardo de la cicatrización e infertilidad (Brem, 1999). El blanco de las drogas anti-angiogénicas es una población de células endoteliales estables, homogéneas y sin altas tasas de mutaciones, a diferencia de las células tumorales, por lo que la resistencia, gran problema en quimioterapia del cáncer, no aparecería en el tratamiento con drogas anti-angiogénicas (Boehm *et al*, 1997).

### **2.5.3 Estrategias para intervenir la angiogénesis:**

Un amplio espectro de estrategias para la modulación de la angiogénesis ha sido descrito (Griffioen y Molema, 2000) tales como:

- a. Intervención en el crecimiento de células endoteliales: la más exitosa aproximación para la modulación de la angiogénesis, a la fecha, es el uso de agentes que inhiben específicamente el crecimiento de células endoteliales.

- b. Intervención en la adhesión y migración de células endoteliales: el proceso de angiogénesis además depende de la adhesión y migración de las células endoteliales a través de la matriz extracelular, se han buscado moduladores de estas interacciones.
  
- c. Intervención con metaloproteinasas: en relación a la migración y adhesión de las células endoteliales, el uso de inhibidores específicos de las proteinasas que disuelven el tejido conectivo, y así facilitan la migración de células endoteliales y la subsiguiente formación de vasos.

## **2.6 Talidomida**

La talidomida fue creada en 1953 por el doctor Wilhem Kunz, en los laboratorios Chemie-Grünenthal en la entonces República Federal Alemana, buscando nuevos compuestos antihistamínicos. No fue efectiva para ese fin, pero si mostró efectos hipnóticos y sedantes. Por esto se recetó en Europa, al fin de la década de los 50, para tratar la ansiedad e insomnio y en mujeres embarazadas, las náuseas y vómitos matutinos. Se comercializó en varios países, Japón, Australia y Canadá. A comienzos de la década de los 60, cuando los médicos descubrieron que causaba terribles defectos al nacimiento, se retiró del mercado. En diversas partes del mundo nacieron más de 10.000 niños gravemente deformes, muchos de ellos sin brazos ni piernas, porque sus madres habían tomado la droga al comienzo del embarazo (D'Amato *et al.*, 1994).

Después de su prohibición en 1962, la talidomida fue relegada al mercado especializado. La vuelta al uso terapéutico de la talidomida se debe a sus efectos farmacológicos e inmunológicos descubiertos recientemente. La talidomida es un agente

inmunomodulador que podría suprimir la producción excesiva de TNF alfa (factor de necrosis tumoral alfa), y regular la baja de moléculas de superficie de las células implicadas en la adhesión y migración de los leucocitos (D'Amato *et al.*, 1994).

La talidomida fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del "erythema nodosum leprosum", una manifestación inflamatoria de la lepra y para potenciales aplicaciones terapéuticas a una amplia gama de enfermedades. Se ha usado con éxito en varios padecimientos dermatológicos y reumatológicos: eritema nodoso leproso, estomatitis aftosa recurrente, lupus eritematoso discoide y sistémico, enfermedad de Behcet, prurigo nodular y actínico, enfermedad de injerto contra hospedero, para el tratamiento de las úlceras aftosas en la infección por el VIH y en mieloma múltiple, en el cual el efecto antitumoral puede ser directo al estimular la apoptosis de las células mielomatosas e inhibir la actividad de la ciclooxigenasa ( Vacca *et al.*, 1995).

Actúa inhibiendo el factor de crecimiento del endotelio vascular que normalmente estimula la angiogénesis. Se ha determinado que puede inhibir la proliferación de los vasos asociados con los tumores, y así disminuir o interrumpir su crecimiento.

Los efectos secundarios de la talidomida generalmente son inmediatos y raramente severos, mejoran rápidamente al disminuir la medicación o suspenderla. Produce sedación, minimizada al realizar su administración en la noche; puede haber cansancio, cambios en el estado de ánimo, cefalea, impotencia sexual, náuseas, vómito, constipación, dolor abdominal, meteorismo, aumento del apetito, hipotensión, sequedad ocular y de mucosas, prurito, uñas quebradizas, edema de la cara y extremidades (Brem, 1999).

El efecto secundario más severo es la teratogenicidad, siendo las focomelias o amelias, las malformaciones más comunes; acompañadas de malformaciones de órganos internos como: estenosis duodenal, fístula esofágica, anomalías del tubo neural,

microoftalmía y malformaciones de oídos. Se ha planteado la posibilidad de la supresión de la angiogénesis durante la embriogénesis y la existencia de un metabolito involucrado en la actividad teratogénica (D'Amato *et al.*, 1994).

Un efecto secundario frecuente es la neuropatía periférica sensitiva, manifiesta como parestesias simétricas distales y dolorosas, primero en los pies y luego en las manos. Otros efectos son ataxia, calambres musculares y debilidad muscular. La disfunción motora es de aparición tardía y poco usual (Dimopoulos y Eleutherakis-Papaiakovou, 2004). No tiene efecto citotóxico siendo una opción en pacientes donde otro tipo de terapias no son factibles.

Para la talidomida no se han realizado ensayos que determinen la dosis máxima tolerada, ni se han diseñado esquemas de administración óptimos, solo se usa en dosis creciente desde un mínimo arbitrariamente determinado, (50 mg totales al día para un ser humano adulto) hasta alcanzar una dosis máxima que produzca efectos secundarios, determinando la dosis máxima tolerada si efectos secundarios indeseables se hacen evidentes (Franks *et al.*, 2004 ).

### 3. **OBJETIVOS**

- **Objetivo General:**

- Describir la influencia de drogas anti-angiogénicas en el crecimiento tumoral, en un modelo neoplásico canino de presentación natural.

- **Objetivos Específicos:**

- Identificar, describir y cuantificar histológicamente la actividad angiogénica del TVT canino, en fase progresiva (control sin tratamiento).
- Identificar, describir y cuantificar histológicamente el efecto anti-angiogénico de Talidomida en TVT canino.
- Identificar y describir la presentación de efectos secundarios asociados al tratamiento con Talidomida.

## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Biológico:**

Seis caninos, machos y hembras, sexualmente maduros, sin distinción de raza, atendidos en el Servicio de Cirugía de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con diagnóstico de TVT progresivo confirmado mediante citología e histopatología. Estos perros fueron sometidos a un esquema diagnóstico y terapéutico señalado en el Anexo nº1.

#### **4.1.2. Farmacológico:**

- Talidomida (Talidomida Lazar<sup>R</sup>. Laboratorio Lazar).

#### **4.1.3 Laboratorio Inmunohistoquímica:**

- Materiales para biopsia.
- Micrótopo de rotación (Leitz).
- Microscopio óptico Nikon Eclipse E 600.
- Cámara de video digital Cool-Snap Pro (Media Cybernetics, USA).
- Programa de análisis morfométrico Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA).
- Computador compatible con software morfométrico.
- Cámara húmeda (ProLab).

### **4.2 Metodología:**

A cada paciente se le administró Talidomida , en dosis diaria de 8 mg/Kg (Franks *et al.*, 2004 ), por vía oral, por siete días, seguido de aplicaciones de dosis decrecientes del 50% cada 2 días, también por siete días. Durante las aplicaciones de Talidomida se realizaron los siguientes procedimientos:

- Examen clínico: inicial, en los controles a los 7 y 14 días.
- Muestras para Hemograma y Perfil Bioquímico: previo al tratamiento y una vez terminado el tratamiento con Talidomida.
- Biopsias: se obtuvieron muestras tumorales previo al tratamiento, durante y terminado éste ( Ver anexo n°1).

Las biopsias se fijaron en formalina al 10% por 24 hrs. Luego se incluyeron en parafina y se obtuvieron los cortes histológicos de 5 micrómetros de espesor con micrótopo de rotación. Los cortes fueron desparafinados mediante paso por xilol, alcoholes descendentes y agua y se tiñeron con Hematoxilina – Eosina (H-E) para diagnóstico y descripción general del tumor, recuento de vasos sanguíneos y determinación del área vascular.

#### **4.2.1 Tinción de cortes**

Para identificar la actividad angiogénica, se realizó tinción con hematoxilina eosina, para lo cual los cortes fueron montados en portaobjetos y luego desparafinados.

#### **4.2.2 Efectos secundarios**

Se determinó presencia o ausencia de los efectos secundarios de tipo clínico y hematológico, consignados en la literatura, y de cualquier reacción inesperada durante el curso del ensayo clínico (anexo 2).

#### **4.2.3 Estudio Histológico de las Biopsias:**

En los preparados histológicos con tinción en base a hematoxilina eosina, observados usando aumento de 40X, se determinó al azar 5 campos o áreas, en los que se marcó los vasos sanguíneos. En dichas áreas se realizó el recuento de los vasos sanguíneos y se determinó la actividad angiogénica mediante la cuantificación del área del lecho vascular, medida en micrómetros cuadrados ( $\mu^2$ ). Esto se hizo con el uso de un programa de

análisis morfométrico computacional, calculándose un valor promedio de los campos elegidos al azar, determinados en un microscopio conectado a una cámara de video y a un computador.

Se designó el lecho vascular existente en la biopsia del día cero como un punto de referencia para la comparación con las biopsias del día siete y el día 14, para así determinar la existencia de variaciones en el área del lecho vascular. Se realizó un análisis descriptivo del lecho vascular.

#### **4.2.4. Análisis estadístico:**

Se realizó un Análisis de Varianza para determinar existencia de diferencias significativas entre las muestras, y una vez determinada su existencia, se realizó un test de Tukey para determinar entre que tiempos fueron significativas.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.**

Los casos incluidos en esta experiencia, correspondieron a pacientes caninos atendidos en el Servicio de Cirugía de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Tabla 1)

**TABLA 1. Casos Incluidos en el Ensayo. Reseña y Ubicación Anatómica del TVT.**

<b>Caso</b>	<b>Nombre</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Ubicación</b>
<b>1</b>	Blanquita	Hembra	10	Vagina
<b>2</b>	Chaina	Hembra	3	Vagina
<b>3</b>	Flaco	Macho	2	Vestíbulo bucal
<b>4</b>	Girándola	Macho	3	Pene
<b>5</b>	Memo	Macho	7	Pene
<b>6</b>	Ordinario	Macho	2	Pene

#### **5.1.1 Hemograma y Perfil Bioquímico de los Perros al Día Cero del Estudio.**

En las determinaciones realizadas en el control inicial, previo al tratamiento con talidomida, los 6 casos presentaron alguna alteración en el hemograma y el perfil bioquímico (Tabla 2).

**Tabla 2. Hemograma y Perfil Bioquímico al Día Cero del Estudio**

<b>Alteración</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Alteración</b>	<b>Nº de casos</b>
Anemia	2	Eosinopenia	0
Poliglobulia	1	Monocitopenia	0
Roulaux	0	Linfopenia	2
Leptocito	1	Trombocitopenia	1
Leucocitosis	0	Hipoalbuminemia	2
Neutrofilia	1	↑ Creatinina	0
Monocitosis	1	↑ Bilirrubina	2
Eosinofilia	0	↓ Fibrinogeno	3
Linfocitosis	0	↑ FA	0
Leucopenia	0	↑ NUS	1
Neutropenia	0		

### **5.1.2 Hemograma y Perfil Bioquímico al Día 14 del Estudio**

Una vez finalizado el tratamiento con talidomida, en los 6 casos se observó alguna alteración en el hemograma y el perfil bioquímico. La Tabla 3 muestra las alteraciones en los hemogramas de los casos que se trataron con talidomida y el numero de casos en que se presentó cada uno de ellos ( valores encontrados, mas valores normales de la especie, en anexo 3). La Tabla 4 muestra las alteraciones en el perfil bioquímico de los casos tratados y el número de casos en que se presentó cada una. ( valores encontrados, mas valores normales de la especie, en anexo 3).

**Tabla 3: Alteraciones de los Hemogramas. 14 días de tratamiento con Talidomida**

<b>Alteración</b>	<b>Nº de casos</b>
Leucocitosis	1
Monocitosis	1
Eosinofilia	1
Poliglobulia	1
Neutropenia	1
Anemia sin respuesta	1
Trombocitopenia	2
Linfopenia	1
Monocitopenia	1
Leucopenia	1
Leptocito	2

**Tabla 4 :Perfiles Bioquímicos. 14 días de tratamiento con Talidomida**

<b>Alteraciones</b>	<b>Nº de casos</b>
Hipoalbuminemia	1
↑ Creatinina	2
↓ Fibrinogeno	2
↑ FA	1
↑ NUS	1

En la tabla 5 se muestran las alteraciones presentes en los hemogramas y perfiles bioquímicos en todos los casos estudiados.

**Tabla 5 : Alteraciones de Hemogramas y Perfiles en los casos estudiados.**

<b>Caso</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Alteración</b>						
<b>Leucocitosis</b>	<b>x</b>					
<b>Monocitosis</b>	<b>x</b>			<b>x</b>		
<b>Poliglobulia</b>		<b>x</b>				
<b>Neutropenia</b>		<b>x</b>				
<b>Anemia</b>			<b>x</b>			
<b>Trombocitopenia</b>			<b>x</b>	<b>x</b>		
<b>Linfopenia</b>						<b>x</b>
<b>Leucopenia</b>					<b>x</b>	
<b>Leptocito</b>	<b>x</b>					<b>x</b>
<b>Hipoalbuminemia</b>	<b>x</b>					
<b>↑ Creatinina</b>			<b>x</b>		<b>x</b>	
<b>↓ Fibrinogeno</b>	<b>x</b>		<b>x</b>			
<b>↑ FA</b>		<b>x</b>				
<b>↑ NUS</b>			<b>x</b>			

## **5.2 EFECTOS SECUNDARIOS**

No se presentó ninguno de los efectos secundarios de tipo no hematológico que describen los estudios hechos en humanos ( El anexo 2 muestra los efectos secundarios de mayor ocurrencia en estudios humanos). Como los efectos secundarios de la talidomida, son inmediatos, en el transcurso de los 14 días de este estudio se habrían detectado de haber afectado a alguno de los pacientes sometidos a terapia.

## **5.3 DESCRIPCION DEL LECHO VASCULAR**

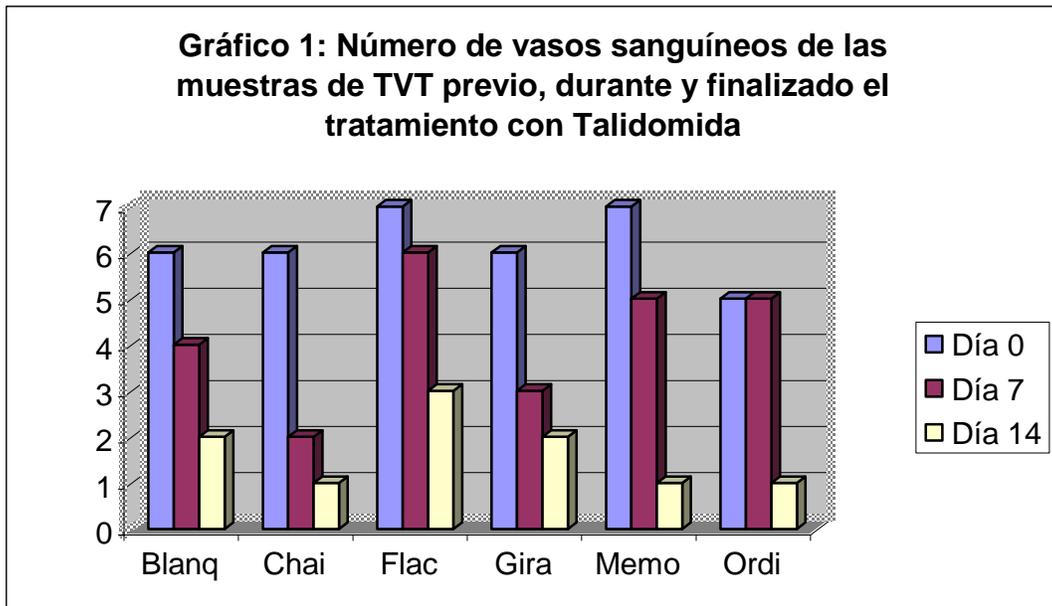
### **Estudio de Biopsias en Preparados Histológicos Teñidos con Hematoxilina Eosina.**

Al día cero del estudio, es decir, biopsia diagnóstica, previa al tratamiento con Talidomida, se observó que los tipos de vasos sanguíneos presentes eran capilares, arteriolas y vénulas, sin predominio de un tipo sobre otro (figura 1), todos con una cantidad importante de glóbulos rojos en su interior, identificados por su morfología y color (figura 2). Se observan brotes endoteliales, que corresponden a células endoteliales que emergen y se ordenan para dar origen a nuevos vasos sanguíneos (figura3). A los 14 días bajo tratamiento con Talidomida, los mismos tipos de vasos sanguíneos, tienen una distribución similar, pero ya no se encuentran distendidos debido a la escasa o nula presencia de glóbulos rojos en su interior (figura 4). El número de vasos sanguíneos presentes en las muestras previas al tratamiento fue notoriamente mayor que los que se presentaron posterior a dos semanas de tratamiento con Talidomida (figuras 5 y 6).

El recuento de los vasos sanguíneos al tiempo 0, a los 7 y 14 días de tratamiento con talidomida se resume en la Tabla 6 (Grafico1); el área del lecho vascular, en micrómetros cuadrados ( $\mu^2$ ) observada al día 0, 7, y 14, se muestra en la Tabla 7 (Grafico 2).

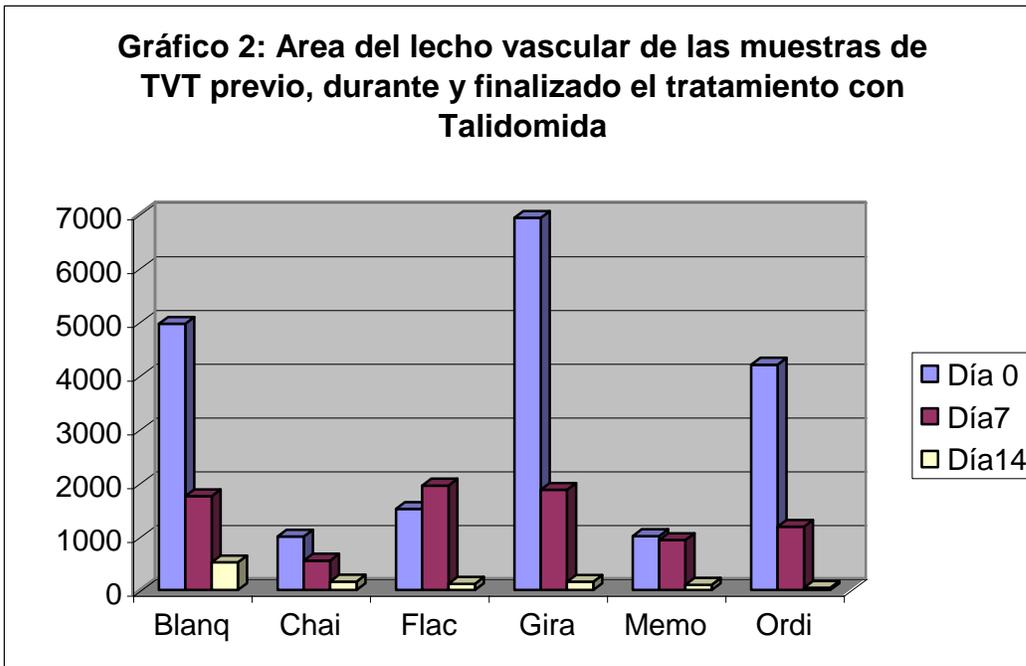
**Tabla 6 : Número de vasos sanguíneos observados por muestra al día 0, 7, y 14 .**

	1	2	3	4	5	6
<b>Día 0</b>	6	6	7	6	7	5
<b>Día 7</b>	4	2	6	3	5	5
<b>Día 14</b>	2	1	3	2	1	1

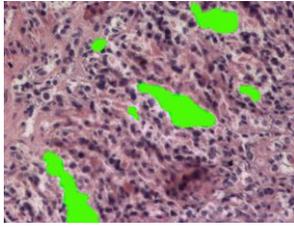


**Tabla 5: Áreas vasculares observadas al día 0, 7, y 14 del estudio medidas en  $\mu^2$**

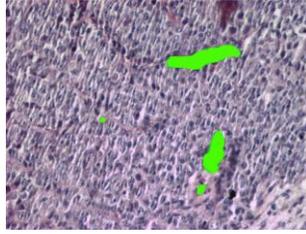
<b>Casos</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 14</b>
<b>1</b>	4950.9546	1744.7299	517.51917
<b>2</b>	995.70593	548.08716	158.82558
<b>3</b>	1510.4462	1944.8116	115.64554
<b>4</b>	6920.3486	1863.1544	154.12280
<b>5</b>	1004.3038	930.38177	98.171059
<b>6</b>	4190.8149	1178.4730	42.111221



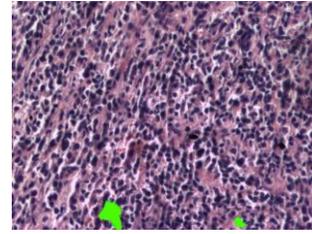
## 6. GALERIA DE IMÁGENES



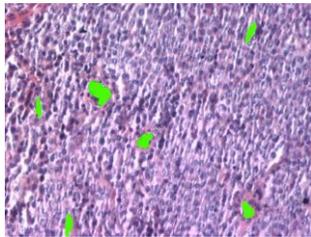
BLANQ\_0



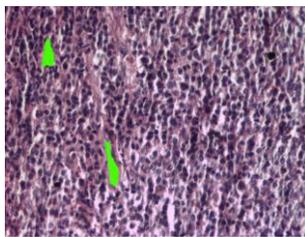
BLANQ\_7



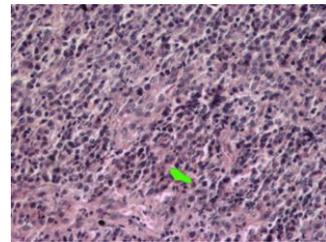
BLANQ\_14



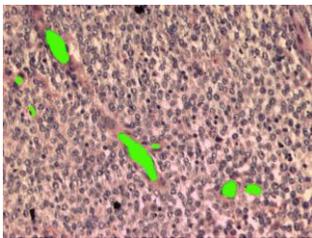
CHAI\_0



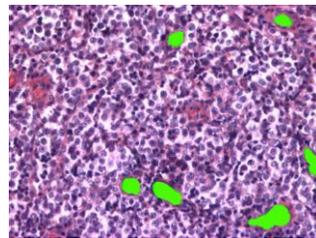
CHAI\_7



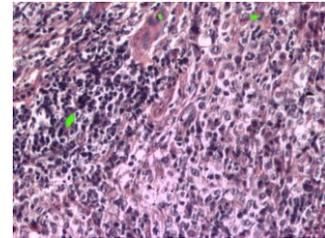
CHAI\_14



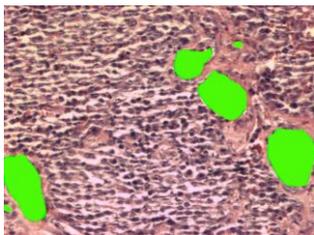
FLAC\_0



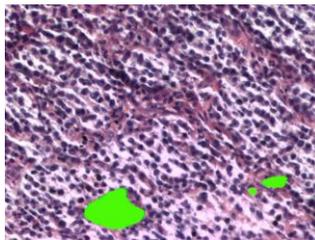
FLAC\_7



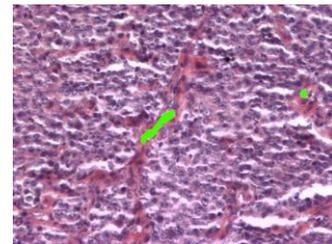
FLAC\_14



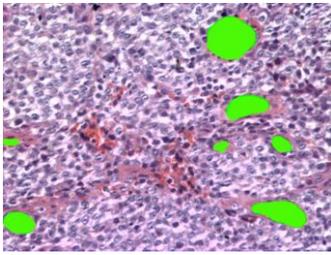
GIRA\_0



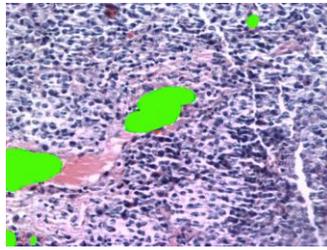
GIRA\_7



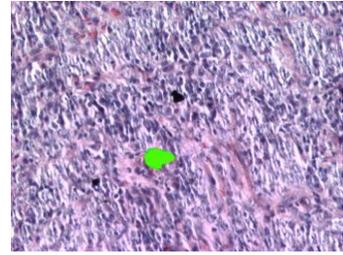
GIRA\_14



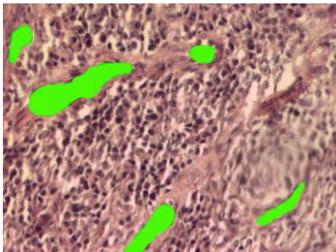
MEMO\_0



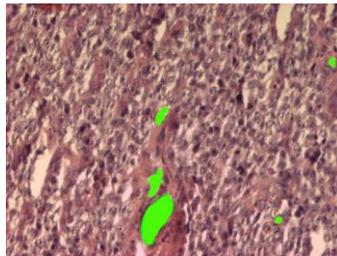
MEMO\_7



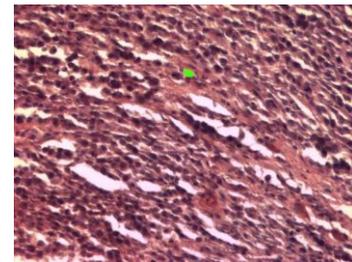
MEMO\_14



ORDI\_0



ORDI\_7



ORDI\_14

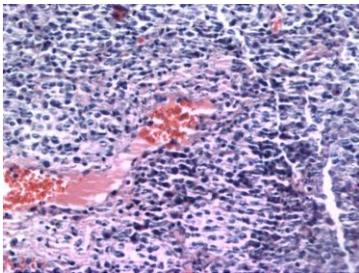


Figura 1

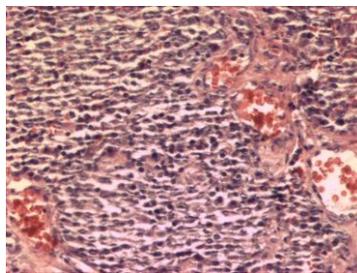


Figura 2

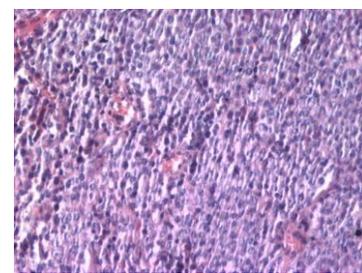


Figura 3

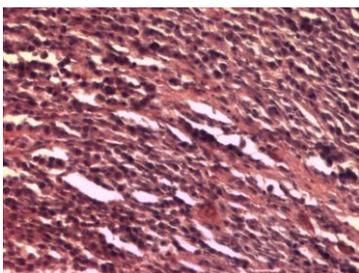


Figura 4

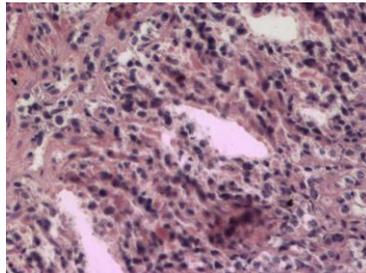


Figura 5

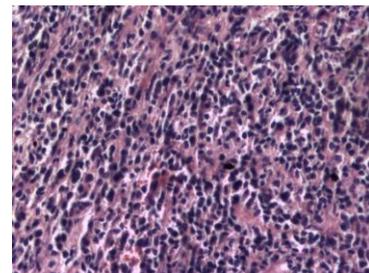


Figura 6

## **7. DISCUSION**

### **7.1 Efectos de la terapia con Talidomida en los componentes sanguíneos**

Para analizar las variaciones de los componentes sanguíneos es necesario partir de los valores obtenidos en el examen de control o basal. En la determinación al tiempo 0 se encontró en 3 de los pacientes el fibrinógeno disminuido, 2 casos de anemia, dos de linfopenia y dos de hipoalbuminemia. El fibrinógeno disminuido se observa en presencia de alguna alteración hepática, sin embargo, en ninguno de los tres casos en los cuales se presentó, hubo otras evidencias que orientaran a sospechar de dicho tipo de patología. Su disminución podría explicarse no por una alteración hepática relevante, sino más bien por la función que cumple el fibrinógeno de transformarse a fibrina y participar en el proceso de la coagulación. Los pacientes ingresados al estudio estaban en la fase progresiva del tumor, es decir, en una etapa muy sangrante, por lo tanto, la disminución del fibrinógeno a nivel sanguíneo, se pudo deber a su uso a nivel del tejido afectado por el tumor compuesto de vasos sangrantes. En relación a la anemia al momento de diagnóstico, con VGA de 33 y fracción, y una hemoglobina sobre 11g/dl. acompañada de niveles normales de células jóvenes, y ausencia de signología asociada a otro tipo de patología, pudo haber sido el reflejo en el hemograma de la marcada hemorragia con una pérdida de sangre entera muy evidente a simple vista, que acompañaba el tumor. La linfopenia se observa cuando hay una baja producción de estas células por parte del individuo, o por una destrucción masiva de estas en un caso de infección viral leve. Ninguno de los pacientes que presentaron esta alteración en las mediciones basales, mostró además, signos compatibles con alguno de estos posibles orígenes. La hipoalbuminemia en general se asocia a un consumo proteico

bajo, a una mala absorción de proteínas a nivel del tracto intestinal, o a una alteración en el funcionamiento hepático. En los 2 casos observados no había evidencias de compromiso hepático, solo coincidían con anemia, y proteínas plasmáticas en el límite inferior del rango normal, siendo además dos caninos vagabundos, portadores de TVT, recogidos de la calle y adoptados, en condiciones nutricionales deficientes.

Existen muy pocos estudios que determinen el mecanismo de acción por el cual la Talidomida provoca efectos en los componentes sanguíneos, sin embargo se ha comunicado la aparición de ciertos efectos secundarios como son la neutropenia, leucopenia, aumento de enzimas hepáticas e hipoglicemia ( Dimopoulos, *et al.*, 2004; Cappa, *et al.*, 2004 ). Una vez finalizado el tratamiento con talidomida, los 6 casos presentaron alguna alteración en el hemograma. Las alteraciones más frecuentes fueron trombocitopenia y presencia de leptocitos, ambas en dos casos. Estas manifestaciones son propias del sangrado constante, con pérdida de plaquetas asociada a la hemorragia, que es, en estos casos, un síntoma típico del TVT. Los leptocitos corresponden a una alteración en la estructura del eritrocito, los glóbulos rojos muestran la hemoglobina concentrada en el centro de la célula, y no en toda la superficie de éste; manifestación de una alteración a nivel hepático. Los pacientes con leptocitos en su hemograma, no evidenciaron signos clínicos ni en el perfil bioquímico, que pudieran asociarse a una causa hepática.

En este ensayo clínico hubo 4 casos que presentaron alguna alteración en el perfil bioquímico. Los más relevantes fueron alta creatinina y bajos niveles de fibrinógeno, ambos en dos de los casos estudiados, y ambos sólo al día 14 del estudio. La creatinina se eleva en casos de insuficiencia renal, reducción del flujo

sanguíneo, deshidratación, destrucción de tejido muscular, o un alto catabolismo proteico. La disminución en los niveles sanguíneos de fibrinógeno se puede deber a un funcionamiento hepático alterado, a coagulación intravascular diseminada, y desórdenes en la médula ósea. Los valores de creatinina elevados, muy cerca del rango normal, podrían atribuirse a un alto catabolismo proteico, por el ingreso a la fase regresiva del tumor, donde hay un recambio del tejido normal por tejido conectivo. En relación a la disminución del fibrinógeno, no se puede dar una causa certera de esta alteración, ya que la principal causa conocida, alteración en el funcionamiento hepático, no encuentra respaldo en los perfiles de los pacientes afectados. Se presentaron también Hipoalbuminemia y NUS elevado, ambos en un solo caso, y a los días cero y 14 del estudio, es decir, al igual que las alteraciones anteriores, es una condición atribuible al estado del paciente al momento del diagnóstico y no al medicamento.

En este estudio, hubo alteraciones que se presentaron al día 14, sin haberlo hecho al día cero: sólo uno de los seis casos presentó neutropenia y prácticamente en los límites normales, lo que podría explicarse por una migración de los neutrófilos desde sangre a los tejidos periféricos. Así mismo, un solo caso presentó leucopenia al día 14, también a nivel casi del límite normal, posiblemente por una migración de las células desde la sangre a otros tejidos, un mecanismo de protección del individuo.

La hipoglicemia descrita para el humano no se presentó en ninguno de los casos estudiados.

Otros efectos descritos en la literatura que aparecieron en este estudio al día 14, fueron leucocitosis y poliglobulia, sin embargo, sus valores tan cercanos a los

normales hacen improbable atribuirlos a una alteración directa por parte de la droga. Tanto Monocitosis como linfopenia que se presentaron al día 14, estaban presentes al día cero, por lo que se puede inferir que se trató de una condición propia del paciente y no una consecuencia de la droga. Dos casos presentaron Trombocitopenia al día 14; en uno la alteración estaba presente el día 0, al momento del diagnóstico, al recuento al día 7 su valor fue normal, y a los 14 días volvió a bajar. El segundo caso correspondió a uno de los caninos con anemia al inicio; y en el apareció la trombocitopenia a los 14 días, recuperada posteriormente. La presencia de Leptocitos, al día cero y 14 ocurrió en el segundo caso de anemia, paciente recogida de la calle, en la cual persistió la presencia de leptocitos a lo largo del tratamiento. Un segundo caso presentó leptocitos solo en el día 14. Con los antecedentes existentes y por el patrón de presentación de ambas alteraciones en esta serie clínica no es posible elaborar una explicación fundamentada de su aparición, ni atribuirlos a efectos del fármaco administrado.

## **7.2 Efectos secundarios de tipo no hematológico**

Existen efectos secundarios de tipo no hematológico, observados en los estudios de terapias con talidomida. El principal y más relevante es la teratogenicidad. Esta se puede ver en pacientes humanos con una dosis única de 100 mg totales, ( Dimopoulos, *et al*, 2004), siendo la más frecuente de las malformaciones la ausencia o hipoplasia de los miembros, puede también producir alteraciones en oídos, ojos y corazón. En este estudio, se determinó la ausencia de gestación de las hembras, a fin de evitar este efecto.

Otro efecto secundario reconocido, en estudios con pacientes humanos, es la neuropatía periférica ( Dimopoulos et al, 2004, Franks et al, 2004, Cappa et al, 2004, Kumar et al, 2004) principalmente en administraciones prolongadas. Este efecto estaría determinado por un daño axonal, con pérdida de fibras nerviosas mielinizadas y aumento de las no mielinizadas ( Dimopoulos *et al*, 2004). En este estudio no se evidenció ninguna signología, en ninguno de los pacientes, que pudiera estar relacionada con una neuropatía periférica. Tampoco se presentaron signos como decaimiento, fiebre, emésis, o constipación.

### **7.3 Análisis Histológico Descriptivo del Lecho Vascular**

#### **Recuento de los vasos sanguíneos**

El número de vasos sanguíneos presentes en las muestras al control diagnóstico o basal (figura 5) fue notoriamente mayor que los que se observaron posterior a dos semanas de tratamiento con Talidomida ( figura 6 ).

En relación al recuento del número de vasos sanguíneos presentes en cada muestra ( graficos 1 y 2), al realizar un análisis de la varianza, resultó un p de 0,0001. Y al ser sometido al test de Tukey, el número de vasos sanguíneos fue estadísticamente diferente a los días cero, siete, y 14 del estudio.

#### **Análisis descriptivo del lecho vascular**

El área promedio de todos los cortes previos al tratamiento, fue de 3262.0953  $\mu^2$ . La mayor área la presentó el caso 4 con 6920.3486  $\mu^2$ , y la menor el caso 2 con 995.70593  $\mu^2$ . El promedio de área del día 7 fue 1368.2729  $\mu^2$ , la mayor área la presentó el caso 3 con 1944.8116  $\mu^2$  y la menor el caso 2 con 548.08716  $\mu^2$ . El

promedio del área al día 14 fue de  $181.06588 \mu^2$ , la mayor área la presentó el caso 1 con  $517.51917 \mu^2$ , y la menor el caso 6 con  $42.111221 \mu^2$ .

La disminución promedio del área de todos los casos entre el día 0 y 7 fue de 58.06%; entre el día 7 y 14 la disminución fue de 86.77% y entre el día 0 y el 14 alcanzó a 94.45%. Al considerar los casos en forma individual, el caso con mayor disminución de área entre el día 0 y 7 fue el caso 4 con un 73.08 %. La mayor disminución entre el día 7 y 14, la presentó el caso 6 con un 96.43 %. Y la mayor disminución entre los días 0 y 14, la tuvo el caso 6 con un 99 %. Esta descripción es una forma objetiva de indicar la eficiencia de la talidomida para inhibir la irrigación

Una vez procesados los datos de las áreas vasculares medidas a los distintos tiempos predeterminados por el proyecto, mediante un análisis de varianza, se determinó que la disminución de estas fue significativa , con un valor de  $p= 0,0081$  (  $p \leq 0,05$  es significativo). Al ser sometidos los datos a un test de Tukey, este mostró que las áreas al día cero no son estadísticamente diferentes de las áreas del día siete, así mismo como tampoco lo son entre el día siete y el 14 de estudio. Sin embargo, si lo son entre los días cero y 14 del estudio.

Se puede deducir, entonces, que si bien existe una disminución en el área, ésta es importante en periodos prolongados de tratamiento. Esta disminución lenta en relación a terapias antineoplásicas tradicionales, puede deberse a que las drogas antiangiogénicas, bloquean la neovascularización mediante interrupción de la proliferación y migración de células endoteliales, pero no de las célula tumorales. Además, la literatura indica ( Carmeliet y Jain, 2000, Folkman, 2001 ), que tumores menores a 1 o 2 mm de diámetro

pueden sobrevivir sin aporte de nuevos vasos sanguíneos, y sería difícil eliminar estas células tumorales sólo con la terapia antiangiogénica.

Por estas mismas razones, las drogas antiangiogénicas deberían ser indicadas como terapia complementaria a terapias antineoplásicas tradicionales como la quimioterapia o la radiación.

## **8. CONCLUSIONES**

- ✓ La Talidomida administrada en dosis de 8 mg/Kg de PC disminuyó significativamente la actividad angiogénica en el TVT canino de ocurrencia natural.
- ✓ El efecto antiangiogénico de la Talidomida se manifestó tanto a nivel de área vascular como en el número de vasos sanguíneos en el TVT canino de presentación natural.
- ✓ La Talidomida, en la dosis y el lapso de tiempo administrada, no produjo efectos clínicos secundarios en los pacientes. Sin embargo su uso prolongado o en mayores dosis, requeriría de evaluaciones permanentes para monitorear la aparición de efectos secundarios indeseables.
- ✓ El uso de tinciones simples como hematoxilina- eosina, asociado al análisis morfométrico a través de un programa computacional, resultó ser una metodología fácil, rápida, objetiva y confiable para la evaluación de la actividad angiogénica del TVT canino de ocurrencia natural.

## 9. Anexos

### Anexo 1: Esquema de procedimientos

Día 0	Días 1 a 7		Días 8 a 14	
1 <sup>era</sup> biopsia 1 <sup>er</sup> Hemograma y Perfil Bioquímico		Día 7 2 <sup>da</sup> biopsia		Día 14 3 <sup>era</sup> biopsia 2 <sup>do</sup> Hemo grama y Perfil Bioquím ico

Nota: las aplicaciones de Vincristina continúan hasta la remisión completa del tumor.

**Anexo 2:** Efectos secundarios esperados según Dimopoulos et al, Franks et al, Cappa et al y kumar et al)

<b>Efecto</b>
Decaimiento
Constipación
Neuropatía periférica
Emesis
Fiebre
Leucopenia
Neutropenia
Aumento enzimas hepáticas
Hipoglicemia

**Anexo 3** Alteraciones presentadas durante todo el periodo + valores normales

<b>Caso</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Valores normales</b>
<b>Alteración</b>							
<b>Leucocitosis</b>	<b>17250</b>						<b>6000- 17000</b>
<b>Neutrofilia</b>						<b>12338</b>	<b>3000- 11500</b>
<b>Monocitosis</b>	<b>2070</b>			<b>2009</b>			<b>150- 1350</b>
<b>Eosinofilia</b>							
<b>Linfocitosis</b>							
<b>Poliglobulia</b>		<b>18.3</b>				<b>18.3</b>	<b>12- 18</b>
<b>Neutropenia</b>		<b>2685</b>					<b>3000- 11500</b>
<b>Anemia sin respuesta</b>			<b>4050000</b>				<b>5500000- 8500000</b>
<b>Trombocitopenia</b>			<b>118000</b>	<b>174000</b>			<b>200000- 500000</b>
<b>Linfopenia</b>				<b>896</b>		<b>720</b>	<b>1000- 4800</b>
<b>Eosinopenia</b>							<b>100- 1250</b>
<b>Monocitopenia</b>							<b>150- 1350</b>
<b>Roulaux</b>	<b>x</b>						
<b>Leucopenia</b>					<b>7750</b>		<b>8000- 18000</b>
<b>Leptocito</b>	<b>x</b>					<b>x</b>	
<b>Hipoalbuminemia</b>	<b>1.7</b>		<b>2.4</b>				<b>2.6- 3.3</b>
<b>↑ Creatinina</b>			<b>1.9</b>		<b>1.7</b>		<b>0.5- 1.5</b>
<b>↑ Bilirrubina</b>		<b>0.6</b>	<b>0.8</b>				<b>0.1- 0.5</b>
<b>↓ Fibrinogeno</b>	<b>0.1</b>		<b>0.1</b>		<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2- 0.4</b>
<b>↑ FA</b>		<b>165</b>					<b>↓159</b>
<b>↑ NUS</b>			<b>34</b>				<b>10- 30</b>

**Anexo 4:** Alteraciones hemograma perfil al día 14

<b>Caso</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Valores normales</b>
<b>Alteración</b>							
<b>Leucocitosis</b>	<b>17250</b>						<b>6000- 17000</b>
<b>Neutrofilia</b>							<b>3000- 11500</b>
<b>Monocitosis</b>	<b>2070</b>			<b>2009</b>			<b>150- 1350</b>
<b>Eosinofilia</b>							
<b>Linfocitosis</b>							
<b>Poliglobulia</b>		<b>18.3</b>					<b>12- 18</b>
<b>Neutropenia</b>		<b>2685</b>					<b>3000- 11500</b>
<b>Anemia sin respuesta</b>			<b>4050000</b>				<b>5500000- 8500000</b>
<b>Trombocitopenia</b>			<b>118000</b>	<b>174000</b>			<b>200000- 500000</b>
<b>Linfopenia</b>						<b>720</b>	<b>1000- 4800</b>
<b>Eosinopenia</b>							<b>100- 1250</b>
<b>Monocitopenia</b>							<b>150- 1350</b>
<b>Roulaux</b>							
<b>Leucopenia</b>					<b>7750</b>		<b>8000- 18000</b>
<b>Leptocito</b>	<b>x</b>					<b>x</b>	
<b>Hipoalbuminemia</b>	<b>1.7</b>						<b>2.6- 3.3</b>
<b>↑ Creatinina</b>			<b>1.9</b>		<b>1.7</b>		<b>0.5- 1.5</b>
<b>↑ Bilirrubina</b>							<b>0.1- 0.5</b>
<b>↓ Fibrinogeno</b>	<b>0.1</b>		<b>0.1</b>				<b>0.2- 0.4</b>
<b>↑ FA</b>		<b>165</b>					<b>↓159</b>
<b>↑ NUS</b>			<b>34</b>				<b>10- 30</b>

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

- ALCOBA, A.** 2001. Estudio antigénico comparativo de células modificadas de TVT espontáneo canino provenientes de Chile y Argentina. Tesis Magíster. Santiago, Chile. Fac de Cs. Veterinarias y Pecuarias. U de Chile. Pág. 21.
- BOEHM, T., FOLKMAN, J., BROWDER, T., O' REILLY, M.**1997. Antiangiogenesis therapy of Experimental Cancer Does not Induce Acquired Drug Resistance. *Nature*, 390: 404-407.
- BREM, S.** 1999. Angiogénesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control J.*, 6(5): 436-459.
- CAPPA, F., MAGINI, G., ZAMBRUNI, A., BENDINI, C., SANTI, V., BERNARDI, M., TREVISANI, F.** 2004. Effects of the Combined Treatment with Thalidomide, Megestrol and Interleukine-2 in Cirrotic Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Digestive and Liver Disease*. 37: 254-259.
- CARMELIET, P., JAIN, R.** 2000. Angiogénesis in Cancer and Other Diseases. *Nature*, 407: 249– 257.
- CARRION, M.** 2001. Estatificación del TVT espontáneo y bajo tratamiento quimioterapéutico. Memoria de título. Santiago. Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Pág. 65.
- D'AMATO, R., LUGHMAN, M., FLYNN, E., FOULKMAN, J.** 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 4082-5.
- DEWHIRST M., W.; SIM D.A.** 1984. The utility of thermal dose as predictor of tumor and normal tissue responses to combined hyperthermia and radiation. *Cancer Research*; 44: 4772s

- DIMOPOULOS, M., ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU, V.** 2004. Adverse effects of Thalidomide administration in patients whit Neoplastic Diseases. *Am. J. Med.* 117: 508-515.
- DUARTE, M.** 2002. Indicadores de proliferación celular en TVT canino. Memoria de título. Santiago. Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Págs. 10- 57.
- FLORES, E., CATTANEO, G., GONZALEZ, C., LOMBARDI, C.** 1997. Chemotherapy In Transmissible Venereal Tumor(TVT) In Dogs. In: *Spontaneous Animal Tumors.* Edit. Lorenzo Rossi, Ralph Richardson, John Harshbargere. Italy. 399-402. (Fondecyt 1970194).
- FLORES, E., CATTANEO, G., GONZALEZ, C., CEPEDA, R.** 2000. TVT. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. Monografía de Medicina Veterinaria. Vol 20 (1): 82- 93.
- FOLKMAN, 1971, 2001.**
- FRANKS, M., MACPHERSON, G., FIGG, W.** 2004. Thalidomide. *The Lancet.* 363 :1802-1811.
- GONZÁLEZ, C., GRIFFEY, B., NAYDAN, D., FLORES, E., CATTANEO, G., MADEWELL, B.** 2000. Canine Transmissible Venereal Tumor: a Morphologic and Immunohistochemical study of 11 tumors in Growth phase and During Regression Following Chemotherapy. *Journal of Comparative Pathology.* 122 (4): 241-248.
- GRIFFIOEN, A., MOLEMA, G.** 2000. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Pharmacol.* 52(2): 237–268.

- HALEBY, A.** 2000. Estudio Epidemiológico descriptivo de los TVT caninos. Memoria de Título. Santiago. Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Pág. 65.
- KUMAR, S., WITZIG, T., RAJKUMAR, V.** 2004. Thalidomide: Current Role in the Treatment of Non-Plasma Cell Malignancies. *Journal of Clinical Oncology*. 22(12). Pags. 2477- 2488.
- LOMBARDI, C.** 1995. Evaluación del tratamiento quimioterapéutico con vincristina en la regresión del TVT canino espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral. Tesis Magíster, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U de Chile. Pág. 29.
- RAMOS, R.** 2004. “Actividad Anti-Angiogénica de Dexametasona en Tumor Venéreo Transmisible Canino” Memoria de título. Santiago. Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Págs 11- 19.
- ROGERS, K.** 1997. Transmissible Venereal Tumor. *The Compendium of Continuig Education*. 19(9): 1036-1045.
- VACCA A, RIBATTI D, RONCALI L.** 1995. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases: biological and clinical studies. *Leuk Lymph*. 20: 8 – 27.
- WELLER, R.** 1994. Complications of Anticancer Chemotherapy. In: Villouta, G.; Gonzáles, C. *Compendio del Curso Internacional de Oncología Veterinaria*. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Postgrado, Dpto. Patología Animal. Santiago, Chile. pp: 31-38.