UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

"Apoptosis celular en Tumor Venéreo Trasmisible canino tratado con Dexametasona"

GERARDO ANTONIO NÚÑEZ HERMOSILLA

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Departamento de Cs. Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: SRA. RAQUEL CEPEDA C.

FINANCIAMIENTO FONDECYT 1020980

SANTIAGO - CHILE.

2005

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

"Apoptosis celular en Tumor Venéreo Trasmisible canino tratado con Dexametasona"

GERARDO ANTONIO NÚÑEZ HERMOSILLA

Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Departamento de Cs. Biológicas Animales.

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: SRA. RAQUEL CEPEDA C.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: SR. MARCOS GALLEGUILLOS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: DRA. ESTEFANIA FLORES	.....	.....

SANTIAGO, CHILE
2005

INDICE

I. RESUMEN 1

II. SUMMARY 3

1. INTRODUCCIÓN 5

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 8

2.1 Generalidades de Apoptosis 8

2.2 Etapas de Apoptosis 9

2.2.1 Fase de Iniciación 9

2.2.2 Fase de Ejecución 9

2.2.3 Fase de Degradación 9

2.3 Vías de activación de apoptosis 11

2.3.1 Vía Extrínseca 13

2.3.2 Vía Intrínseca 16

2.4 Detección de apoptosis 19

2.5 Dexametasona 22

2.6 Tumor Venéreo Transmisible 26

2.6.1 Biología del T.V.T. 27

2.6.2 Origen y Etiología 29

2.6.3 Diagnostico 30

2.6.4 Tratamiento 31

2.6.5 Evolución Tumoral 33

3. HIPOTESIS 34

4. OBJETIVOS 34

4.1 Objetivo General 34

4.2 Objetivo Especifico 34

5. MATERIALES Y METODOS 35

5.1 Materiales 35

5.2 Métodos 36

6. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS 39

7. RESULTADOS 40

7.1. Descripción histopatológico del TVT en los diferentes días de tratamiento 40

7.2. Recuento de la actividad apoptótica 43

7.3. Recuento Diferencial 49

8. DISCUSION 51

9. CONCLUSION 58

10. BIBLIOGRAFIA 59

III. ANEXOS 71

I. RESUMEN

En el cáncer no solamente hay alteraciones a nivel de proliferación celular, sino también una supresión de la maquinaria apoptótica, lo cual permite la sobrevida de las células neoplásicas a pesar de las anormalidades génicas. Por esta razón, es de gran utilidad aplicar nuevos tratamientos que puedan inducir la actividad apoptótica en células alteradas.

Apoptosis o muerte celular programada, se refiere a una forma específica de muerte celular, por la cual células individuales son llevadas a experimentar autodestrucción sin provocar daño en las células vecinas. Ella juega un rol crítico en una amplia variedad de procesos fisiológicos que ocurren durante el desarrollo fetal y en tejidos adultos.

Con el objetivo de estudiar el efecto de ciertas drogas sobre la inducción de apoptosis se analizó el de la dexametasona. Para ello se utilizaron siete perros machos, sexualmente maduros, que presentaban tumor venéreo transmisible (TVT) de ubicación genital, a los que se les administró dexametasona durante 14 días, tiempo durante el cual, se obtuvieron biopsias previo, durante y posterior al tratamiento (día 0, 7, 17).

De las biopsias se obtuvieron muestras histológicas que fueron teñidas con Hematoxilina eosina y Van Gieson, para la descripción general del tumor, y con la técnica inmunohistoquímica de TUNEL (*terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling*) para detectar la presencia de apoptosis.

Para estudiar el comportamiento apoptótico del tumor, se realizó un recuento del área positiva a la inmunomarcación, mediante un análisis morfométrico (Image Pro – Plus, Media Cybernetics, USA). Además, se realizaron recuentos diferenciales de células inmunomarcadas para apoptosis.

En resumen se observó que a medida que transcurrían los días de tratamiento, se produjo un aumento significativo del área positiva a inmunomarcación para apoptosis; y al recuento diferencial las células tumorales fueron las que en mayor proporción resultaron positivas para apoptosis.

II. SUMMARY

In cancer there are not only alterations at the level of cellular proliferation, but also a suppression of the apoptotic machinery that allows neoplasic cell survival, in despite of gene abnormalities. Therefore, it is useful to apply new treatments which can induce apoptotic activity in transformed cells.

Apoptosis or programmed cellular death, is a specific form of cellular death, by which individual cells are induced to commit self-destruction without causing damage to adjacent cells. It plays a fundamental role in a wide variety of physiological processes during fetal development and in adult tissues.

In order to study the effect of certain drugs on apoptosis induction, the effect of dexamethasone was analyzed in seven sexually mature male dogs with genital transmissible venereal tumor (TVT). This drug was administered to them during 14 days, and biopsies were taken previous, during and later to the treatment (day 0, 7^{th} and 17^{th}).

From the biopsy procedures, histologic biopsies samples were taken and processed with Hematoxiline-Eosine stain (HE) and with Van Gieson stain, to obtain a general description of the tumor, and they were also stained with the TUNEL immunohistochemical technique (terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling), in order to detect apoptosis presence.

To study the tumor's apoptotic behavior, a count of the immunostain-positive area was made, by means of a morphometric analysis (Image Pro - Extra, Media Cybernetics, The USA). In addition, differentials counts were made of immunostain cells for apoptosis.

Concluding, it was observed that as the days of treatment passed, a significant increase of the immunostain-positive area for apoptosis took place, and at the differential count, it was found that tumor cells were the ones that were positive for apoptosis in greater proportion.

1. INTRODUCCION

La Medicina Veterinaria de pequeños animales ha experimentado un gran desarrollo en estos últimos años, dentro del cual se puede mencionar a la oncología veterinaria, siendo su principal objetivo mejorar la calidad de vida del paciente.

En la actualidad la terapia anticancerosa utiliza varias modalidades, entre las que se pueden mencionar la cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia e hipertermia.

En respuesta a estas mayores demandas por parte de los dueños de mascotas, se está investigando sobre una serie de drogas con efecto antineoplásico, entre las cuales se puede mencionar a la dexametasona. Esta droga tiene la ventaja de no ser tan tóxica como la mayoría de las drogas que normalmente son usadas como quimioterapia.

En el cáncer no solamente hay alteraciones a nivel de proliferación celular, sino también en las vías apoptóticas permitiendo la sobrevida de las células neoplásicas a pesar de las anormalidades génicas. Por esta razón, es de gran utilidad aplicar nuevos tratamientos que puedan inducir la actividad apoptótica.

La principal razón por la cual muchos científicos e investigadores han estudiado en detalle el proceso de apoptosis, es por que éste es un proceso que está marcadamente influenciado tanto positiva como negativamente por una amplia variedad de genes, muchos de los cuales están mutados o mal regulado en los canceres humanos.

La apoptosis es la muerte celular programada y está implicada en un amplio rango de procesos homeostáticos, desde la embriogénesis hasta los tejidos adultos, mediante este proceso se eliminan células del huésped, que ya no son necesarias, a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos intracelulares.

La detección *in situ* de las células que están experimentando apoptosis es difícil por medio de microscopia de luz, ya que la apariencia celular apoptótica, se limita a unos pocos minutos y los cuerpos apoptóticos pueden ser visualizados sólo unas pocas horas antes de que sean fagocitados.

La fragmentación del DNA está directamente asociada con los cambios ultra estructurales en la morfología celular apoptótica. Esta fragmentación, se puede detectar mediante el ensayo de TUNEL (*terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling*).

Por lo tanto con esta técnica se pueden detectar estados tempranos de apoptosis, donde la condensación de la cromatina ha comenzado y los fragmentos de DNA son pocos, e incluso antes de que el núcleo experimente los principales cambios morfológicos.

El interés de este trabajo consiste en determinar el comportamiento apoptótico inducido por el tratamiento con dexametasona, en un modelo neoplásico.

Para lograr este objetivo se utilizó el Tumor Venéreo Transmisible (TVT), el cual es la segunda neoplásia de mayor incidencia en caninos adultos de zonas urbanas de la Región Metropolitana (Chile).

La transmisión de este tumor ocurre de forma natural, por implantación de células libres entre individuos de la familia **Canidae.** Presenta un crecimiento rápido y sostenido, y generalmente, de fácil remisión con tratamiento quimioterapéutico.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Generalidades de Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada se refiere a una forma específica de muerte celular; es un proceso activo, complejo y altamente regulado por el cual células individuales son llevadas a experimentar autodestrucción de una forma en la cual no dañan a las células vecinas (Soini *et al.*,1998). Además, este proceso juega un rol crítico en una amplia variedad de procesos fisiológicos durante el desarrollo fetal y en tejidos adultos.

Se ha descrito que defectos en la regulación de apoptosis contribuyen al desarrollo de múltiples enfermedades (Reed, 2000), tales como desordenes neurodegenerativos e inmunodeficiencia en los cuales hay una sobre estimulación de apoptosis. Por otra parte, hay otras patologías donde existe supresión de la maquinaria apoptótica, como en el caso del cáncer y enfermedades autoinmunes (Sjöström y Bergh, 2001).

Los procesos morfológicos visualizados en células que experimentan apoptosis son los siguientes: constricción celular, condensación de la cromatina, formación de vesículas citoplásmicas o cuerpos apoptóticos y fagocitosis de células (Kerr *et al.*, 1994; Renehan *et al*., 2001).

Las modificaciones bioquímicas más relevantes son la fragmentación de las proteínas del citoesqueleto y matriz nuclear, enlaces cruzados entre las proteínas, fragmentación del DNA y reconocimiento fagocitario (Cotran *et al.*, 2000). Numerosos

investigadores han clasificado la apoptosis en tres etapas: fase de iniciación, de ejecución y de degradación (Soini *et al.*,1998; Renehan *et al.*, 2001).

2.2. Etapas de apoptosis

2.2.1. Fase de iniciación

Diversos estímulos pueden activar el proceso apoptótico, entre los cuales están: drogas antineoplásicas, radiación gama y ultravioleta, privación de factores de sobrevida tales como Interleuquina 1 (IL-1) (Renehan *et al.*, 2001), calor, desbalance osmótico, aumento de la concentración de calcio, óxido nítrico y exposición a glucocorticoides, específicamente en timocitos (Soini *et al.*, 1998).

2.2.2. Fase de ejecución

Es la etapa donde se activa la maquinaria apoptótica, esta fase aún es reversible. Los estímulos generan señales que se dirigen hacia moléculas reguladoras de apoptosis intracelulares, ya sea en forma directa o a través de receptores de membrana plasmática (Cotran *et al.*, 2000).

2.2.3. Fase de degradación

Es el punto de no retorno, en esta etapa las células apoptóticas son reconocidas precozmente por macrófagos y células adyacentes debido a la expresión en la membrana

celular de fosfatidilserina o trombospondina (glucoproteína), y de esta manera se produce el reconocimiento para que se lleve a cabo la fagocitosis (Cotran *et al.,* 2000). En todo este proceso se mantiene intacta tanto la membrana celular como la de los cuerpos apoptóticos, y por ende, las enzimas lisosomales no son liberadas al tejido circundante por lo que no hay una respuesta inflamatoria asociada a este proceso (Kerr *et al.*,1994). Además, la apoptosis afecta sólo a algunas pocas células, a diferencia de la necrosis, considerada un fenómeno pasivo y poco regulado, que conduce a la destrucción de un gran número de células en una misma área (Soini *et al.*,1998).

El mecanismo que marca la diferencia entre apoptosis y necrosis, es que en esta última, se produce ruptura celular, lo que conlleva a la liberación de enzimas lisosomales estimulando un proceso inflamatorio. También existen diferencias morfológicas, ya que en necrosis, la cromatina está irregularmente distribuida en grupos y no hay fragmentación nuclear ni formación de cuerpos apoptóticos (Soini *et al.*,1998).

Aunque apoptosis y necrosis presentan esas diferencias, tienen mecanismos relacionados:

i) *in vitro,* ciertos estímulos son apoptóticos a bajas dosis, pero causan necrosis cuando se presentan en altas dosis.

ii) Muchos estímulos tales como *shock* térmico, hipoxia, virus, radiación, pueden inducir ambos procesos.

iii) en un mismo tejido, las grandes áreas de necrosis están rodeadas por una zona de células apoptóticas, sugiriendo que hay asociación entre estos fenómenos (Soini *et al.,* 1998).

Múltiples estudios han demostrado que los cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis, están relacionado con una serie de proteínas denominadas Caspasas (Thornberry y Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000).

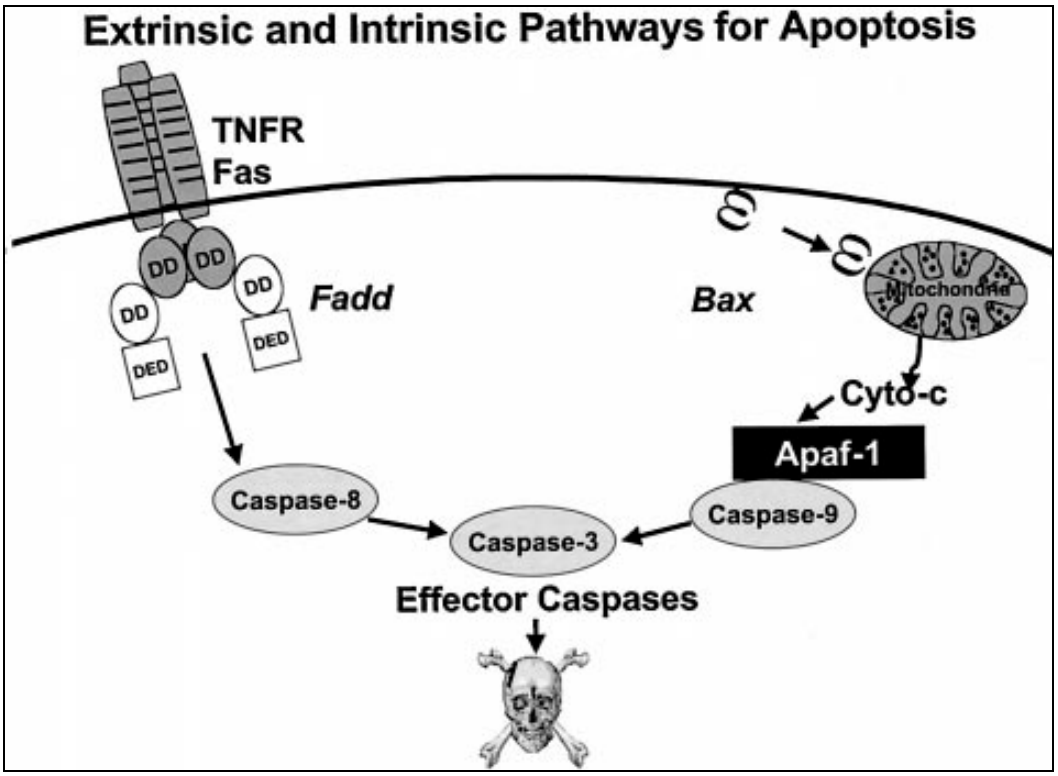
Las caspasas son cisteín - proteasas capaces de fragmentar residuos del ácido aspártico (Thornberry y Lazebnik, 1998). En humanos y en ratas, se han identificado aproximadamente 14 caspasas, y desde un punto de vista funcional se pueden clasificar en iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras corresponden a las caspasas 8 y 9, cuya principal función es la de activar la cascada de caspasas efectoras, las cuales corresponden a las caspasas 3 – 6 – 7, las que a su vez son responsable de los cambios celulares apoptóticos (Mehmet, 2000).

2.3. Vías de activación de Apoptosis

Aunque existen muchas vías de activación de las caspasas, sólo dos han sido estudiadas en detalle:

- La vía extrínseca está mediada por receptores de superficie celular de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), también denominados receptores de muerte. (Fig.1)
- La vía intrínseca que involucra la participación de mitocondrias, las cuales liberan sustancias activadoras de caspasas en el citosol, induciendo muerte celular programada (Fig.1), (Reed, 2000).

Figura 1



Esquema representando vías Intrínseca y extrínseca

de activación de apoptosis (Reed, 2000).

2.3.1. *Vía extrínseca*

Esta vía activa principalmente a la caspasa – 8, la que a su vez activa la cascada de caspasas que culminan con la muerte celular (Reed, 1999; Reed, 2000). Participan varios receptores de la familia TNF, que incluyen TNF-R1 (p55), Fas (CD95 o apo1), DR3, DR4, DR5 Y CAR-1, los cuales transmiten las señales apoptóticas iniciadas por ligandos específicos para ellos (Ashkenazi y Dixit, 1998). Estos receptores poseen un dominio citosólico denominado dominio de muerte (DD), el cual es capaz de unirse a otras proteínas que contengan dominios de muerte.

FADD es una proteína adaptadora (*Fas – associated death domain*) que posee tanto un DD como un dominio efector de muerte (DED). Esta proteína tiene como función conectar a los receptores de la familia del TNF, con las caspasas, esto se realiza mediante la unión de su dominio de muerte al DD del receptor, y a la unión de su DED con el dominio efector de muerte contenido en las caspasas (Fig. 2a), (Ashkenazi y Dixit, 1998; Reed 2000).

Sin embargo los receptores de la familia TNF no siempre están involucrados en la activación de caspasas o la inducción de apoptosis. Una de estos es la activación del factor nuclear NF-κB, el cual favorece la supervivencia celular, suprimiendo la activación del proceso apoptótico (Reed 2000). NF-κB en su estado inactivo está secuestrado en el citoplasma ligado a su inhibidor específico IκB. Este factor nuclear se activa por medio de señales extracelulares que inducen la fosforilación del inhibidor y la liberación de factor nuclear (Fenwick *et al.*,2000).

Uno de los receptores de la familia TNF que induce la transcripción de NF-κB, es el TNFR1. En este caso, la proteína adaptadora se denomina TRADD (*TNFR – associated death domain*), la que se une a una proteína específica (RIP), que lleva como resultado la activación de quinasas que inducen la degradación de IκB, y por esto la liberación de NF-κB (Askenazi y Dixit, 1998) (Fig. 2b). La activación de este factor de trascripción estimula variadas vías que bloquean apoptosis, dentro de las que se puede mencionar a los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y a miembros de la familia IAP (Reed 2000). IAP es una proteína perteneciente a la familia de proteínas supresoras de apoptosis, éstas se unen e inhiben a las caspasas activadas 3 – 7 – 9 (Messmer *et al.*, 2001). Además, se ha informado que IAP en humanos pueden detener la apoptosis inducida, tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca, ya que actúa sobre caspasas que son comunes en ambas vías (Reed, 2000).

La doble función de TRADD como activador de caspasa mediante FADD, y la activación de NF-κB por medio de RIP, genera que muchos de los receptores de TNF anulen su propia actividad inductora de apoptosis (Reed 2000).

Figura 2a.

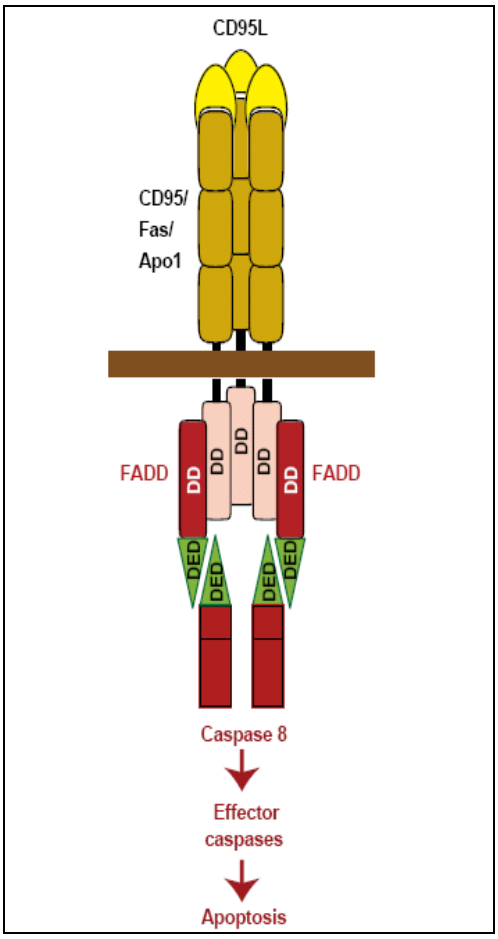
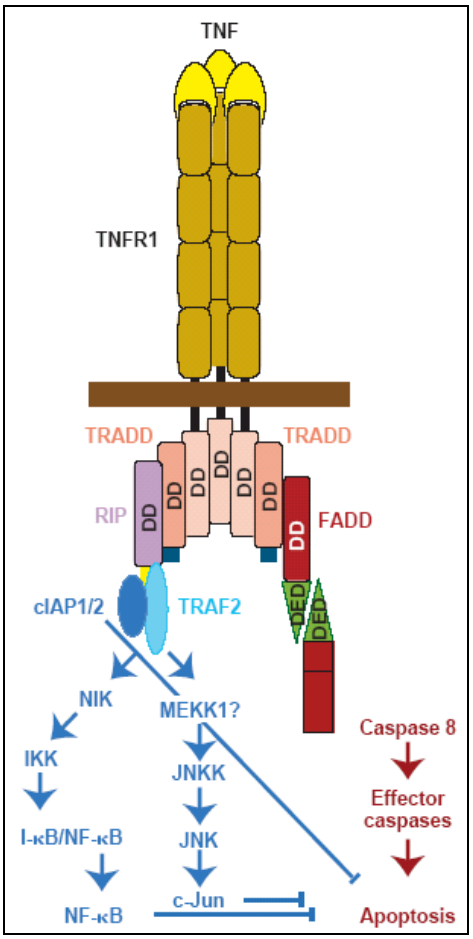


Figura 2b.



Esquema representando (**a**) activación de proceso apoptótico mediante receptores familia TNF/ FADD. (**b**) inhibición de proceso apoptótico mediante receptores familia TNF/TRADD. (Ashkenazi y Dixit, 1998)

2.3.2. *Vía Intrínseca o mitocondrial.*

Esta vía es gobernada por proteínas de la familia Bcl-2, y en humanos se han descrito aproximadamente 20 miembros de esta familia (Reed 2000). Bcl-2 incluye miembros pro-apoptóticos (bax, bak, bcl-xS, bad, bid, bik, Hrk) y miembros anti-apoptóticos (bcl-2, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1 y A1), muchos de los cuales se ubican en membranas mitocondriales externas, retículo endoplásmico y núcleos (Soini *et al.*, 1998; Sheikh y Fornace, 2000). En mitocondrias algunos miembros Bcl-2, forman poros y actúan como canales iónicos (Hirsch *et al.*, 1997) y frente a estímulos que inducen apoptosis, se produce una perdida del potencial de membrana y por ende la liberación de sustancias activadoras de caspasas (Soini *et al.*, 1998). Una de éstas es el citocromo c, el que al ser liberado al citosol, se une y activa al factor de activación de proteasas APAF-1, que posee un dominio terminal denominado dominio de reclutamiento de caspasas, que media la interacción con caspasa – 9, la cual a su vez estimula la cascada de proteasas que conducen a la muerte celular (Fig.3) (Green y Reed, 1998; Adams y Cory, 1998).

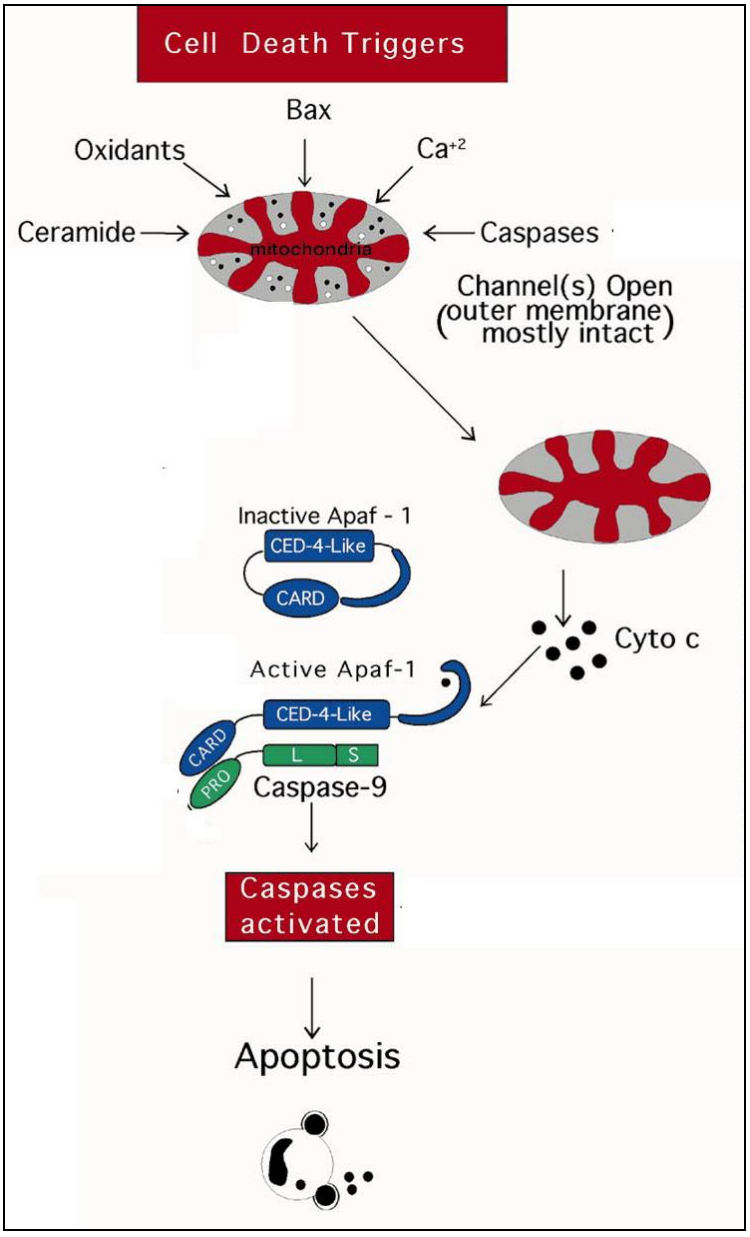
Por otra parte, el rol regulador de los miembros anti - apoptóticos es neutralizar la salida de moléculas hacia el citosol (Soini *et al.*, 1998), y también actuar como proteínas fijadoras, bloqueando la acción de proteínas citosólicas activadoras de caspasas, como APAF-1 (Cotran *et al.*, 2000). (Fig.3)

Estudios realizados *in vitro* por Sheikh y Fornace (2000) han informado que la inducción de apoptosis también puede ser a través de la regulación del gen de supresión tumoral p53, el cual actúa por medio de dos mecanismos: deteniendo el ciclo celular (Fase G1), y si no se logra la reparación del DNA, induce la activación de genes promotores de apoptosis (Cotran *et al.*, 2000; Sjöström y Bergh, 2001).

p53 induce la expresión de múltiples genes que están implicados en el control de apoptosis, entre estos, a genes de la familia Bcl-2, activando la regulación positiva de bax e inhibiendo los miembros bcl-2 anti-apoptóticos (Sheikh y Fornace, 2000). También se debe considerar que bax puede inducir apoptosis mediante la regulación del gen p53, además de promover la apertura de canales iónicos mitocondriales, como se mencionó anteriormente. Además, p53 puede regular positivamente a DR5, el cual es un receptor de la familia TNF, que induce apoptosis (Soini *et al.*, 1998).

Hay que considerar que cuando el gen p53 sufre mutaciones o está ausente, los mecanismos reparativos del DNA, así como aquellos que promueven la apoptosis celular, no pueden ser llevados a cabo favoreciendo la supervivencia celular, por lo tanto esto se asocia con estados neoplásicos avanzados y con mal pronóstico para los pacientes (Brown y Wouters, 1999; Lowe y Lin, 2000).

Figura 3



El esquema representa la vía intrínseca de activación de apoptosis (Green y Reed, 1998).

2.4. Detección de apoptosis

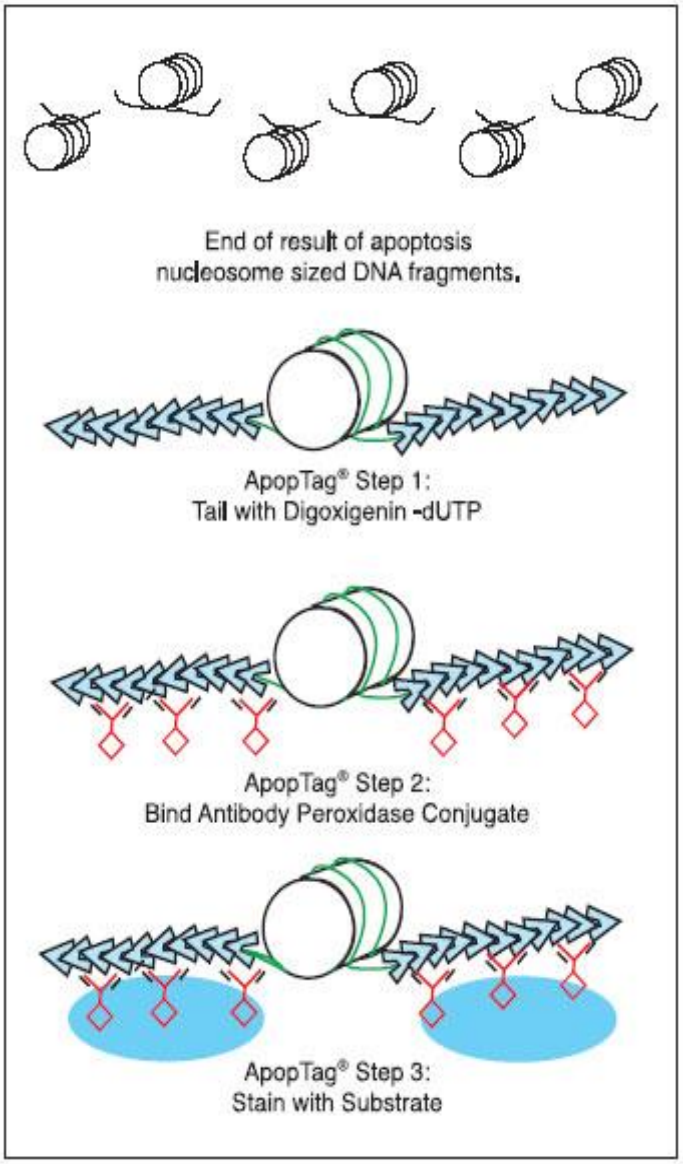
La muerte celular programada puede detectarse bajo microscopia electrónica y en cortes histológicos teñidos rutinariamente, mediante la observación de los rasgos morfológicos característicos, los cuales incluyen condensación de la cromatina nuclear, compactación de los organelos citoplasmáticos y la aparición de protuberancias en la superficie celular (Wyllie *et al.*, 1984). En general, es difícil distinguir *in situ* a las células que están experimentando apoptosis por medio de la microscopia de luz, ya que la apariencia celular apoptótica se limita a unos pocos minutos y los cuerpos apoptóticos pueden ser visualizados sólo unas pocas horas antes de que sean fagocitados (Kerr *et al.*, 1987).

Hay que considerar que la fragmentación de DNA que ocurre en el proceso apoptótico, puede encontrarse tanto en células apoptóticas morfológicamente definidas, como también en células de aspecto normal, no obstante haberse iniciado el proceso de muerte celular programada (Gavrieli *et al.*, 1992). Por esto, se han desarrollado técnicas más específicas basadas en la detección de cambios bioquímicos o en la expresión de proteínas asociadas directamente con la apoptosis. Así por ejemplo, la fragmentación del DNA en fragmentos de 180 a 200 pares de bases, rasgo que caracteriza a la muerte celular programada, esta siendo usado en el análisis morfológico de apoptosis (Soini *et al.*, 1998). Entre estas técnicas se puede mencionar el ensayo de TUNEL (*terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling*), el cual detecta la fragmentación de DNA (Fig.4). En esta prueba las hebras de DNA son detectadas por marcaje enzimático, en el extremo 3'-OH libre con nucleótidos modificados, los que son marcados con digoxigenina por

medio de la enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Los fragmentos de DNA marcados se unen a un anticuerpo antidigoxigenina, el cual lleva conjugada una enzima (peroxidasa) que genera una reacción coloreada permanente e intensa, por medio de un sustrato cromogénico (Gavrieli *et al.*, 1992).

Por lo tanto, con esta técnica se pueden detectar estados tempranos de apoptosis, donde la condensación de la cromatina ha comenzado y los fragmentos de DNA son pocos, e incluso antes de que el núcleo experimente los principales cambios morfológicos (Attanasio y Schiffer, 1995).

Figura 4



Esquema que representa la detección de fragmentos de DNA, a través de inmunohistoquímica (TUNEL). (Manual ApopTag® In Situ Apoptosis detection kits. Intergen Company)

2.5. Dexametasona

La Dexametasona es un fármaco perteneciente a la familia de los glucocorticoides (Goodman y Gilman, 1996), las principales funciones son mantener la glicemia y evitar la hipotensión arterial, así como modular la respuesta inmune e inflamatoria y los mecanismos de adaptación al estrés (Jares y Pignataro, 2002).

Los glucocorticoides son moléculas liposolubles que difunden fácilmente al interior de las células. En el citoplasma se unen a un receptor específico (GR), el cual reside en el citoplasma de forma inactiva hasta que se une al glucocorticoide, esta unión da como resultado la activación del receptor y la traslocación hacia el núcleo (Goodman y Gilman, 1996). Los GR pertenecen a una superfamilia que incluye a receptores de hormona tiroidea, vitamina D, ácido retinoico y hormonas sexuales; actúan como factores trascripcionales activados por ligando, y se encuentran en todas las células nucleadas (Jares y Pignataro, 2002).

El receptor de glucocorticoide inactivo se encuentra unido a dos moléculas de la proteína de choque por calor (hsp90) y a una inmunofilina, formando un complejo proteico. Una vez que el glucocorticoide se une al receptor, hsp90 se disocia, y de esta manera se expresan dos señales de localización nuclear ubicadas en el receptor, que permiten que el complejo GR activado – glucocorticoide se dirija hacia el núcleo, donde interactúan con secuencias de DNA específicas denominadas elementos de reacción a glucocorticoides (GRE), y proporcionan especificidad a la inducción de transcripción de genes por los glucocorticoides (Goodman y Gilman, 1996; Barnes, 1998), (Fig. 5)

Los glucocorticoides son usados en un gran número de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, también en trasplantes de órganos y en los tratamientos de leucemias y linfomas, es decir, en todas las patologías asociadas a un aumento de la expresión de citoquinas y la expresión de moléculas de adhesión (Almawi, 2001).

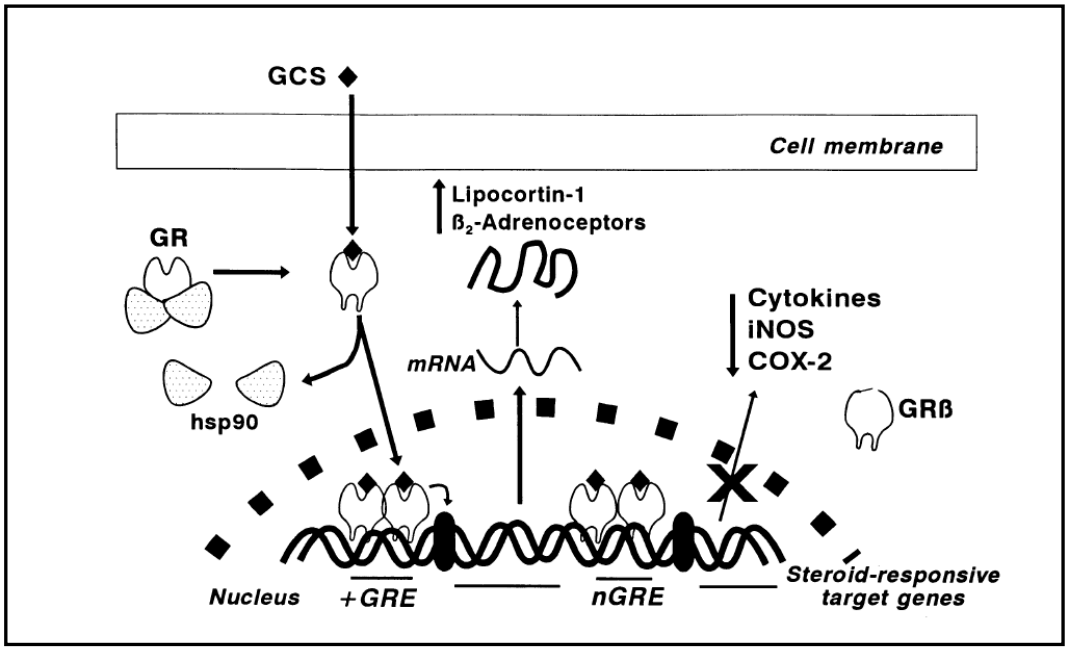
El rol de la dexametasona como inductor de apoptosis, ha sido descrito en diferentes células y tejidos incluyendo timocitos, linfocitos normales o neoplásicos, granulocitos, neuronas, células epiteliales, célula germinales y osteoblastos. Para esta acción, se necesita de la interacción de receptores a corticoides, activación de endonucleasas, movilización de calcio, liberación de citocromo c y activación de caspasas (Marchetti *et al.,* 2003).

La dexametasona luego de la interacción con el receptor (GR), activa a la fosfatidil inositol – fosfolipasa C específica (PI – PLC), a través de un mecanismo mediado por Proteina Kinasa C (PKC). Este mecanismo induce la generación de Diacilglicerol (DAG), el cual es necesario para la activación de ácido Esfingomielinasa (aSmase) y para la generación de ceramida (Cifone, *et al.;* 1999), la que al incrementar sus niveles induce la activación de la caspasa – 8 y esta a su vez puede activar de manera directa a la caspasa – 3, o bien regular la liberación de citocromo c, y por ende activar a la caspasa – 9 (Fig. 6) (Marchetti *et al.,* 2003). Dexametasona también induce la activación del complejo FADD/caspasa 8 (Jares y Pignataro, 2002; Marchetti *et al.,* 2003). En linfocitos se ha demostrado que los glucocorticoides estimulan la síntesis de I-κB, el cual es un inhibidor del factor de supervivencia celular NF-κB (Almawi, 2001).

Como resultado de los mecanismos que desencadena dexametasona, se produce una división del DNA en fragmentos de peso molecular de 180-200 pares de bases, los cuales se correlacionan con los descritos para apoptosis (Brown, *et al.;*1993).

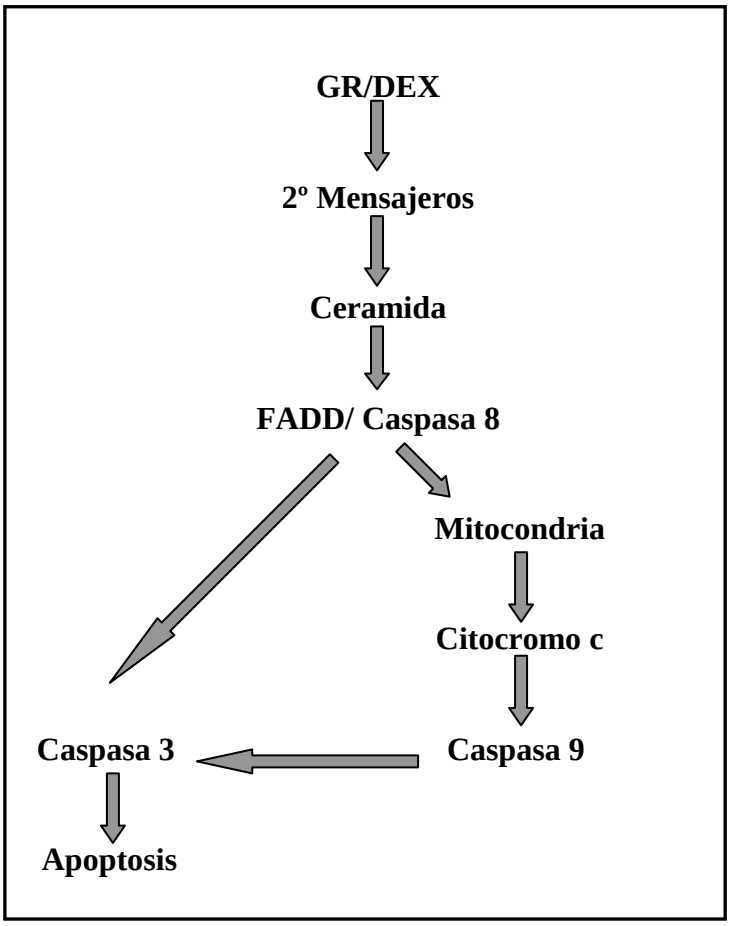
De acuerdo a la revisión bibliográfica, la acción de la dexametasona que favorece los mecanismos proapoptóticos, complementaría los tratamientos quimioterápicos usados para combatir el cáncer.

Figura 5



Esquema representando el modelo clásico de
acción de glucocorticoides
(Barnes, 1998)

Figura 6



Esquema que muestra el mecanismo

Inductor de apoptosis de la dexametasona.

2.6. Tumor Venéreo Transmisible Canino TVT.

Históricamente se han usado un gran número de términos para nombrar a esta neoplasia: linfoma contagioso, sarcoma infeccioso, tumor venéreo contagioso, granuloma venéreo, condiloma canino y sarcoma de Sticker (en honor al primer investigador que estudio este tumor) (Roger, 1997).

Es un tumor contagioso, transmitido sexualmente y que en forma natural, sólo afecta a perros (Roger, 1997), aunque experimentalmente, ha sido transmitido a otros canidos como el zorro, lobo y coyote (Booth, 1994).

La transmisión ocurre por el transplante de células tumorales viables intactas desde un animal infectado (Booth, 1994), a la mucosa de un animal susceptible, y es transmitido más fácilmente al existir daño en ella (Rogers, 1997), lo que lo diferencia de la mayoría de las neoplasias, las cuales se producen por la transformación de las propias células del huésped (Taussing, 1989).

Se presenta de preferencia en animales jóvenes y sexualmente maduros (Feldman y Nelson, 1987), sin predisposición por sexo o raza (Rogers, 1997), siendo los perros vagabundos el reservorio de este problema (Feldman y Nelson, 1987). La edad promedio de perros afectados es de cuatro a cinco años (Rogers, 1997).

Este tumor es de amplia distribución mundial, afectando principalmente zonas tropicales y subtropicales (Amber y Henderson, 1982), y también es de alta frecuencia en países subdesarrollados (Rogers, 1997); En Chile, esta neoplasia es la segunda de mayor incidencia en caninos de la Región Metropolitana (Flores, *et al.*,1989).

2.6.1. Biología del Tumor Venéreo Transmisible.

El TVT pertenece al grupo denominado "tumores de células redondas," junto con los mastocitomas, histiocitomas y linfosarcomas (Meyer y Franks, 1986).

Se transmite a través de la implantación de células tumorales libres desde un perro portador a otro receptor mediante el coito, y como consecuencia de conductas sexuales típicas de los animales, como son el lamido y el olfateo (Pérez, 1986), las cuales explican los casos de este tumor en la cavidad nasal y oral (Rogers, 1997). La susceptibilidad esta dada, principalmente, por la presencia de abrasiones en las superficies mucosas expuestas (Brown, *et al.*, 1980).

El TVT se observa, principalmente, en los genitales externos de perros de ambos sexos (Moulton, 1993). En el macho se ubica de preferencia en la mucosa peneana y zona parietal del prepucio y en escroto. En la hembra, en la mucosa vaginal, vulvar y vestíbulo (Moulton, 1993). También ha sido observado extragenitalmente en piel, tejido subcutáneo, mucosa nasal y bucal, paladar blando y región anal, entre otras (Feldman y Nelson, 1987; Vermooten, 1987; Booth, 1994; Rogers, 1997).

El tumor venéreo transmisible consiste en nódulos únicos o múltiples, de superficie irregular, consistencia friable y forma semejante a una coliflor. Además de las formas nodulares, se han observado pedunculados, papilares o multilobulados (Lombardi, 1995). Se pueden observar signos clínicos como, descargas genitales persistentes o intermitentes de tipo sanguinolenta y/o hemorrágica, con masas o malformaciones que incrementan el tamaño del genital, además de mal olor (Rogers, 1997). En los estados avanzados de la enfermedad, se pueden presentar ulceraciones, necrosis y posterior infección bacteriana (Booth, 1994; Rogers, 1997).

La ocurrencia de metástasis es poco frecuente pero ha sido descrita, generalmente, en perros inmunodeprimidos y neonatos (Yang, 1987). Las zonas más frecuentemente afectadas por las metástasis son los nódulos linfáticos inguinales superficiales e ilíacos externos, y ocasionalmente, tonsilas, bazo, hígado, riñones, peritoneo, pulmones, musculatura y sistema nervioso central (Feldman y Nelson, 1987).

El TVT debido a su capacidad metastizante, se puede considerar como un tumor maligno, que al progresar puede representar un riesgo de muerte para el paciente (Prier y Johnson, 1964).

2.6.2. Origen y Etiología.

Diversos estudios han sugerido que las células de TVT tendrían un origen histiocitario. Así, Mozos *et al.*,(1996) encontraron reacción positiva a lisozimas, alfa-1-antitripsina (AAT) y Vimentina. Los dos primeros son utilizados como buenos marcadores para histiocitomas humanos y la Vimentina es un filamento intermedio del citoesqueleto presente en células de origen mesenquimático. Además, Marchal *et al.*, (1997) mostraron que las células de TVT también reaccionan con ACM1, que es un antígeno específico de macrófago. Recientemente se ha informado que las células de TVT presentan complejo mayor de histocompatibilidad clase II, lo que también sugiere que estas células tienen un posible origen histiocitario (Polanco, 2001).

Las características citogenéticas del tumor, indican que el TVT que se desarrolla en diferentes locaciones, tiene un origen común y es continuamente transmitido por células transplantadas (Rogers, 1997). Esto estaría respaldado por estudios que mencionan que las células de TVT tienen 59 cromosomas, mientras que las células somáticas caninas normales tienen 78 cromosomas. Dentro de los 59 cromosomas del TVT, 42 son acrocéntricos y 17 son metacéntricos, observándose el mismo cariotipo en cultivos celulares (Booth, 1994).

El agente etiológico exacto del TVT es desconocido. El origen viral propuesto inicialmente por el hallazgo de partículas virales electrodensas de formas icosaédricas en extractos tumorales no ha sido demostrado, pues al inocular extractos libres de células de TVT con esas partículas virales a ejemplares caninos susceptibles, no ha ocurrido la replicación del tumor (Hill *et al.*,1984; Amber *et al.*,1985).

2.6.3. Diagnóstico.

El diagnóstico está basado en la historia clínica del paciente, examen físico y, principalmente, sobre la base del estudio citológico e histopatológico del tumor (Feldman y Nelson, 1987). El diagnóstico de los tumores extragenitales es de mayor dificultad, debido a la similitud de las células de TVT con las células de histiocitomas, mastocitomas y linfosarcomas, considerados todos ellos como tumores de células redondas (Weir *et al.* 1978); para el diagnóstico diferencial es necesario recurrir a pruebas citológicas e histopatológicas (Wellman, 1996).

El examen citológico del TVT, generalmente muestra una gran cantidad de células, las cuales son redondas a ovales, poseen abundante citoplasma y sus bordes son poco definidos, es de color azul pálido o moderadamente basófilo y a menudo contiene vacuolas claras, el núcleo es redondo (Yang, 1987; Maxey, 1996), de tamaño variable y frecuentemente es hipercromático y de ubicación excéntrica (Yang, 1897; Willard *et al.*,1994), presentando una relación núcleo citoplasma 1:2, posee un nucleolo prominente y

la cromatina es granular. Además, la muestra citológica puede contener diferentes tipos celulares como células plasmáticas, macrófagos e incluso bacterias (Maxey, 1996).

Al corte histológico el TVT está conformado por células redondas, ovoides o poliédricas, dispuestas en cordones y/o grupos, y ordenadas en masas compactas con estroma muy vascularizado (Rogers, 1997), las células de TVT presentan un núcleo con cromatina en gránulos y nucleolos prominentes (Otomo *et al*., 1981).

2.6.4. Tratamiento

En la mayoría de los casos, la regresión espontánea de la enfermedad no ocurre en forma natural. No obstante la naturaleza maligna de esta neoplasia, el TVT tiene una buena respuesta a variadas metodologías terapéuticas (Feldman y Nelson, 1987; Rogers, 1997).

Sin embargo, la quimioterapia es el tratamiento de elección en los animales que cursan con TVT ya sea único, multifocal o metastásico. Se han utilizado diferentes agentes, pero el Sulfato de Vincristina ha mostrado ser el fármaco más efectivo, es un alcaloide derivado de la Vinca, que inhibe la mitosis en el estado de la metafase. Esta droga se une a la tubulina, impidiendo que se formen los microtúbulos necesarios para la constitución del huso mitótico, obstaculizando la proliferación de las células tumorales (Hellman y Vokes, 1996), generando de un 90 a 100% de remisión del tumor después de tres a seis tratamientos, con sólo un 10% de recurrencia luego de un año (Calvert *et al*., 1982; Booth, 1994). Su administración debe ser estrictamente endovenosa debido a que causa irritación y

necrosis perivascular. Debe ser diluida y administrarse lentamente, ya que pacientes humanos sienten una sensación de quemadura cuando es aplicada en bolo.

Clínicamente puede aparecer alopecia, estomatitis, constipación y neuropatía periférica, sintomatología no observada en perros, donde sólo se ha descrito una leve anorexia en algunos casos (Booth, 1994).

La Doxorrubicina es la droga de elección para aquellos pacientes que padecen TVT y que han resultado resistentes a la Vincristina (Rogers, 1997).

La escisión quirúrgica no es considerada una terapia efectiva, ya que se puede alcanzar una tasa de recurrencia de 68% (Rogers, 1997) debido probablemente, a un transplante de células tumorales en los bordes de la herida quirúrgica (Thrall, 1982).

La radioterapia también ha sido utilizada con éxito en esta neoplasia. La recurrencia después de una sesión radioterapéutica es improbable, no obstante, si se observa una recidiva tumoral, se recomienda repetir el tratamiento en forma más agresiva (Thrall, 1982).

2.6.5. Evolución Tumoral.

El TVT presenta una fase progresiva, que se caracteriza por un crecimiento rápido y continuo, y una fase regresiva que se produce, por lo general, después del tratamiento con vincristina, a diferencia del TVT experimental que puede pasar a una fase regresiva espontáneamente (Lombardi, 1995).

Las células del TVT progresivo forman grupos separados por fino tejido conectivo y escasa infiltración leucocitaria con predominio de linfocitos (Oltra, 1999).

En la fase regresiva se produce una disminución evidente de la masa tumoral. Las células tumorales presentan un citoplasma espumoso y se describe una disminución de la actividad mitótica (Hill *et al.*,1984) y aumento de la infiltración leucocitaria, principalmente de linfocitos (Lombardi, 1995; Oltra, 1999).

3. HIPOTESIS

Como resultado del tratamiento con dexametasona en TVT. canino, existiría un aumento de la apoptosis celular.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo General:*

- Conocer el efecto de dexametasona sobre la apoptosis celular, en el Tumor Venéreo Transmisible canino.

4.2. *Objetivo Específicos:*

- Detectar células en apoptosis a través de la inmunomarcación de fragmentos de DNA.

- Cuantificar y comparar la actividad apoptótica del TVT. canino, previo, durante y posterior al tratamiento con dexametasona.

5. MATERIAL Y METODO

5.1. Materiales

Biológico

Se obtuvieron muestras de ubicación genital de siete perros machos, sexualmente maduros, sin distinción de raza, atendidos en el Servicio de Cirugía de Pequeños Animales de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con diagnóstico de TVT progresivo confirmado mediante citología e histopatología.

Se entendió por TVT. en fase progresiva, al tumor que se encuentra en crecimiento, que no ha sido sometido a tratamiento quimioterápico previo y que cumpla con los criterios citológicos para esta etapa (Lombardi, 1995).

Tratamiento

Los pacientes fueron sometidos a tratamientos con Dexametasona, (Dexametasona® Laboratorio Sanderson) administrada por vía endovenosa diaria.

5.2. Métodos

A cada paciente se le administró Dexametasona (Dexametasona® Laboratorio Sanderson), de acuerdo al siguiente protocolo: Se aplicó una dosis endovenosa diaria de 0.5 mg/kg, por siete días, seguido de aplicaciones de dosis decrecientes también por siete días, 1º día de reducción: 0.25 mg/kg; 2º día: 0.1 mg/kg; 3º día: 0.05 mg/kg; 4º día: 0.03 mg/kg; 5º día: 0.02 mg/kg; 6º día: 0.01 mg/kg; 7º día: 0.005 mg/kg (Anexo 1).

Durante la aplicación de dexametasona se realizaron los siguientes procedimientos:

- Examen Clínico todos los días, para evaluar el estado general del paciente (Anexo 1).
- Biopsias: se obtuvieron muestras tumorales previamente, durante y una vez terminado el tratamiento con dexametasona (Anexo 1).

Las Biopsias se fijaron en formalina al 10% por 24 hrs. luego se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 5μm de espesor con un micrótomo de rotación, los cortes fueron desparafinados mediante paso por xilol, batería de alcoholes de concentraciones descendentes y agua. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina – Eosina (H-E) y van Gieson (vG) (López *et al.*, 1985), para la descripción general del tumor, y con la técnica inmunohistoquímica de TUNEL para detectar la presencia de apoptosis.

Técnica Inmunohistoquímica

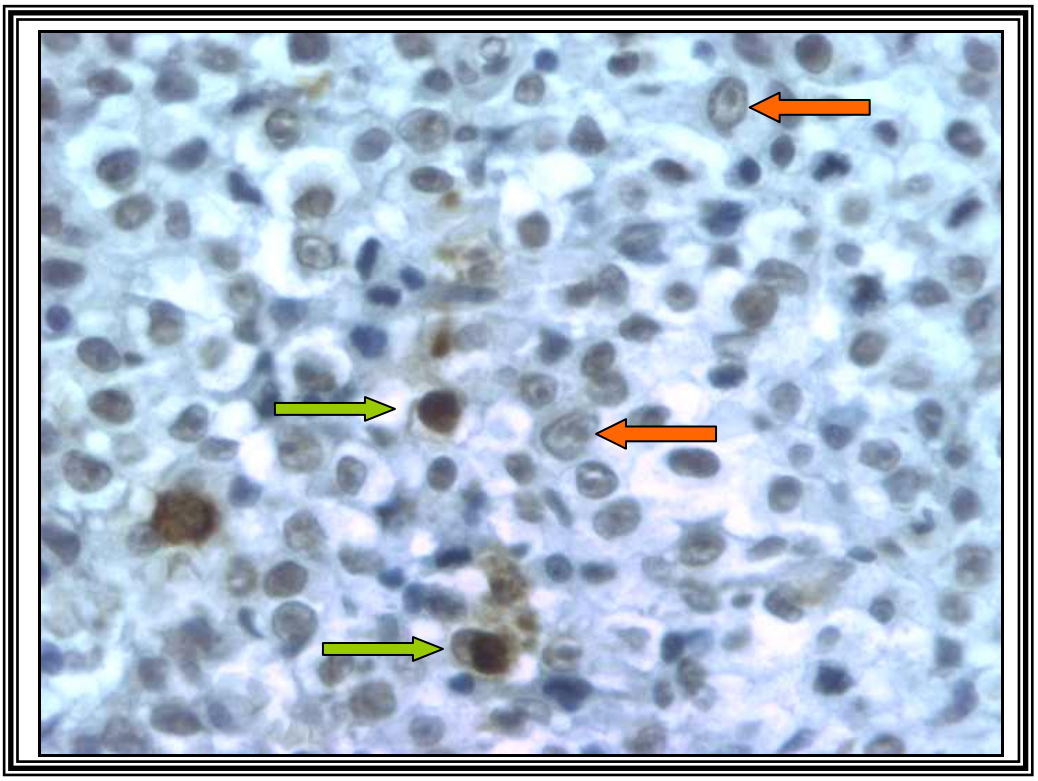
La inmunomarcación para detectar la presencia de apoptosis, se realizó a través de la técnica de TUNEL, para lo cual se utilizó un Kit apoptótico (ApopTag®), previa estandarización de la técnica (Anexo 2).

Los reactivos que provee este Kit, están diseñados para marcar los extremos libres 3'-OH del DNA, con nucleótidos marcados. Estos nucleótidos son unidos enzimáticamente al DNA mediante la enzima Terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) (Gavrieli *et al*., 1992). TdT catalíza la adición de un nucleótido trifosfato al terminal 3'-OH de una hebra doble o simple de DNA. La incorporación de nucleótidos, forma un oligómero compuesto por nucleótidos marcados con digoxigenina, y nucleótidos no marcados, en una secuencia al azar. La relación entre nucleótidos marcados con los no marcados, en el Kit ApopTag® es optimizada uniendo un anticuerpo anti – digoxigenina. Este anticuerpo a su vez, esta conjugado con una peroxidasa, lo cual genera una tinción permanente e intensa; proporcionando una detección sensible a la inmunohistoquímica (Gavrieli *et al*., 1992).

El anticuerpo anti – digoxigenina usado en este Kit, es un anticuerpo policlonal de oveja, este exhibe menos de 1% de reactividad cruzada. La porción Fc de este anticuerpo ha sido removida por una digestión proteolítica, para eliminar cualquier unión no especifica de los receptores Fc.

Los resultados positivos a la inmunohistoquímica, revelan una inmunomarcación *"in situ",* de color marrón, en núcleos y cuerpos apoptóticos (Fig. 7).

Figura 7



Corte de TVT, con tinción inmunohistoquímica, 400X

Muestra célula marcada con tinción inmunohistoquímica

Muestra célula marcada con tinción corriente (Hematoxilina)

6. EVALUACION DE LOS RESULTADOS

Esta memoria consideró un análisis descriptivo de las características histológicas del tumor a lo largo del período experimental.

Se realizó un cálculo del área positiva a la inmunomarcación en cada día de muestreo (día 0,7,17) y luego se hizo un análisis comparativo entre los días mencionados; para cumplir este objetivo, se digitalizaron las imágenes de 5 campos ópticos obtenidos al azar, con aumento de 200X por muestra, con una resolución de 512 X 480 píxeles, usando una videocámara digital (Cool Snap - Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E - 600) conectado a un computador con un software morfométrico (Image Pro – Plus, Media Cybernetics, USA).

Además, se realizaron recuentos diferenciales de células inmunomarcadas para apoptosis con el fin de establecer la proporción de células tumorales dentro de la población apoptótica.

Análisis Estadístico

Los valores obtenidos en los diferentes días de tratamiento fueron comparados mediante el empleo de análisis de varianza de 2 criterios para muestras asociadas. Para demostrar las diferencias obtenidas de este análisis entre los distintos tratamientos, se aplicó el Test de Tukey (Calzada, 1964; Polit y Hungler, 1997).

7. RESULTADOS

7.1. Descripción histopatológico del TVT en los diferentes días de tratamiento

En cortes histológicos teñidos con Hematoxilina – Eosina (H-E) y Van Gieson (vG) en los diferentes días de tratamiento se observó lo siguiente. :

- ***Día 0***: Células tumorales grandes, redondas, con núcleos y nucleolos prominentes de ubicación central, citoplasma vacuolado y mal definido.

Las células tumorales están dispuestas en grupos, rodeadas por tabiques finos de tejido conectivo teñidos de color rojo (vG), que le confiere al tejido tumoral un aspecto lobulillado; los vasos sanguíneos son principalmente de pequeño calibre ubicados entre las células tumorales, y de mediano calibre ubicados en el estroma. En algunos casos se observó un tejido tumoral altamente hemorrágico. Además, se visualizaron áreas aisladas de infiltración leucocitaria, principalmente linfocitos ubicados alrededor de los vasos sanguíneos. En este día de tratamiento también se visualizaron algunas células con figuras mitóticas.

- ***Día 7***: La disposición tumoral es similar al día 0, sin embargo, en este día las células tumorales son más pequeñas y con los núcleos más intensamente teñidos con H-E. La matriz extracelular presenta finos tabiques y zonas de tejido conectivo grueso en la periferia del tumor. Los vasos sanguíneos predominantes son de pequeño calibre, ubicados en los tabiques de tejido conectivo y los leucocitos predominantes son los linfocitos.

Además, se visualizaron células, en las cuales se observó la cromatina nuclear marginada, con núcleos condensados, junto a un encogimiento citoplasmático, indicado por un claro espacio que rodea a la célula. En el espacio extracelular y dentro de células fagocíticas, se detectaron restos cromatínicos.

- ***Día 17***: Las células tumorales presentan las mismas características que el día 7, y dispuestas en pequeños grupos. Aunque en este día se observó una menor celularidad del tumor, la matriz extracelular está constituida principalmente por tejido amorfo y tabiques finos de tejido conectivo. Los vasos sanguíneos son de pequeño calibre y no se observan elementos figurados de la sangre. Tal como en el día 7, se observan células apoptóticas y/o cuerpos apoptóticos.

En la tabla 1 se muestra las principales diferencias observadas en los distintos días de tratamiento, las cuales fueron: al avanzar en los días de tratamiento, en proporción, disminuyeron los vasos sanguíneos, aumentó la visualización de células en apoptosis, y solo se observó mitosis celular en el día 0.

Tabla 1 Evaluación cualitativa de las diferentes células y/o tejidos

En cortes histológicos en los días 0, 7, 17 de tratamiento

	Día 0	Día 7	Día 17
Cel. Tumorales	++++	++++ / +++	+++ / ++++
M. Extracelular	+	+	++
V. Sanguíneos	+++	++	++
Leucocitos	+	+ / ++	+
Fig. Mitóticas	++		
Cel. Apoptóticas		+	++

+ : Mínima
++ : Leve
+++ : Marcada
++++ : Abundante

7.2. Recuento de la actividad apoptótica

En los cortes procesados con la técnica de TUNEL, en los diferentes días de muestreo (0, 7, 17) se pudo apreciar una inmunoreactividad positiva a la fragmentación del DNA, que se visualizó con la aparición de una tinción color marrón en núcleos y/o citoplasma, y las células inmunonegativas mostraron núcleos de color azul oscuro, que es característico de la tinción de con Hematoxilina.

En el día 0 sin tratamiento con dexametasona, la inmunomarcación fue leve y se presentaba en células aisladas (Fig.8a y 8b). La figura 9 (a y b) muestra un aumento de la actividad apoptótica, pero al día 17 (Fig. 10a y 10b) es cuando se observa una mayor inmunomarcación con TUNEL.

La tabla 2 resume los resultados que corresponden al área inmunomarcada para cada día de tratamiento. Previo al tratamiento con dexametasona, el área apoptótica promedio de los 7 casos fue de 63,96μm^2. El promedio del área apoptótica tanto para el día 7, como para el día 17 de tratamiento, correspondió a 143,14 μm^2 y 695,35 μm^2 respectivamente. En la tabla 2 y la figura 11, se observa que existe un aumento de la actividad apoptótica al avanzar en los días de tratamientos.

En el día 0, para todos los casos, se obtuvieron los valores más bajos, y a su vez en el día 17, se obtuvieron los valores más altos, a excepción del caso número 6, el cual presentó un área inmunomarcada más alta en el día 7 de muestreo.

Al analizar los valores extremos por caso, se observó que la mayor área positiva a la inmunotinción fue el caso número 4 y en el día 17 con un área de 1127.97 μm^2 y el menor valor fue observado en el caso número 5, en día 0.

El análisis estadístico demostró que existen diferencias altamente significativas ($p<0,001$), entre los diferentes días de muestreo, principalmente al comparar el día 0 con el día 17; y el día 7 versus el día 17. También mostró que no existían diferencias entre los casos.

Tabla 2 Recuento del área promedio (um^2) inmunomarcada para apoptosis, para los días 0, 7 y 17 de tratamiento.

Días / Casos	0	7	17
1	53,81[a]	140,40[b]	
2	63,70[a]	176,53[b]	507,90[c]
3	51,84[a]	115,30[b]	723,54[c]
4	50,26[a]	99,20[b]	1127,97[c]
5	28,70[a]	73,85[b]	1104,02[c]
6	161,09[a]	269,53[b]	232,88[c]
7	38,31[a]	127,17[b]	475,76[c]
Promedio	63,96	143,14	695,35

* Los datos corresponden a los promedios de 5 campos ópticos obtenidos en la marcación morfométrica.

* Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes ($p<0,001$).

Figura 11

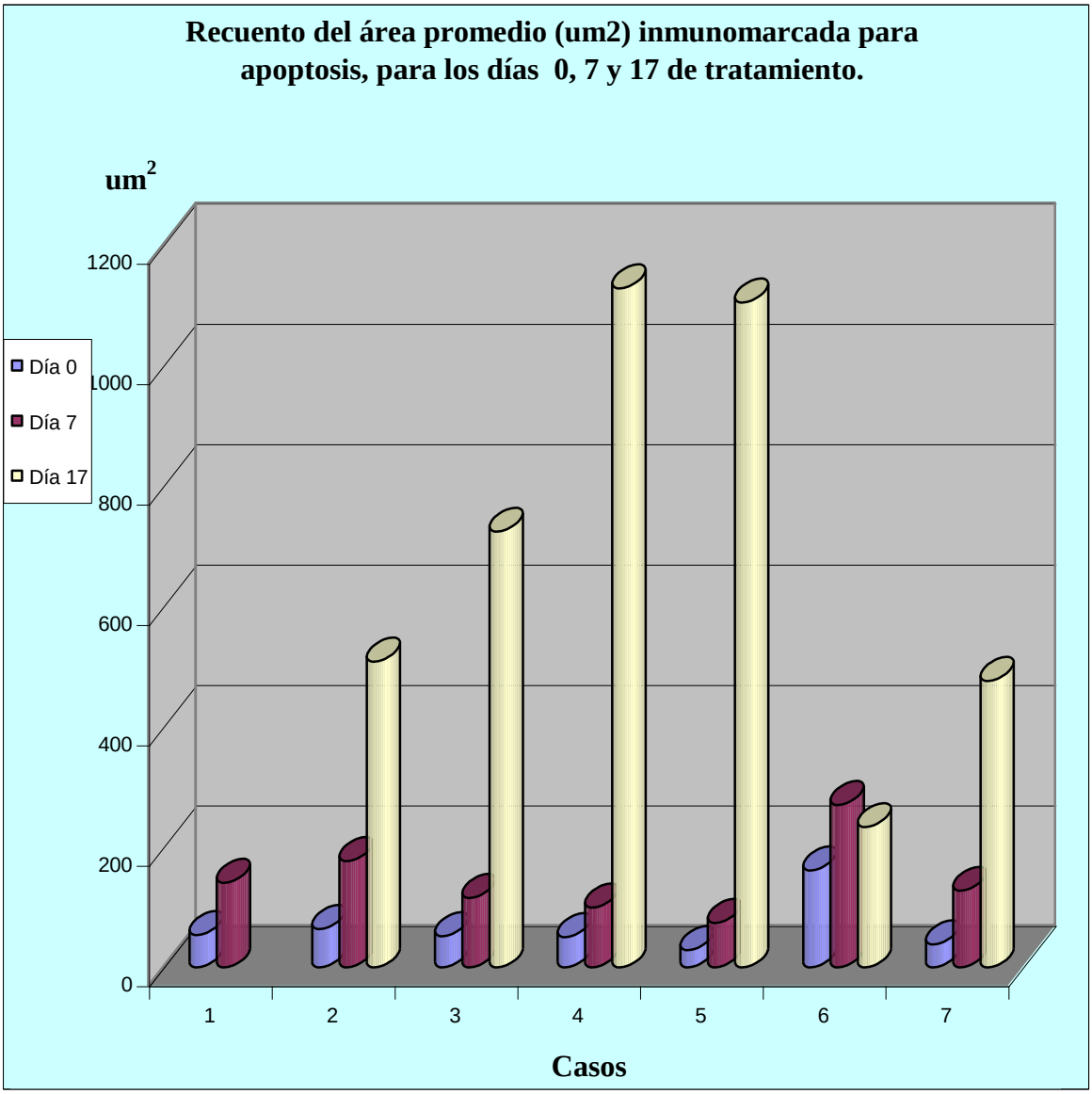


Gráfico que representa el recuento del área promedio (um^2) inmunomarcada para apoptosis, para los días 0, 7 y 17 de tratamiento.

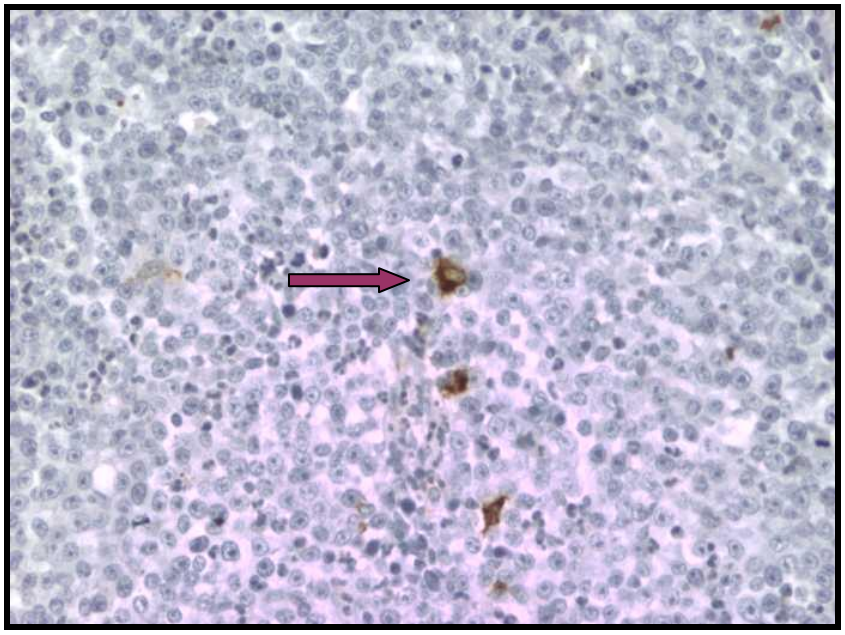


Figura 8 a) TVT al día 0 de tratamiento.

Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con Apoptag®.

200X.

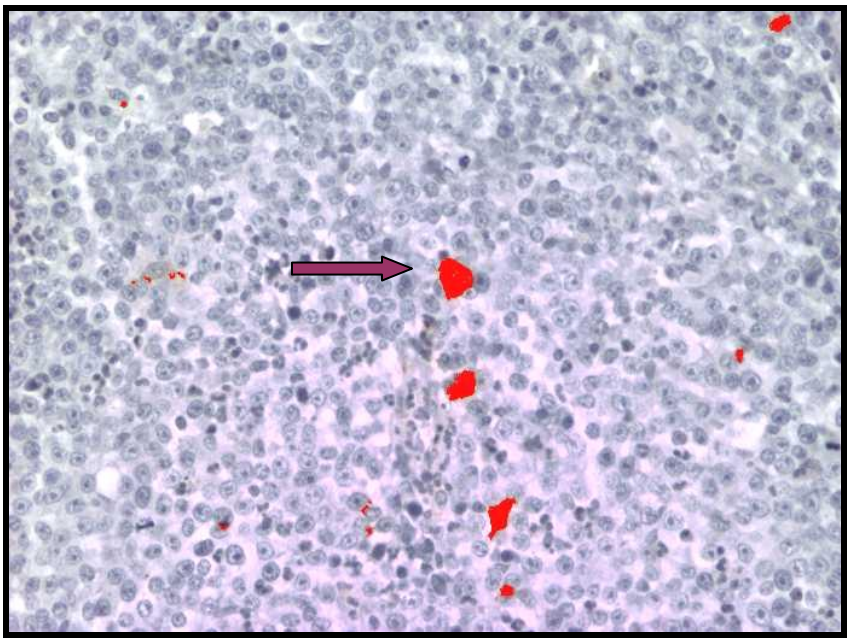


Figura 8 b) TVT al día 0 de tratamiento.

Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con Apoptag®.

200X. Marcación

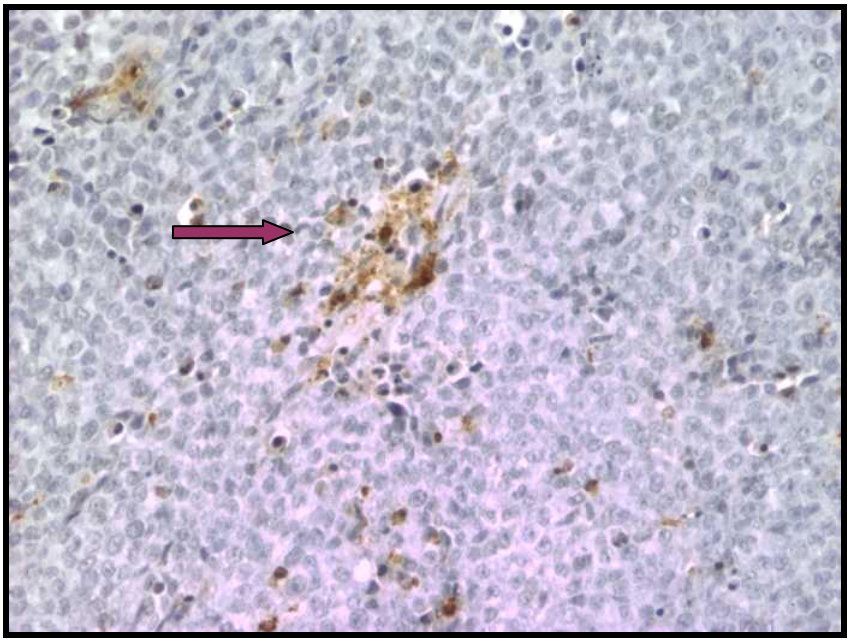


Figura 9 a) TVT al día 7 de tratamiento.
Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con Apoptag®.
200X.

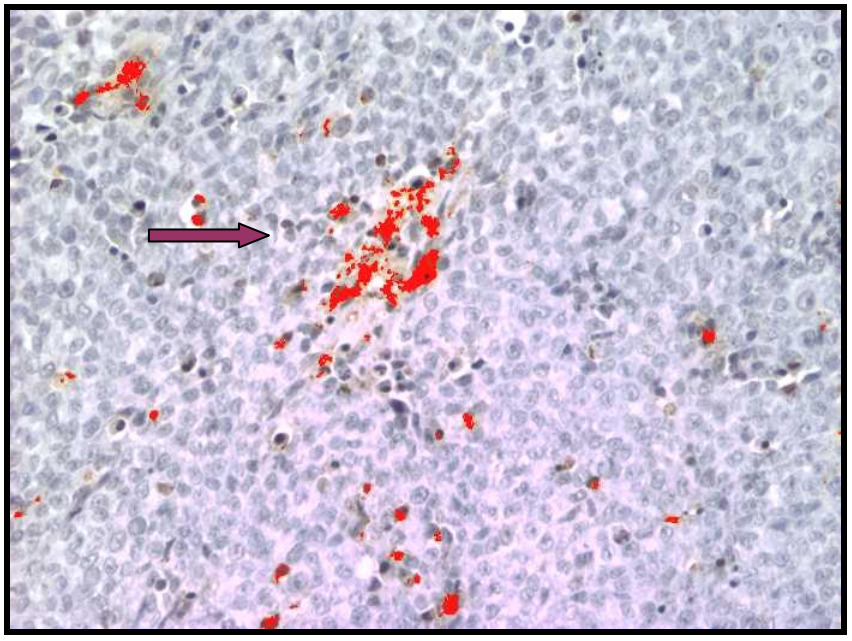


Figura 9 b) TVT al día 7 de tratamiento.
Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con Apoptag®.
200X. Marcación

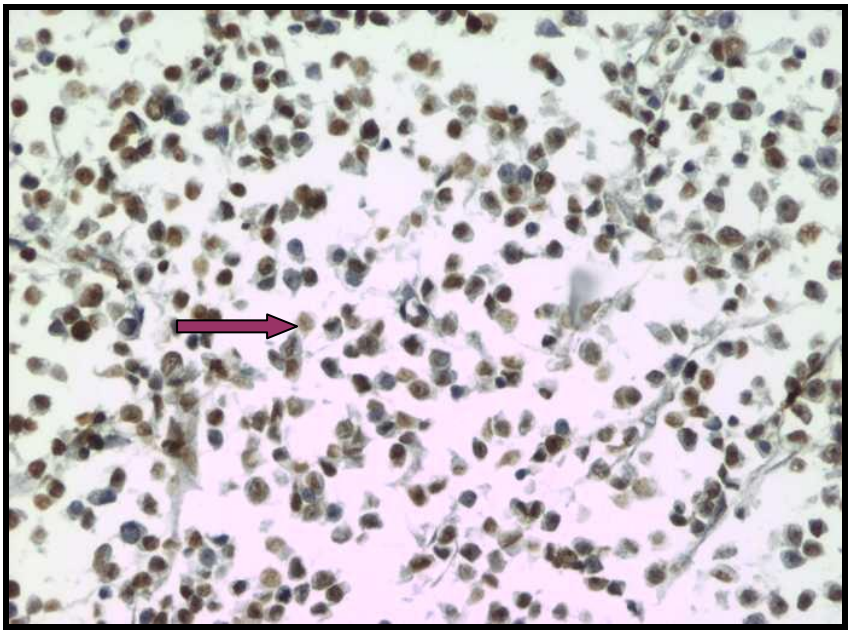


Figura 10 a) TVT al día 17 de tratamiento.
Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con Apoptag®.
200X. Marcación

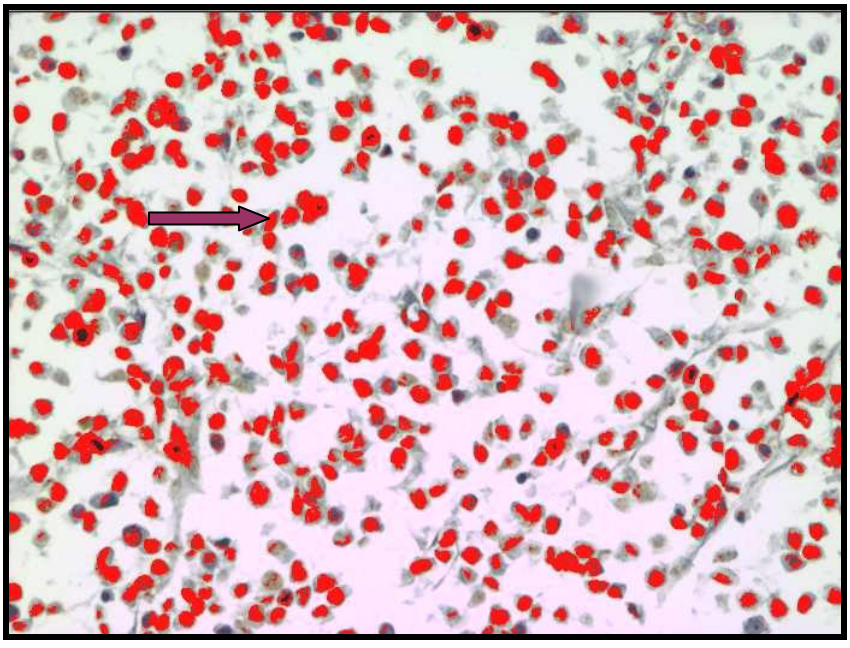


Figura 10 b) TVT al día 17 de tratamiento.
Tinción Inmunohistoquímica para apoptosis con
Apoptag®. 200X. Marcación

7.3. Recuento Diferencial.

Se realizó un recuento diferencial de células inmunomarcadas para apoptosis, con el propósito de establecer la proporción de células tumorales dentro de la población celular apoptótica. En este caso se pudieron identificar células tumorales, linfocitos, células endoteliales y fibroblastos. (Anexo 3)

El análisis en relación al tipo celular demostró que, independiente del tipo celular anteriormente mencionado, el recuento apoptótico siempre fue menor en el día 0 y mayor en el día 17 de tratamiento. (Figura 12)

Figura 12

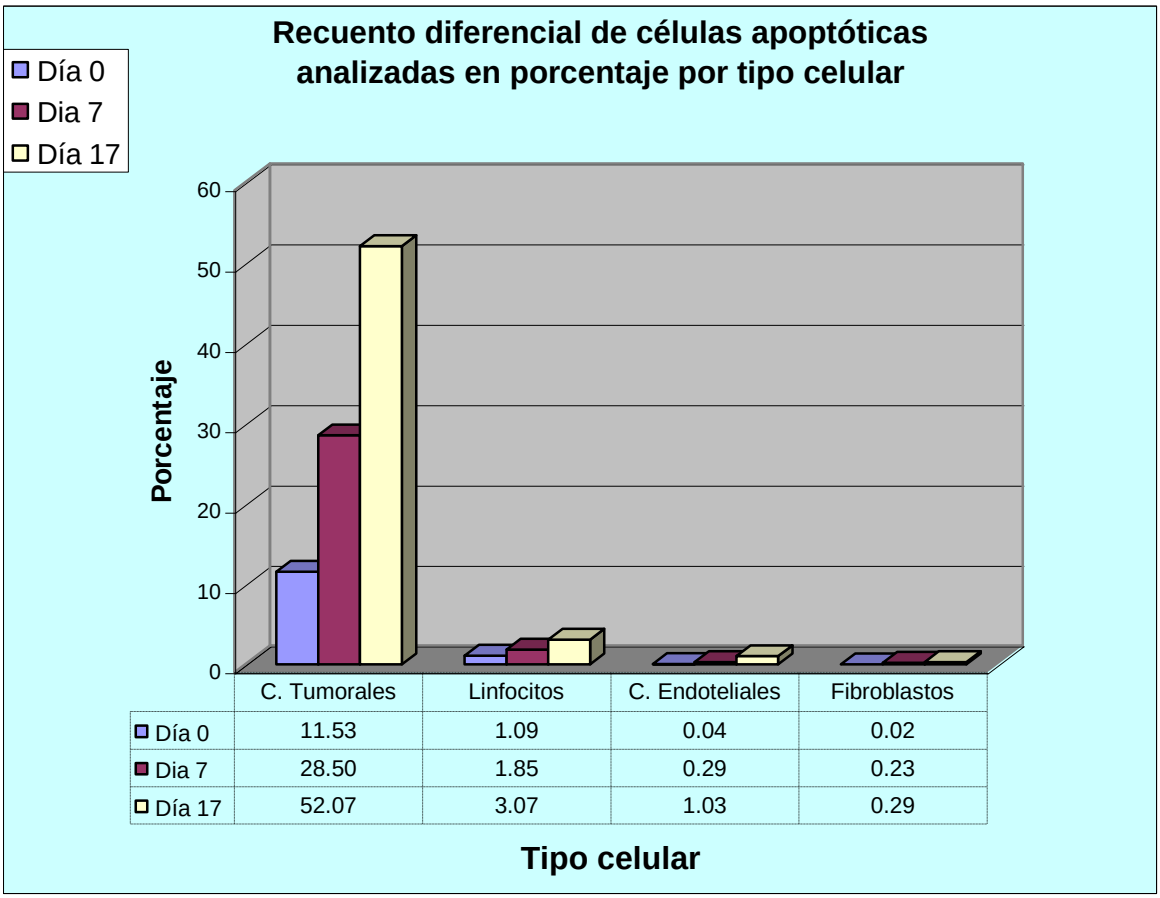
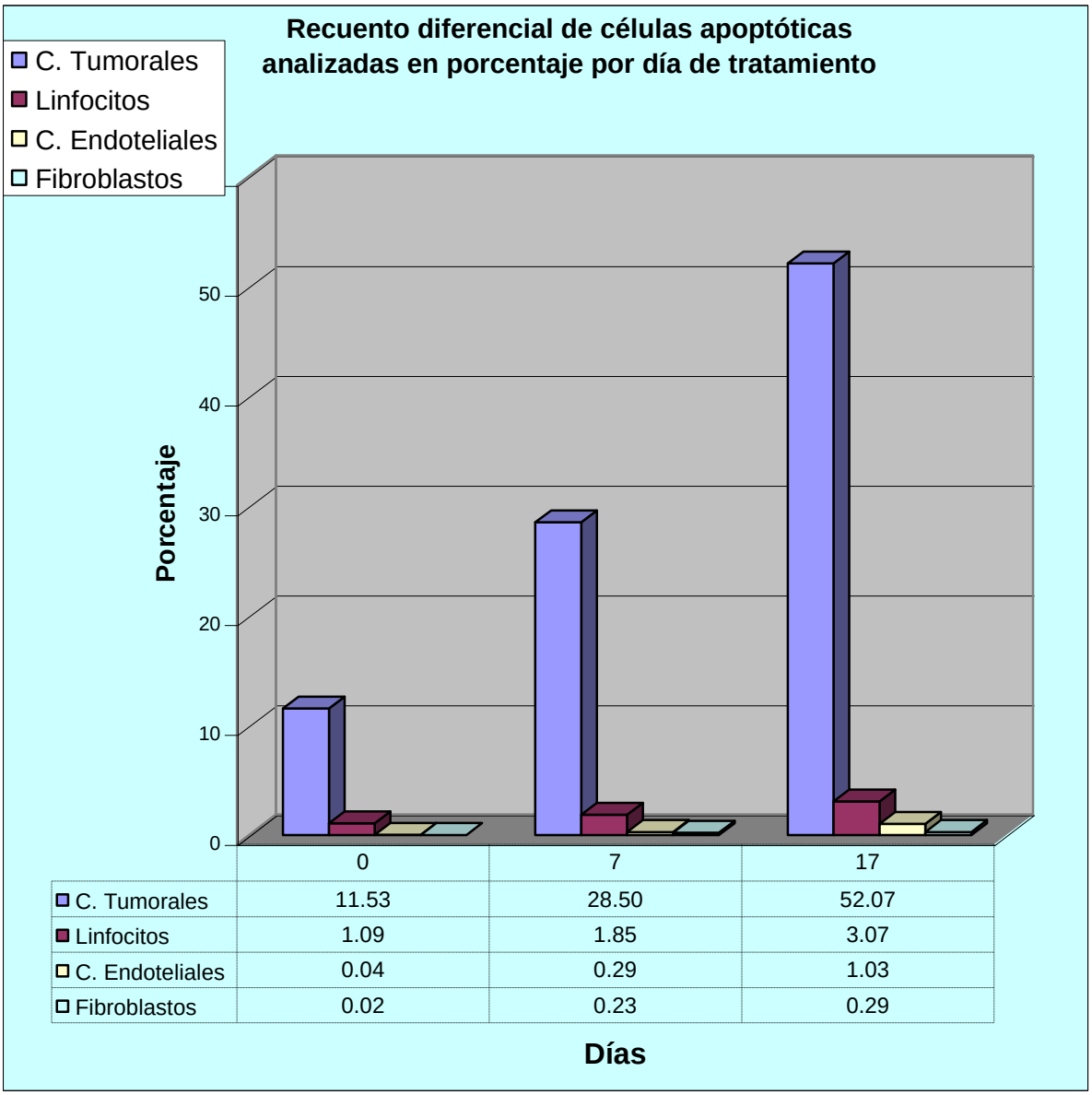


Gráfico que muestra el recuento diferencial de células apoptóticas, analizadas en porcentaje por tipo celular

La figura 13 muestra el recuento diferencial analizado en porcentaje por día de tratamiento, en este análisis se observa que las células que en mayor proporción fueron positivamente inmunomarcadas para apoptosis, fueron las células tumorales, independiente del día de tratamiento.

Figura 13



	0	7	17
C. Tumorales	11.53	28.50	52.07
Linfocitos	1.09	1.85	3.07
C. Endoteliales	0.04	0.29	1.03
Fibroblastos	0.02	0.23	0.29

Gráfico que representa el recuento diferencial de células apoptóticas

Analizadas en porcentaje por día de tratamiento

8. DISCUSIÓN

Las características histopatológicas observadas para el día 0 de tratamiento, son coincidentes con lo descrito por diferentes autores, como Lombardi (1995), Mozos *et al.*, (1996), Rogers (1997), González *et al.,* (2000), Duarte (2002).

Los resultados histopatológicos descritos tanto para el día 7 como el día 17 de tratamiento con dexametasona, son similares a lo descrito por Duarte, (2002) en cortes histológicos de TVT en fase regresiva, obtenida por vincristina, quien describió que las células tumorales estaban dispuestas en pequeños grupos, muchas de las cuales estaban en distintos grados de procesos degenerativos o apoptóticos, sin embargo, este autor detecto la presencia de células en apoptosis, sólo con técnicas corrientes (H-E, VG) en base a las características morfológicas, a diferencia de lo observado en esta memoria, en la cual se utilizó un marcador inmuno histoquímico especifico para detectar células en apoptosis. Este método, complementado con el análisis de imágenes mediante un computador, permitió obtener registros precisos, rápidos y objetivos.

Las extensas áreas de fibrosis, descritas en TVT regresivos tratados con vincristina por Lombardi (1995), y Duarte (2002), no coincide con lo observado en este estudio, ya que en los días 7 y 17 de tratamiento, sólo se observó la presencia de tabiques finos y escasos tabiques gruesos de tejido conectivo. Además, Duarte (2002) describió un aumento de células tumorales fusiformes, las cuales corresponderían a una diferenciación de las células del TVT hacia células tipo fibroblásticas, esta situación tampoco fue visualizada en este estudio. Todas estas discºrepancias, podrían explicarse porque dentro de las múltiples

acciones que tiene la dexametasona, están la de reducir la liberación de citoquinas, disminuyendo la extravasación de células inflamatorias, reduciendo el depósito de fibras de colágeno por debajo de la membrana basal, disminuyendo la posibilidad de generar un proceso reparativo (fibrosis) (Jares y Pignataro, 2002).

En el análisis histopatológico de los diferentes días de tratamiento con dexametasona, no se visualizó un aumento de la población linfocitaria, como lo describen diversos autores, como Lombardi (1995), Duarte (2002), y Reyes (2004), los cuales obtuvieron remisión tumoral con vincristina, además, en este estudio, el recuento diferencial demostró, que al avanzar hacia el día 17 de tratamiento, hubo en proporción, un aumento de linfocitos apoptóticos. Estos resultados son consecuentes a la acción de la dexametasona, ya que esta posee un reconocido rol sobre las células inflamatorias, disminuyendo el número de los linfocitos circulantes, por medio de la disminución o inhibición de la liberación de factores vasoactivos y quimioatrayentes, que resulta en una menor extravasación de leucocitos hacia el área de lesión, lo cual es semejante a lo informado por Goodman y Gilman (1996).

Los cambios morfológicos observados con tinciones corrientes, en los días 7 y 17 de tratamiento, asociados a apoptosis, concuerdan con lo descrito por otros autores como Kerr y Harmon, (1991) y Darzynkiewicz *et al*., (1997), los cuales observaron la marginación de la cromatina nuclear, como cambios morfológicos tempranos. Los cambios intermedios fueron la condensación del núcleo junto al encogimiento citoplasmático, indicado por un espacio claro que rodea a la célula. Como estados más avanzados aparecieron cuerpos apoptóticos que se encontraron en el espacio extracelular o dentro de

células fagocíticas. Además, estos cambios coincidieron con una inmunoreactividad positiva para la técnica Apoptag®.

La inmunomarcación de apoptosis mediante la técnica Apoptag®, generó una excelente señal visualizada como un área de tinción marrón intenso, detectando signos de fragmentación de DNA no sólo a nivel de cuerpos apoptóticos, sino que también, en núcleos aparentemente intactos. Este tipo de evidencia temprana fue detectada por métodos morfológicos convencionales (HE, vG), usadas en esta memoria de titulo.

La detección *in situ* de la ruptura de las hebras de DNA por la técnica de TUNEL, hace que las células apoptóticas sean fácilmente detectables mediante microscopia de luz, permitiendo un estudio mucho más exacto y específico del proceso de apoptosis, comparado con el examen de tejidos sometido a tinciones corrientes, lo que es coincidente con los trabajos realizados por Gavrieli *et al.*, (1992), Gorczyca *et al.*, (1993), Reyes (2004) y el estudio actual.

Apoptag® distingue apoptosis de necrosis por una detección específica de fragmentos de DNA y condensación de la cromatina asociados con apoptosis (Gold, 1994).

El aumento altamente significativo del área positiva a apoptosis detectada en este estudio en los diferentes días de tratamiento, concuerda con los resultados obtenidos por Reyes (2004), cuyo estudio se realizó con el mismo procedimiento de análisis morfométrico y Kit para detectar apoptosis (Apoptag®), pero en dicho estudio se utilizo vincristina para obtener TVT en fase regresiva.

El recuento diferencial demostró que las células que, en mayor proporción resultaron positivas en los diferentes días de tratamiento para apoptosis fueron las células tumorales, una respuesta similar obtuvo González *et al.,* (2000) y Reyes (2004), ambos trabajando con TVT tratado con vincristina. En el caso del estudio de González *et al.,* (2000), esta detección de un mayor número de células tumorales apoptóticas en fase regresiva, fue realizada sin un marcador específico para apoptosis.

El alto porcentaje de células tumorales apoptóticas, observadas al día 0, concuerda con lo descrito por Guvenc *et al.*,(2002), quien observó que el TVT en fase progresiva presenta un mayor índice apoptótico que otras neoplasias caninas. Esto sugiere que en el TVT no se encontrarían afectados los genes involucrados en la inducción de apoptosis, ya que diferentes observaciones clínicas indican que pacientes con mutaciones en genes asociados a apoptosis, como por ejemplo el p53, generalmente presenta un peor pronóstico en términos de respuesta a la terapia anti tumoral, como lo plantea Brown y Wouters (1999). Lo que también explicaría la fácil remisión que se obtiene en este tumor usando vincristina como tratamiento quimioterápico (Lombardi (1995), González *et al.,* (2000), Duarte (2002)).

La inducción de apoptosis celular es un mecanismo complejo que involucra la participación de múltiples estímulos, receptores, genes y proteínas, que a su vez interactúan entre ellas generando efectos tan contradictorios como son, por un lado provocar la muerte celular y / o también inducir la supervivencia celular; así por ejemplo, la estimulación y activación de los denominados receptores de muerte, por un lado conducen a la activación de la cascada de proteasas que culminan con la muerte celular, pero por otro lado, estos mismos receptores pueden antagonizar esa acción, mediante la trascripción del factor NF-κB, el cual se une a IAP que es una proteína perteneciente a la familia de proteínas supresoras de apoptosis. Por consiguiente, el mecanismo por el cual, dexametasona induce apoptosis en TVT, aún no esta clara, ya que este glucocorticoide, puede por un lado, activar a la caspasa 8 sin la activación de receptores de membrana. De acuerdo a lo informado por Cifone *et al.*,(1999) y Marchetti *et al.*,(2003), quienes demostraron que la inducción de apoptosis por medio de dexametasona, involucra un aumento de la generación de ceramidas las cuales activan a la caspasa 8. Un efecto similar obtuvieron con la estimulación de ceramidas exógenas, lo cual demuestra que la inducción de apoptosis por dexametasona es a través de las ceramidas.

Así como también, se ha demostrado que los glucocorticoides son potentes inhibidores de la activación del factor NF- κB, Feinman *et al.*,(1999) en un estudio usando líneas celulares humanas de mieloma múltiple, confirmó que la dexametasona induce la síntesis de I-κB, el cual es un inhibidor específico del factor nuclear NF- κB, y por lo tanto se produce una inhibición de la transcripción de factor supervivencia celular NF- κB.

Por otra parte, es importante mencionar la angiogénesis, la cual es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de microvasculatura ya existente (Scappaticci, 2002).
Su rol es importante en procesos fisiológicos, pero también en condiciones patológicas donde contribuye a la patogénesis de un gran número de enfermedades incluyendo al crecimiento tumoral.

Folkman e Ingber (1987) demostraron en un embrión de pollo un efecto angiostático de los glucocorticoides (dexametasona), y Lansink *et al.,* (1999) los cuales observaron que dexametasona y testosterona, bloquean casi completamente, la formación tubular de los vasos sanguíneos en un modelo *in vitro* de células endoteliales humanas.

El recuento diferencial, evidenció que hubo un aumento de apoptosis en células endoteliales hacia el día 17 de tratamiento, pero tal aumento fue muy bajo, en proporción, a lo que se visualizó con las células tumorales y linfocitos. El análisis histopatológico con técnicas corrientes, tampoco demostró variaciones en los tipos de vasos sanguíneos, al avanzar en los diferentes días de tratamiento, esto concuerda a lo observado por Ramos (2004), quien a pesar de obtener una disminución significativa del área del lecho vascular, en TVT tratado con dexametasona, no encontró variaciones en el tipo de vasos sanguíneos. Este autor también observó que si bien hubo una disminución en el tamaño tumoral, hacia el último día de tratamiento, esta no fue estadísticamente significativa, y que los tumores que presentaron una mayor disminución fueron, los que presentaron un menor tamaño en su fase progresiva. Es importante destacar que el estudio de Ramos (2004), se realizó con el mismo material biológico.

Este efecto anti angiogénico de manera indirecta podría estar induciendo apoptosis en las células tumorales debido a la hipoxia que generaría en el tejido tumoral, tal como lo plantea Lowe *et al*., (2000), quienes dicen que la hipoxia es un importante factor activador o inductor de apoptosis, ya que puede activar al gen p53, quien se une al DNA y estimula la transcripción de varios genes que intervienen en los dos efectos principales de p53: la detención del ciclo celular (Fase G1), si no se logra la reparación del DNA, p53 induce la activación de genes promotores de apoptosis (Cotran *et al.,* 2000).

En el TVT como modelo tumoral se demostró, que a pesar de que dexametasona produce un aumento altamente significativo de la apoptosis celular, y una significativa disminución del lecho vascular (Ramos, 2004), sólo se visualizó una pequeña disminución del tamaño tumoral, sugiriendo que, para lograr una mayor reducción del tamaño tumoral, el tratamiento debería ser más prolongado o con dosis más altas, con los riesgos asociados al uso prolongado de corticoides. Por lo tanto, se postula que esta nueva modalidad de terapia, debería ser utilizada como complemento a otras modalidades, más que, como única estrategia terapéutica.

9. CONCLUSIONES

- El tratamiento con dexametasona induce un aumento progresivo de la apoptosis independiente del tipo celular, pero afectando mayoritariamente a las células neoplásicas.

- Dexametasona debería ser utilizada como complemento a otras modalidades terapéuticas, más que a su uso individual, ya que a pesar de producir un aumento de la actividad apoptótica, no se produjo una disminución significativa del tamaño tumoral en el presente estudio.

- El Kit apoptótico Apoptag®, es un método objetivo y específico, que permite la detección temprana de apoptosis en células que aún no han manifestado cambios morfológicos característicos de este proceso; el cual asociado al análisis morfométrico computacional, resultó ser una metodología fácil, rápida y confiable para detectar apoptosis celular.

10. BIBLIOGRAFIA

- **ADAMS, J. M.; CORY, S.** 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. Science. 281: 1322 – 1326.

- **ALMAWI, W.** 2001. Molecular Mechanism of Glucocorticoid Effects. Mod. Asp. Immunobiol. 2 (2): 78 – 82.

- **AMBER, E. I.; HENDERSON, R.** 1982. Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastasic lesion in Zaria-Nigeria. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 18: 350 – 352.

- **AMBER, E. I.; ISITOR, G.; ADEYANJU, J.** 1985. Viral – like particles associated with naturally ocurring transmissible venereal tumot in two dogs: Preliminary report. Am J Vet Res. 46: 2613 –2615.

- **ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M.** 1998. Death receptors: signaling and modulation. Science. 281: 1305 – 1308.

- **ATTANASIO, A.; SCHIFFER, D.** 1995. Ultraestructural detection of DNA strand breaks by *in situ* end – labelling techniques. J. Pathol. 176: 27 – 35.

- **BARNES, P. J.** 1998. Anti – inflamatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. Clinical Science. 94: 557 – 572.

- **BOOTH, M. J.** 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadenocarcinoma in a bitch. J. small anim. pract. 35: 39 – 42.

- **BROWN, D.; SUN, X-M.; COHEN, G.** 1993. Dexamethasone-induced Apoptosis Involves Cleavage of DNA to Large Fragments prior to Internucleosomal Fragmentation. J. Biol. Chem. 268 (5): 3037 – 3039.

- **BROWN, J. M.; WOUTERS, B. G.** 1999. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Research. 59: 1391 – 1399.

- **BROWN, N.; CALVERT, C.; MacEWEN, G.** 1980. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176 (10): 983 – 986.

- **CALVERT, C. A. ; LEIFER, C. E.; MacEWEN, E.G.** 1982. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumour in the dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 163 – 166.

- **CALZADA, J.** 1964. Métodos estadísticos para la investigación. 2 [a] Ed. Lima, Perú.: 149 - 161.

- **CIFONE, M.; MIGLIORATI, G.; PARRONI, R.; MARCHETTI, C.; MILIMAGGI, D.; SANTONI, A.; RICCARDI, C.** 1999. Desamethasone – induced Thymocyte Apoptosis: Apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinitide – specific phospholipase C, Acidic sphingomyelinase, and caspases. Blood 93 (7): 2282 – 2296.

- **COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T.** 2000. Patología Estructural y Funcional. 6ª Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México DF, México. : 19 – 27.

- **DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F.** 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analisis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 27: 1 – 20.

- **DUARTE, M.** 2002. Indicadores de Proliferación celular en Tumor Venéreo Transmisible Canino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 27 – 29.

- **FEINMAN, R.; KOURY, J.; THAMES, M.; BARLOGIE, B.; EPSTEIN, J.; SIEGEL, D.** 1999. Role of NF- κB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid – induced apoptosis by Bcl-2. Blood. 93 (9) : 3044 – 3052.

- **FELDMAN, E.; NELSON, R.** 1987. Endocrinología y reproducción canina y felina. 2ª Ed. Filadelfia, Editorial W.V., Saunders. 531 - 532

- **FENWICK, C.; NA, S-Y.; VOLL, R.; ZHONG, H.; IM, S-Y.; LEE, J.; GHOSH, S.** 2000. A Subclass of Ras Proteins That Regulate the Degradation of IκB. Science. 287: 869 – 873.

- **FLORES, E.; DIEZ, X.; URCELAY, S.; CATTANEO, G.** 1989. Tumores en perros diagnosticados en el período 1981 – 1985 en la Región Metropolitana de Chile. Informe preliminar. Patología animal. 3 (2): 8 – 12.

- **FOLKMAN, J.; INGBER, D.** 1987. Inhibition of angiogenesis: Angiostatic Steroids. Angiogenesis current commun. Cold Spring Harbor. 95.

- **GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A.** 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. J. Cell. Biol. 119 (3): 493 – 501.

- **GOLD, R.** 1994. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. Lab. Invest. 71: 219 – 225.

- **GONZALEZ, C.; GRIFFEY, S.; NAYDAN, D.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B.** 2000. Canine trasmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regresion after chemotherapy. J. Comp. Path. 122: 241 –248.

- **GOODMAN, L.; GILMAN, A.** 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ªEd. Interamericana Mc Graw-Hill. México DF, México.: 1336 – 1338.

- **GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z.** 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer Res. 53: 1 – 7.

- **GREEN, D. R.; REED, J. C.** 1998. Mitochondria and Apoptosis. Science. 281: 1309 – 1312.

- **GUVENC, T.; HALIGUR, M.; ORMAN, M. N.; HAZIROGLU, R.** 2002. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. Acta Veterinaria Hungarica. 50 (3): 315 – 321.

- **HELLMAN, S.; VOKES, S.** 1996. Advancing current treatment for cancer. Scientific American. 275: 118 – 123.

- **HENGARTNER, M.** 2000. The biochemistry of apoptosis. Nature. 407: 770 –776.

- **HILL, D.; YANG, T. J.; WATCHEL, A.** 1984. Canine transmissible venereal sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocite ultrastructure at different growth stages. Vet. Pathol. 21: 39 – 45.

- **HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; SUSIN, S.; DALLAPORTA, B.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G.** 1997. The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. Oncogene. 15: 1573 – 1581.

- **JARES, E.; PIGNATARO, O.** 2002. Mecanismos moleculares de acción de los corticoides. Arch. Alergia Inmunol. Clin. 33 (1): 9 –21.

- **KERR, J. F. R.; HARMON, B. V.** 1991. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. Apoptosis: Molecular basis of cell death, chapt, 1, Cold Spring arbor Laboratory Press. 5 – 29.

- **KERR, J. F .R.; WINTERFORD,C.; HARMON, B. V.** 1994. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 73 (8): 2013 – 2026.

- **KERR, J. F .R.; SEARLE,B.; HARMON, B. V.** 1987. Apoptosis. In perspectives on mammalian cell death. C.S. Potten, editor. Oxford University Press. Oxford 93 – 128.

- **LANSINK, M.; KOOLWIJK, P.; van HINSBERGH, V.; KOOISTRA, T.** 1998. Effects of Steroids Hormones and retinoids on the formation of capillary – like tubular structures of human microvascular endotelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression. Blood. 92(3): 927 – 938.

- **LOMBARDI, C.** 1995. Evaluación del tratamiento quimioterapéutico con Vincristina en la regresión del tumor venéreo transmisible espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral. Tesis Magíster en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 48 – 50.

- **LÓPEZ, M.; LEYTON, C.; GRAF, M.** 1985. Técnicas de Histología y Citología. Editado por Universidad de Chile, Facultad de Medicina. 2ª Ed. 242.

- **LOWE, S. W.; LIN, A. W.** 2000. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 21 (3): 485 – 495.

- **MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D; MAGNO, J. P.** 1997. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. Vet. Immunol. Immunopathol. 57: 1 – 11.

- **MARCHETTI, M.; DI MARCO, B.; CIFONE, G.; MIGLIORATI, G.; RICCARDI, C.** 2003. Dexamethasone - induce Apoptosis of Thymocytes: Role of Glucocorticoides Receptor – Associated Src Kinase and Caspase – 8 activation. Blood 101 (2): 585 – 593.

- **MAXEY, L.;** 1996. Citology and the diagnosis of neoplasia. Proceedings of the 20th Waltham/osu Symposium.

- **MEHMET, H.** 2000. Caspases find a new place to hide. Nature. 403: 29 – 30.

- **MESSMER, U.; PEREDA-FERNANDEZ, C.; MANDERSCHEID, M.; PFEILSCHIFTER, J.** 2001. Dexamethasone inhibits TNF-α-induced apoptosis and IAP protein downregulation in MCF-7 cells. Br. J. Pharmacol. 133: 467 – 476.

- **MEYER, D.; FRANKS, P.** 1986. Clinical Cytology. Part 2: Cytologic characteristics of tumors. Mod. Vet. Pract. 67 (5): 440 – 445.

- **MOULTON, J.** 1993. Tumor of genital system and tumor of the mamary gland. Tumors in domestic animals 3ª Ed. Edit University of California. Press Berckley, USA. 479 – 549.

- **MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J.** 1996. Immunohistochemical characterization of canine transmisible venereal tumor. Vet. Pathol. 33: 257 -263.

- **OLTRA, O.** 1999. Respuesta inmune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fases regresiva y progresiva. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias 67.

- **OTOMO, K.; KOIKE, T.; KUDO, T.; SAKAI, T.** 1981. Histological and ultraestructural findings of regressing canine transmisible venereal tumor after repeated transplantation. Jpn. J. Vet. Sci. 43: 823 – 832.

- **PEREZ, L.;** 1986. Naturaleza y composición de GAGS en el tumor venéreo transmisible. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 4 – 14.

- **POLANCO, M.** 2001. Expresión de antígeno de histocompatibilidad clase II, en tumor venéreo transmisible del canino, en fase progresiva y regresiva. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

- **POLIT, D.; HUNGLER, P.** 1997. Investigación Científica en Ciencias de la Salud. 5ª Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México DF, México. : 418 - 423.

- **PRIER, J.; JOHNSON, J.** 1964. Malignancy in a canine transmissible venereal tumor. J. Am. Med. Assoc. 145 (11): 1092 – 1094.

- **RAMOS, R.** 2004. Actividad anti – angiogénica de la dexametasona en tumor venéreo transmisible canino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 27 – 36.

- **REED, J.C.** 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. J. Clin. Oncol. 17 (9): 2941 – 2953.

- **REED, J.C.** 2000. Mechanisms of apoptosis. Am. J. Pathol. 157 (5): 1415 – 1430.

- **RENEHAN, A.; BOOTH, C.; POTTEN, C.** 2001. What is apoptosis, and why is it important?. Br. Med. J. 1536 – 1538.

- **REYES, S.** 2004. Apoptosis en Tumor Venéreo Transmisible Canino, durante fase progresiva y regresiva. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 27 – 29.

- **ROGERS, K.** 1997. Transmissible Veneral Tumor. Compend. Continuing Educ. Pract. Vet. 19 (9): 1036 – 1045.

- **SCAPPATICCI, F.;** 2002. Mechanisms and future directions for angiogenesis – Bases Cancer therapies. J. Clin. Oncol. 20 (18): 3906 – 3927.

- **SHEIKH, M. S.; FORNACE, A. J.** 2000. Role of p53 family members in apoptosis. J. Cell. Physiol. 182: 171 – 181.

- **SJÖSTRÖM, J.; BERGH, J.** 2001. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. Br. Med. J. 322: 1538 – 1539

- **SOINI, Y.; PÄÄKKÖ, P.; LEHTO, V-P.** 1998. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am. J. Pathol. 153 (4): 1041 – 1053.

- **TAUSSING, M.J.** 1989. Neoplasia: Processes in Pathology and Microbiology. Edit. Blackwell Scientific Publications. 2ª edition. 689 – 809.

- **THORNBERRY, N.; LAZEBNIK, Y.** 1998. Caspases: Enemies within. Science. 281: 1312 – 1316.

- **THRALL, D. E.** 1982. Orthovoltage radiotherapy of canine transmissible venereal tumors. Vet. Radiol. 23 (5): 217 – 219.

- **VERMOOTEN, M.** 1987. Canine transmissible venereal tumour: A review. SA Vet. Jnl. 87 (03): 147 –150.

- **WEIR, E. C.; POND, M. J.; DUNCAN, J. R.; POLZIN, D. J.** 1978. Extragenital occurrence of transmissible venereal tumour in the dog: literature review and case reports. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 14 (4): 532 – 536.

- **WELLMAN, M.;** 1996. Citology and the diagnosis of neoplasia. Waltham/OSU Symposium. Oncology and Hematology. 11 – 20.

- **WILLARD, M.; TVEDTEN, H.; TURNWOLD, G.** 1994. Citology of neoplastic and inflammatory masses. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods. Edit. WB Saunders Company. 2ª Ed. 334 – 341.

- **WYLLIE, A. H.; MORRIS, R. G.; SMITH, A. L.; DUNLOP, D.** 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J. Pathol. 142: 67 –77.

- **YANG, T.** 1987. Metastatic transmisible venereal sarcoma in a dog. J. small Anim. Pract. 21: 522 – 523.

III. ANEXOS

Anexo 1: Procedimientos

DIA	Protocolo
0	1^{era} Biopsia
1 al 7	Dexametasona: 0.5 mg/kg ev. 2da Biopsia día 7
8	Dexametasona: 0.25 mg/kg ev
9	Dexametasona: 0.1 mg/kg ev
10	Dexametasona: 0.05 mg/kg ev
11	Dexametasona: 0.03 mg/kg ev
12	Dexametasona: 0.02 mg/kg ev
13	Dexametasona: 0.01 mg/kg ev
14	Dexametasona: 0.005 mg/kg ev
17	3^{era} Biopsia

Anexo 2: Técnica Inmunohistoquímica (Estandarizada para muestras de TVT)

1) Desparafinar cortes histológicos
    - ❖ Sumergir las muestras en Xiloles y luego en Alcoholes en forma descendente (100% - 95% - 70%)
    - ❖ Sumergir las muestras en PBS una vez.

2) Pretratar los cortes histológicos para recuperación de antígenos
    - ❖ Aplicar Proteinasa K (20μg/ml) durante 15 minutos.
    - ❖ Lavar dos veces en agua destilada por 2 minutos cada lavado.

3) Bloqueo peroxidasa endógena
    - ❖ Tratar las muestras con peroxido de hidrogeno al 3% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.
    - ❖ Enjuagar la muestra 2 veces con PBS o agua, por 5 minutos cada vez.

4) Aplicar amortiguador equilibrante
    - ❖ Sacar cuidadosamente el exceso de líquido.
    - ❖ Aplicar inmediatamente 75μl de amortiguador Equilibrante directamente en la muestra.
    - ❖ Incubar por al menos 10 segundos a temperatura ambiente.

5) Aplicar enzima TdT

- ❖ Sacar el exceso de líquido cuidadosamente.
- ❖ Aplicar inmediatamente 55µl/5cm^2 de TdT.
- ❖ Incubar en cámara húmeda en estufa universal a 37ºC por una hora.

6) Detener actividad enzimática

- ❖ Con Inhibidor (Working strength stop/wash buffer) agitar por 15 segundos e incubar por 10 minutos a Tº ambiente.

7) Aplicar antidigoxigenina conjugada

- ❖ Lavar la muestra 3 veces en PBS por un minuto cada vez.
- ❖ Sacar el exceso de liquido cuidadosamente.
- ❖ Aplicar Anti-Digoxigenina peroxidasa conjugada (65µl/5cm^2), e incubar en cámara húmeda por 30 minutos a Tº ambiente.

8) Lavado

- ❖ Lavar las muestras en cuatro cambios de PBS por dos minutos cada vez a Tº Ambiente.

9) Revelar el color en Sustrato de Peroxidasa

- ❖ Sacar el exceso de líquido cuidadosamente.
- ❖ Aplicar suficiente peroxidasa para cubrir completamente la muestra, por 3 a 6 minutos a Tº ambiente.

10) Lavar Muestra

- ❖ Lavar la muestra en tres cambios de agua destilada por 1 minuto cada vez, e incubar por 5 minutos a Tº ambiente.

11) Contrateñir la muestra

- ❖ Teñir la muestra con Hematoxilina por 3 minutos
- ❖ Lavar con agua corriente
- ❖ Sumergir las muestras en carbonato de litio por 3 minutos
- ❖ Lavar las muestras con agua corriente por 5 minutos
- ❖ Deshidratar las muestras en Alcoholes de 96% (1 lavado), y de 100% (3) por 5 minutos cada uno.
- ❖ Aclarar en Xiloles (3) por 3 minutos cada uno.
- ❖ Montar en cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex®)

Anexo 3: Número de células positivas para apoptosis observadas en el recuento diferencial.

Recuento diferencial de células inmunomarcadas para apoptosis

Día / Tipo Celular	0	7	17	TOTAL
C. Tumorales	560	1385	2530	**4475**
Linfocitos	53	90	149	**292**
C. Endoteliales	2	14	50	**66**
Fibroblastos	1	11	14	**26**
Total	**616**	**1500**	**2743**	**4859**