



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL LECHO VASCULAR DEL  
TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO, EN FASE  
PROGRESIVA Y REGRESIVA INDUCIDA POR VINCRISTINA

**ENRIQUE LÓPEZ BENNETT**

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

**Profesor Guía: Raquel Cepeda Canales**  
**Proyecto FONDECYT n° 1020980**

**SANTIAGO, CHILE**  
**2007**

# Índice

<b>Resumen</b>	3
<b>Abstract</b>	4
<b>1. Introducción</b>	5
<b>2. Revisión bibliográfica</b>	7
2.1. Angiogénesis	7
2.1.1. Antecedentes generales	7
2.1.2. Factores angiogénicos	11
2.1.3. Angiogénesis tumoral	13
2.1.4. Terapia antiangiogénica	15
2.1.5. Factor de vonWillebrand	17
2.2. Tumor Venéreo Transmisible Canino	19
2.2.1. Antecedentes generales	19
2.2.2. Presentación clínica	21
2.2.3. Diagnóstico	22
2.2.4. Tratamiento y Vincristina	23
<b>3. Objetivos</b>	27
<b>4. Material y Método</b>	28
4.1. Material	28
4.1.1. Biológico	28
4.1.2. Anticuerpos	28
4.2. Método	29

4.2.1. Inmunohistoquímica	29
4.2.2. Técnicas histológicas convencionales	30
4.2.3. Análisis de resultados	30
4.2.4. Análisis estadístico	31
<b>5. Resultados</b>	<b>32</b>
5.1. Área vascular	32
5.2. Características Histopatológicas del TVT en fase progresiva	35
5.3. Características Histopatológicas del TVT en fase regresiva	36
<b>6. Discusión</b>	<b>38</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>43</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>53</b>

## Resumen

El tratamiento del Tumor Venéreo Transmisible canino es una práctica que se realiza hace décadas con gran efectividad. Si bien se han probado diferentes drogas, el sulfato de vincristina es el medicamento de elección para lograr la remisión de la neoplasia. Sin embargo, los mecanismos por los que esto se logra, parecen ser más complejos que la acción citotóxica sobre las células neoplásicas y pudiesen tener relación con la angiogénesis del tumor.

Así, en este estudio se analizó el efecto de la vincristina sobre el lecho vascular del Tumor Venéreo Transmisible de presentación natural. Para esto, se utilizaron biopsias de tumores de ocho perros obtenidas antes y después del tratamiento con sulfato de vincristina. Luego, con las muestras tumorales se procedió a cuantificar el área del lecho vascular marcada con anticuerpo anti-factor de vonWillebrand y a describir los cambios morfológicos observados en los cortes con tinciones de Hematoxilina-Eosina y Van Gieson.

Una vez realizado el análisis estadístico, se observó una disminución significativa ( $p \leq 0,05$ ) del área del lecho vascular de las muestras tumorales con tratamiento al compararlas con las muestras no tratadas.

En conclusión, el sulfato de vincristina es capaz de disminuir el área del lecho vascular de manera significativa, sugiriendo así tener un efecto antiangiogénico sobre el Tumor Venéreo Transmisible del canino.

## **Abstract**

The canine Transmissible Venereal Tumour treatment is a practice performed with great effectiveness. Several drugs have been tested being vincristine the choice medicine to achieve the remission of the tumour. Although, the mechanisms by which this is achieved seems to be more complex than the citotoxic action over the tumour cells and might be related to angiogenesis of the tumour.

Thus in this study it was analyzed the effect of the vincristine on the vascular network of the Transmissible Venereal Tumour of natural presentation. For this, we used biopsy that were obtained from eight dogs before and after of the treatment with the vincristine. Then, it was proceeded to the quantification of the area of the vascular network delimited with the antibody anti vonWillebrand factor followed by the description of morphological changes observed in the in stained slices with Hematoxilina-Eosina and Van Gieson.

Once realized the statistic analyses, it was observed a significant diminution ( $p \leq 0,05$ ) of the vascular network area of the samples of the tumour with treatment phase compared with their counterpart before the treatment.

In conclusion, the vincristine is capable of diminish the area of the vascular network in a significant way, suggesting an antiangiogenic effect in the Transmissible Venereal Tumour of the canine.

# **1. Introducción**

El lecho vascular está compuesto por un sistema organizado en arterias, capilares y venas, los cuales permiten un aporte continuo de sangre a todos los tejidos del cuerpo. La formación de los vasos sanguíneos es un proceso complejo que implica la interacción perfectamente coordinada de múltiples factores.

La formación de dichos vasos comprende dos procesos distintos: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis supone la formación de vasos sanguíneos en un tejido previamente avascular, mientras que la angiogénesis se basa en la producción de capilares nuevos a partir de vasos preexistentes (Carmeliet y Jain, 2000).

Esos eventos son fundamentales para muchos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, el ciclo menstrual y la cicatrización de heridas. Sin embargo, esta actividad también se observa en procesos patológicos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes.

La neovascularización está gatillada por múltiples causas como factores proangiogénicos y antiangiogénicos, cambios genéticos y alteraciones tisulares. El proceso angiogénico debe ser estrechamente regulado, para lo cual es necesario que las diferentes moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas, se encuentren en un equilibrio dinámico (McNamara *et al.*, 1998). Cuando este equilibrio se rompe, se establecen condiciones que facilitan el desarrollo de enfermedades, entre ellas el cáncer.

En el campo de la medicina veterinaria, las neoplasias son patologías cada vez más frecuentes. Así, los tumores han dejado de ser un hecho aislado entre los animales de compañía, siendo el de mayor presentación en la Región Metropolitana el tumor venéreo transmisible (TVT) canino (Flores *et al.*, 1989). El TVT es una neoplasia de células redondas e indiferenciadas que se trasplantan alogenicamente entre los individuos, afectando a la familia de los cánidos (Mizuno *et al.*, 1996).

Una de las alternativas para el tratamiento de las neoplasias es la quimioterapia, y como se sabe, no siempre es inocua para los pacientes. Hoy en día se investiga la manera de abordar a los tumores con técnicas más selectivas, que ataquen directamente a las células neoplásicas y tengan el mínimo efecto tóxico sobre el resto de la población celular. Esta búsqueda ha llevado a la aparición de un nuevo blanco al cual atacar: la angiogénesis, proceso fundamental mediante el cual el tumor es capaz de crecer.

El tratamiento quimioterapéutico de elección para el TVT es el sulfato de vincristina, droga que en dosis terapéuticas provoca la remisión de la masa tumoral. Sin embargo, y a pesar de la gran irrigación que caracteriza esta neoplasia, no hay estudios de los efectos de la vincristina sobre el lecho vascular de este tumor, por lo tanto, el objetivo de este proyecto es estudiar los cambios morfométricos de los vasos sanguíneos antes y durante el tratamiento con sulfato de vincristina.

## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Angiogénesis**

#### **2.1.1. Antecedentes generales**

En 1935 Hertig y colaboradores acuñaron por primera vez el término angiogénesis, para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta. Estudios realizados desde 1970 -año en que se aisló por primera vez un factor angiogénico de un tumor- permitieron sustentar la hipótesis propuesta por Folkman en 1971 (López-Graniel y Meneses, 2000) la cual postulaba que el crecimiento tumoral es angiogénesis dependiente (Folkman, 1971; Folkman, 2000).

Las células mamíferas requieren de oxígeno y nutrientes para su sobrevivencia, por lo tanto se ubican no más allá de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de los vasos sanguíneos, distancia límite para la difusión del oxígeno. De esta manera, cualquier crecimiento multicelular más allá de esta distancia debe reclutar nuevos vasos sanguíneos ya sea por vasculogénesis o angiogénesis (Carmeliet y Jain, 2000).

La vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de células indiferenciadas. Ésta es iniciada por células madre conocidas como hemangioblastos, que se diferencian para formar células hematopoyéticas y angioblastos. Estas últimas, son las que proliferan y se diferencian para formar la red primitiva de vasos sanguíneos llamado plexo vascular primario (Risau, 1997; Bergers y Benjamin, 2003). Los angioblastos se unen a los



pericitos, células perivasculares que recubren los capilares y demás vasos sanguíneos; en los vasos mayores, las células perivasculares forman músculo liso (Escobar, 2002). Si bien la vasculogénesis se produce principalmente en el embrión, también está involucrada en la vascularización de algunos tumores sólidos (Jain, 2003; Bergers y Benjamin, 2003). En este caso, células precursoras endoteliales pueden ser movilizadas desde la médula ósea y transportadas a través del torrente sanguíneo para ser incorporadas en las paredes de los vasos en crecimiento.

Por su parte, la angiogénesis, es el surgimiento de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes (McNamara *et al.*, 1998; Griffioen y Molema, 2000; Sánchez, 2001; Bergers y Benjamin, 2003), lo que es una sucesión de eventos fundamentales para muchos procesos fisiológicos, así como también para patológicos. Se trata de un proceso dinámico que es estrechamente controlado por un gran número de factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Este ajustado balance entre ambos tipos de factores, mantiene a los endotelocitos normalmente en estado de quiescencia y sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas entran en actividad (Denekamp, 1993; Folkman, 1995; Bergers y Benjamin, 2003).

El crecimiento del tejido normal, el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual son procesos fisiológicos que se caracterizan por la dependencia de la formación de nuevos vasos sanguíneos para el suministro de oxígeno, nutrientes y la excreción de productos de desecho (Griffioen y Molema, 2000; Bergers y Benjamin, 2003). Así, durante la angiogénesis fisiológica se forman nuevos vasos sanguíneos que rápidamente maduran y se vuelven estables (Bergers y Benjamin, 2003). A diferencia de lo anterior, en la angiogénesis

patológica se ha perdido el adecuado balance entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos (Bergers y Benjamin, 2003).

Entre las patologías asociadas a deficiente vascularización se encuentran: la cardiopatía isquémica y la isquemia de las extremidades en diabéticos. En otras enfermedades, la angiogénesis excesiva es parte de patologías como: cáncer (sólidos y hematológicos), inflamación crónica (artritis reumatoídea), diabetes (retinopatía diabética), psoriasis, endometritis, síndrome del ovario poliquístico y adiposidad (Griffioen y Molema, 2000). De ésta manera, células endoteliales que normalmente muestran un recambio que puede durar hasta años (Denekamp, 1993), pueden proliferar en cuestión de días si existe un desbalance a favor de los factores angiogénicos (Folkman, 1995).

Hay varios factores que pueden romper el equilibrio o activar el interruptor de la angiogénesis, siendo la disminución de la presión de oxígeno el principal estimulante de la formación de nuevos vasos sanguíneos. La hipoxia genera en el citoplasma celular un factor de transcripción inducible que se trasloca en el núcleo para activar el elemento de respuesta a la falta de oxígeno, mecanismo observado en la isquemia tisular, en el desarrollo de la vascularización embrionaria (Escobar, 2002) y en la angiogénesis de los tumores. Este proceso provoca la secreción de factores proangiogénicos, principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y estimula la formación de nuevos vasos para suplir la necesidad de oxígeno. Una vez reestablecida la tensión de  $O_2$  se inhibe la producción de factores proangiogénicos y se vuelve al equilibrio inicial.

Otros detonantes son la disminución de pH, hipoglicemia (factores metabólicos), tensión mecánica (generado por las células en proliferación), respuesta de células inflamatorias y mutaciones genéticas (activación de oncogenes o inhibición de supresores de éstos) (Carmeliet y Jain, 2000).

Según lo expuesto por Griffioen y Molema en el 2000, la angiogénesis es un proceso complejo que comprende tres etapas:

1. Activación celular: La angiogénesis se gatilla rápidamente ante estímulos como hipoxia o condiciones de isquemia. Estos estímulos actúan sobre las células endoteliales, tumorales, inflamatorias o macrófagos induciendo la producción de factores pro angiogénicos, como el VEGF, los cuales a su vez inducen –por medio de óxido nitroso- vasodilatación y permeabilidad vascular.
2. Migración y proliferación celular: Las células endoteliales ya activadas -y a través de metaloproteinasas (MMPs)- inducen la degradación de la membrana basal (MB) y la matriz extracelular (MEC). En esta etapa, juega un rol muy importante el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF  $\beta$ ), el cual incrementa la motilidad y potencia la proliferación celular. Además, modula el nivel de integrinas, encargadas de activar la adhesión de las células y la MEC.
3. Maduración de la neovasculatura: Las células endoteliales interactúan con células mesenquimáticas y la MEC -lo que es prerequisite para formar una vasculatura estable-. En esta etapa también actúan varios factores, entre éstos, el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que es mitógeno y quimiotáctico de células mesenquimales; y el factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGF- $\alpha$ ) que induce la diferenciación celular y la formación del tubo vascular. En ésta etapa son reclutados precursores celulares de fibras de músculo liso y pericitos los que finalmente maduran y se depositan en la MB cesando el crecimiento del nuevo vaso.

### 2.1.2. Factores angiogénicos

Desde que Judah Folkman identificó el primer factor angiogénico en los años 70, se han descrito muchos factores que bien favorecen o inhiben la angiogénesis. Algunos de los principales reguladores proangiogénicos incluyen factores de crecimiento tales como el VEGF, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y los factores de crecimiento transformantes alfa y beta (TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) (Griffioen y Molema, 2000). Otros factores son la interleuquina-8 (IL-8), la leptina y la angiogenina. Entre los factores que limitan la angiogénesis –factores antiangiogénicos- se encuentran la angiostatina, la endostatina, la trombospondina-1 (Beecken *et al.*, 2005), angiopoyetina-2 (Folkman, 2000), el interferón  $\alpha$  y la interleuquina-12 (IL-12) (McNamara *et al.*, 1998). Si bien se ha identificado la función de algunos de ellos, no está claro el papel que desarrollan muchos de estos factores. Estas moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas son emitidas por células cancerígenas, endoteliales, sanguíneas y células de la MEC, entre otras (Carmeliet y Jain, 2000).

El VEGF es el más potente factor angiogénico directo conocido (McNamara *et al.*, 1998). Es una proteína homodimérica de 34-46-kDa producida por varios tipos celulares en respuesta a diferentes estímulos. Esta proteína actúa sobre las células endoteliales vasculares

uniéndose a receptores transmembrana específicos, activando rutas de transducción de señales que dan lugar a una cascada de efectos. Además, el VEGF tiene efectos sobre las células endoteliales linfáticas y las células efectoras inmunitarias (Gardiner-Caldwell Communications, 2004). La actividad del VEGF está determinada a través de la inducción o la supresión del gen del VEGF (McNamara *et al.*, 1998).

La importancia del VEGF queda ilustrada por su papel fisiológico en la embriogénesis y en el crecimiento postnatal temprano, así como por su importante papel en varias enfermedades, en particular el cáncer. En pacientes con ésta patología, los niveles de VEGF se encuentran elevados, tanto en la circulación como en el tejido tumoral. Esto refleja el hecho que los tumores -que tienden a ser hipóxicos- generan un entorno local que estimula la producción de VEGF (Gardiner-Caldwell Communications, 2004).

Se ha descrito una asociación significativa entre los niveles de VEGF en el plasma, la etapa de la enfermedad y las metástasis. Así, los tumores desarrollan metástasis cuando las células tumorales invaden el sistema vascular o linfático y se desplazan a una zona distante donde se siembran y crecen. Estas observaciones sugieren que angiogénesis y linfangiogénesis, que son inducidas por el VEGF, son relevantes para las metástasis tumorales (Gardiner-Caldwell Communications, 2004).

Entre los factores antiangiogénicos más conocidos se encuentra la angiostatina, fragmento de 38-kDa capaz de inhibir angiogénesis, permitiendo que las células endoteliales entren en estado de quiescencia (McNamara *et al.*, 1998). Una ventaja sobre la quimioterapia es que la angiostatina no tiene efecto sobre las células tumorales y por lo tanto no genera

resistencia de las células neoplásicas como ocurre con la quimioterapia convencional (Escobar, 2002).

### 2.1.3. Angiogénesis tumoral

Se considera que existen dos fases intrínsecas al desarrollo de la neoplasia (López-Graniel y Meneses, 2000), una fase prevascular y otra vascular, propiamente tal:

- La primera o fase prevascular ha sido descrita ampliamente en estudios de líneas celulares de carcinomas de cérvix, vejiga y mama, la cual puede persistir por años y usualmente se asocia con crecimiento limitado del tumor y sin capacidad de hacer metástasis.
- La segunda o fase vascular se caracteriza por una rápida multiplicación de las células tumorales y neoformación de vasos sanguíneos de forma acelerada.

La mayoría de los tumores se desarrollan de una lesión primaria “*in situ*”, no mayor de 2 a 3 mm de diámetro, de proceso asintomático, que puede permanecer totalmente avascular por meses o años (Beecken *et al.*, 2001) antes que el aporte de nutrientes llegue a ser limitado desde los vasos sanguíneos circundantes (Gimbrone *et al.*, 1972) y no continuará su crecimiento hasta que desarrolle la capacidad de formar su propia red vascular (Dameron *et al.*, 1994). Así, un pequeño grupo de células tumorales cambia a un fenotipo angiogénico y se inicia una rápida vascularización (Escobar, 2002). Esta inducción inicial de la vasculatura se denomina “*switch* angiogénico”, el que depende del tipo tumoral y del ambiente que lo rodea (Bergers y Benjamin, 2003). De esta manera, la angiogénesis, que tiene funciones limitadas en los organismos adultos, contribuye de forma importante en el desarrollo de las neoplasias.

El grado de angiogénesis logrado por una neoplasia es el resultado de la compleja interacción entre células tumorales, células endoteliales, pericitos, el reclutamiento de células inmunes y la producción de todas éstas células actuando en los sistemas autocrino y paracrino (McNamara *et al.*, 1998).

Estos nuevos vasos presentan estructuras y funciones anómalas, generalmente ineficientes, que provocan amplias zonas de hemorragia, inducción de apoptosis y necrosis central del tumor. Poseen forma irregular (Chang *et al.*, 2000), son dilatados, con diámetros desiguales y tortuosos (Folkman, 2000). Según lo expresado por Bergers y Benjamin (2003), estos vasos son fenestrados y propensos a hemorragias, debido a que son más permeables de lo normal y no siempre interconectados, además, carecen de organización en vénulas, arteriolas y capilares como se observa en la vasculatura normal. Por otra parte, estos vasos sanguíneos tumorales nunca se vuelven inactivos permitiendo el constante crecimiento de los mismos, con lo que perpetúan el desarrollo tumoral (Bergers y Benjamin, 2003).

La angiogénesis no solo es fundamental para el crecimiento tumoral si no que además define su agresividad ya que le dará autonomía para poder crecer, ser invasivo y capaz de metastizarse (McNamara *et al.*, 1998; Beecken *et al.*, 2001). Así y como en los tumores primarios, la metástasis también es angiogénesis dependiente (Weidner *et al.*, 1991; McNamara *et al.*, 1998; Beecken *et al.*, 2001). De hecho, el riesgo de metástasis en algunos tumores –como el cáncer de mama- puede predeterminarse a través de la densidad de la microvasculatura del tumor primario (Beecken *et al.*, 2001).

#### 2.1.4. Terapia antiangiogénica

La búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer ha demandado grandes esfuerzos en el mundo científico, ya que las neoplasias son la segunda causa más importante de mortalidad en la población humana después de las enfermedades cardiovasculares (González, 1994).

La absoluta dependencia tumoral de la angiogénesis para poder crecer más allá de un tamaño milimétrico, llevó a crear el concepto de “terapia antiangiogénica” como una nueva alternativa (Folkman, 1995) o complemento a las terapias anticancerosas actualmente conocidas (Beecken *et al.*, 2001).

El objetivo que se persigue con la aplicación de un tratamiento antiangiogénico es reducir y mantener los tumores como grupos celulares pequeños y relativamente “estables”, que tengan un potencial mitótico limitado para que sean más susceptibles al ataque inmunológico (Folkman, 1971; Uhr, *et al.*, 1997), así como más vulnerables a la quimioterapia y radioterapia (Teicher *et al.*, 1994; Teicher *et al.*, 1996; McNamara *et al.*, 1998).

Según McNamara *et al.*, (1998), las terapias antiangiogénicas pueden actuar de manera directa o indirecta sobre la angiogénesis:

- Factores antiangiogénicos directos: Dentro de este grupo se reconocen sólo dos factores: angiostatina y endostatina. Estos actúan de manera directa mediante la inhibición de la proliferación de las células endoteliales vasculares. Ambos factores han demostrado en distintos estudios que son capaces de reducir el crecimiento tumoral.



- Factores antiangiogénicos indirectos: Entre éstos encontramos interferón  $\alpha$  y  $\beta$ , IL-12, entre otros. En este caso, la terapia actúa influenciando el microambiente de la neoplasia el cual regula la angiogénesis tumoral y así, indirectamente, influencia en el desarrollo del endotelio vascular. La mayoría de los agentes antiangiogénicos pertenecen a este tipo de factores.

Sin embargo, y si bien en un comienzo se creía que los factores antiangiogénicos eran efectivos sólo después de producida la neovascularización, se ha demostrado que al menos un inhibidor angiogénico -angiopoyetina 2- puede actuar antes que el tumor comience a producir sus propios vasos y así conducir a la erradicación del tumor naciente. Este hallazgo nos lleva a un nuevo concepto de terapia antiangiogénica: la prevención del cáncer en pacientes con alto riesgo de contraer la enfermedad (Folkman, 2000).

Independiente de si la terapia antiangiogénica actúa de manera indirecta, directa o preventiva, hay que considerar también el fenotipo de cada neoplasia. Así, cada tumor tiene un único y complejo microambiente dictado por su histología y su sitio de implantación, además, dentro de cualquier tumor la heterogenicidad aumenta debido a variaciones en la densidad del estroma, grado de diferenciación del tumor, hipoxia y citokinas del mismo, entre otros, (McNamara *et al.*, 1998) por lo que para hacer una terapia antiangiogénica exitosa es posible que se necesiten dos o más factores antiangiogénicos combinados (Beecken *et al.*, 2001).

Debido a que los agentes antiangiogénicos son más citoestáticos que citotóxicos (McNamara *et al.*, 1998), la finalidad de estos puede diferir de las quimioterapias corrientes. Conjuntamente, la aplicación de una terapia antiangiogénica y una quimioterapia citotóxica no

son mutuamente excluyentes, ya que ambas van dirigidas a diferentes blancos celulares, por lo que su combinación es una útil herramienta contra los tumores (Rosen, 2000; Hurwitz, *et al.*, 2005).

Así, agentes angiogénicos como el VEGF, tienen la capacidad de aumentar la permeabilidad vascular (Folkman, 2000), lo que se traduce en un aumento de la presión intratumoral y como consecuencia, genera una pobre distribución de los agentes anticancerígenos dentro del tumor. Si se disminuye la presión intratumoral y se provoca la regresión de la vasculatura de la neoplasia mediante el empleo de fármacos antiangiogénicos, se puede favorecer una penetración más efectiva de los agentes citotóxicos (McNamara *et al.*, 1998; Griffioen y Molema, 2000; Jain, 2003) logrando así una terapia conjunta. El mecanismo de acción de algunos de estos compuestos no es completamente entendido, aunque sus propiedades antiangiogénicas han sido demostradas en modelos animales y en pruebas “*in vitro*”. El definir el mecanismo de acción específico permanece como una pregunta abierta en muchos casos (Rosen, 2000).

### **2.1.5. Factor de vonWillebrand**

La angiogénesis puede ser medida por microscopia de luz, a través de la cuantificación de los vasos sanguíneos que se encuentran presentes en áreas de gran densidad vascular en los tejidos. El recuento de microvasos en una sección de tumor, da una estimación del resultado neto o fase de la angiogénesis o angioregresión por la que pueda estar cursando la neoplasia. Según Vermeulen *et al.*, (2002), el fundamento de contar microvasos en áreas donde existe numerosa microvascularización, es que estas áreas son originadas desde los clones de las

células tumorales con el mayor potencial angiogénico y consecuentemente, facilitando el crecimiento tumoral.

Los vasos sanguíneos pueden ser detectados por la aplicación de anticuerpos con afinidad por epítomos específicos de las células endoteliales, tales como el factor de vonWillebrand (vWF), CD31 y CD34, entre otros (Hanahan y Folkman, 1996; Gleich *et al.*, 1997; López-Graniel y Meneses, 2000; Vermeulen *et al.*, 2002). Aunque opiniones como cuál de los marcadores inmunohistoquímico ofrecen los mejores resultados en términos de cuantificación de angiogénesis son conflictivas, vWF y CD31 son los más recomendados por la literatura (Gleich *et al.*, 1997; Vermeulen *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2005). No obstante, cuando anticuerpos como vWF son usados para detectar células endoteliales, se recomienda al menos la medición de 5 campos microscópicos por sección (Vermeulen *et al.*, 2002).

El vWF es una glicoproteína multimérica codificada por un gen del cromosoma 12. Posee un tamaño de 450 a más de 10.000 kDa de peso molecular, sin embargo, su tamaño molecular final está dado por enzimas con actividad metaloproteasas sobre la cadena peptídica del vWF (Gil-Bazo *et al.*, 2003a). Esta glicoproteína es sintetizada como un precursor llamado pro-vWF, por células del endotelio vascular, por megacariocitos y está contenido en plaquetas (Mannucci, 1998; Gil-Bazo *et al.*, 2003b). Durante la biosíntesis del vWF en la célula endotelial, la proteína vWF es ensamblada en multímeros que son almacenados en gránulos secretorios, llamados cuerpos de Weibel-Palade (Ewenstein *et al.*, 1987). En circulación, el vWF interviene de forma indirecta en la vía intrínseca de la coagulación como portador del factor VIII -factor anti hemofílico- (Gil-Bazo *et al.*, 2003a).

## 2.2. Tumor Venéreo Transmisible Canino

### 2.2.1. Antecedentes generales

El tumor venéreo transmisible (TVT) canino fue descubierto por el veterinario ruso Novinsky en 1876 (Amariglio *et al.*, 1991; Das y Das, 2000). Sin embargo, Stiker fue el primero en describirlo -en la primera década del siglo veinte-, de ahí que se le conoce como sarcoma de Stiker. También es conocido como tumor venéreo transmisible, granuloma venéreo, condiloma canino, sarcoma infeccioso (Gurel *et al.*, 2000), sarcoma venéreo transmisible (Mizuno *et al.*, 1996) y linfosarcoma transmisible (Martins *et al.*, 2005). Este tumor, ampliamente documentado, también ha sido descrito como un tumor reticuloendotelial benigno (Martins *et al.*, 2005).

Esta es una neoplasia de células redondas (Mizuno *et al.*, 1996), cuyo origen exacto permanece desconocido. Sin embargo técnicas inmunohistoquímicas recientes sostienen la idea de un origen histiocítico (Rogers, 1997; Vergara, 2001).

El TVT canino es una enfermedad de transmisión sexual que generalmente afecta a los órganos genitales externos de los perros (Amariglio *et al.*, 1991; Mizuno *et al.*, 1996) y en su presentación natural sólo afecta a la familia de los cánidos (Rogers, 1997). Este se caracteriza por ser el único tumor conocido que puede ser transplantado de manera natural (Amariglio *et al.*, 1991; González *et al.*, 2002) como un aloinjerto superando la barrera del complejo mayor de histocompatibilidad dentro de la misma especie, e incluso en otros miembros de la familia de

los cánidos, como zorros, coyotes, lobos (Booth, 1994; Park *et al.*, 2006) y chacales (Gurel *et al.*, 2000).

Esta patología se encuentra distribuida por todo el planeta, sin embargo, es de mayor incidencia en áreas geográficas de climas templados a cálidos (Pérez *et al.*, 1978). Particularmente, se observa en ciudades y zonas rurales del sur de Estados Unidos, América del Sur y Central, sureste de Europa, Irlanda, Japón, China, en el Medio y Lejano Oriente y partes de África (Higgins, 1966). En Turquía (Gurel *et al.*, 2000) y en Japón también se indica como el tumor más común de los perros (Tateyama *et al.*, 1986). Si bien en países desarrollados es considerado como una enfermedad presente, es de baja prevalencia (2.64%) (Ortega-Pacheco *et al.*, 2003).

Su presentación es generalmente en perros jóvenes (1 a 6 años) lo que se puede explicar por su mayor actividad sexual y en perros mestizos por su tendencia a vagar por las calles, lo que aumentaría la posibilidad de contagio (Flores *et al.*, 1989). Además, se ha descrito en mayor proporción en hembras que en machos (Sousa *et al.*, 2000).

Algunos investigadores indican que el TVT posee un patrón de crecimiento predecible, ya que en la naturaleza y en casos experimentales posee una fase de crecimiento progresivo, fase estática y fase de regresión (Chu *et al.*, 2001; Mukaratirwa y Gruys, 2003). Otros autores proponen que el TVT en un comienzo, crece rápidamente y luego tiene una fase estática temporal, con eventuales procesos de regresión espontánea luego de varios meses (Park *et al.*, 2006). En los casos en que existe regresión, la misma está asociada a incrementos de infiltración linfocítica tumoral y es caracterizada por el aumento de apoptosis y fibrosis tumoral

(Torres, 1999; Park *et al.*, 2006). Sin embargo, y como no existen datos precisos sobre la presentación de regresión espontánea en la enfermedad natural (Brown *et al.*, 1980) el tratamiento de esta enfermedad es una práctica que no ha podido abandonarse.

### **2.2.2. Presentación clínica**

Las membranas mucosas de los genitales externos constituyen las zonas de presentación más frecuente de la patología (Flores *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006). Menos comúnmente, el tumor puede también ser transplantado a la cavidad nasal u oral, la piel, paladar blando (Booth, 1994) y al recto como consecuencia de olfateo, lamido (Park *et al.*, 2006) o rasguño (Gurel *et al.*, 2000).

En órganos genitales y durante la fase de crecimiento rápido del tumor, su color es rojo brillante debido a su extensa vascularización. A menudo exuda un fluido serosanguinolento o simplemente hemorrágico y eventualmente llega a ulcerarse, con apariencia necrótica. La descarga es continua desde los genitales externos, cayendo al piso, alfombras e incluso ropas, siendo una gran molestia para el propietario (Das y Das, 2000). Además de la descarga genital, se puede presentar deformación en el área, hedor anormal y masas visibles con forma de coliflor (Rogers, 1997; Gurel *et al.*, 2000; Das y Das, 2000) y de consistencia friable. En las zonas extragenitales, el tumor suele presentarse como nódulos con úlceras de distintos tamaños que pueden invadir mucosa y submucosa (Gurel *et al.*, 2000). Si la presentación es nasal, se produce descarga sanguinolenta o -en casos muy avanzados- deformación del rostro (Rogers, 1997).

Las metástasis se desarrollan en menos del 5 % de los casos (Yang, 1987) lo que coincide con un estudio realizado en perros en los cuales se inocularon células de TVT en pulmones y sólo en el 3 % de los casos se presentaron metástasis de los tumores desarrollados (Ahrar *et al.*, 2002). Sin embargo, Dass y Sahay en 1989 describieron un porcentaje un poco mayor, un 7 %. Por otra parte, se ha indicado que el desarrollo de metástasis sólo se observa en perros inmunosuprimidos y en cachorros (Amariglio *et al.*, 1991; Chu, *et al.*, 2001; Mukaratirwa y Gruys, 2003) o animales mal nutridos (Park *et al.*, 2006).

Las metástasis se han detectado en órganos como: tonsilas, ojos, pulmón, hígado, bazo, riñón, músculos (Park *et al.*, 2006), cerebro (Gurel *et al.*, 2000), hipófisis y médula ósea (Martins *et al.*, 2005), que se han diseminado a partir de un tumor genital primario (Park *et al.*, 2006).

### **2.2.3. Diagnóstico**

El diagnóstico se realiza en base a la historia clínica, examen físico y hallazgos citológicos. La biopsia para el estudio histopatológico del tumor es el método más confiable para el diagnóstico (Das y Das, 2000).

La observación citológica del frotis de la zona tumoral -en fase progresiva-, revela la presencia de células tumorales, células epiteliales, eritrocitos, bacterias (en algunos casos), neutrófilos y linfocitos. Las células de TVT presentan forma redondeada a ovoide, con el núcleo hipercromático, cromatina marginal y nucleolos grandes ubicados centralmente. El citoplasma es abundante, pálido, moderadamente basófilo y con numerosas vacuolas (Yang, 1987; Gurel *et al.*, 2000; Duarte, 2002). En frotis tomados de tumores que presentan ulceración

y hemorragia superficial, se pueden apreciar bacterias, neutrófilos y eritrocitos (Nak *et al.*, 2005).

En biopsias del tumor, las células se caracterizan por ser redondas, con pequeñas vacuolas citoplasmáticas, numerosas figuras mitóticas y la presencia de abundante cantidad de células inflamatorias como linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y neutrófilos. El estroma tumoral es escaso y rodea a las células separándolas en lobulillos (Booth, 1994; Rogers, 1997; González *et al.*, 2000).

Por el hecho de considerar al TVT un tumor de células redondas, debe contemplarse el diagnóstico diferencial con linfoma cutáneo, histiocitoma cutáneo y mastocitomas (Booth, 1994; Gurel *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Tratamiento y Vincristina**

Desde hace décadas el tratamiento de elección para el TVT ha sido la quimioterapia. Esto debido principalmente a que otras terapias antitumorales como la radioterapia, que pese a ser efectiva, necesita de personal especializado y del equipo requerido para este procedimiento (Cotchin, 1974). En caso de tumores quirúrgicamente accesibles, la recurrencia posterior a la cirugía es frecuente (Karlson y Mann, 1952). Además, la escisión quirúrgica del TVT es recomendada solamente para presentaciones nodulares o pedunculadas, pequeñas y aisladas (Flores *et al.*, 2000). Por otra parte, la inmunoterapia también ha sido estudiada con algunas respuestas satisfactorias, sin embargo, los resultados han sido esporádicos y la recurrencia frecuente (Rogers, 1997).



Para la realización de la quimioterapia se ha utilizado preferentemente la vincristina, un alcaloide extraído de la planta “*Vinca Rosea Linn*”. Así, los alcaloides de la vinca son agentes específicos del ciclo celular, bloquean la mitosis y producen detención en la metafase por su capacidad para unirse en forma específica a la tubulina y de esta manera bloquean la facultad de las proteínas para polimerizarse en los microtúbulos (Goodman, 1991) imposibilitando la formación del huso mitótico.

Los agentes que se unen a tubulina, como la vincristina, basan su actividad en la diferente sensibilidad de las células endoteliales de los tumores, en comparación con los endoteliecitos de tejidos normales, que no proliferan. “*in vitro*”, en células endoteliales inmaduras o que se encuentran en proliferación, estos agentes rápidamente modifican el citoesqueleto de tubulina alterando la permeabilidad de la membrana (Taraboletti *et al.*, 2005) y deformando las células, la cuales se retraen y adoptan una forma redondeada (Micheletti *et al.*, 2005). “*In vivo*”, se gatilla una cascada de eventos que llevan finalmente a una pérdida de la integridad vascular del tumor, reducción del flujo sanguíneo, disminución del volumen vascular del mismo y la oclusión de los vasos (Davis *et al.*, 2002; Micheletti *et al.*, 2005). Todo esto resulta en una necrosis central masiva del tumor, con una delgada periferia de células viables remanentes, siendo ésta la reacción característica de las drogas que se unen a tubulina (Blakey *et al.*, 2002; Siemann y Rojani, 2002). Sin embargo, estas células tumorales viables pueden repoblar el tumor y así reanudar el crecimiento tumoral, por lo que es necesario repetir el tratamiento (Blakey *et al.*, 2002; McCarty *et al.*, 2004).

En TVT canino, el uso de la vincristina, ha sido descrito en combinación con otros agentes antitumorales en dosis de 0.025 mg/Kg semanalmente hasta la remisión del tumor,

con un 100% de efectividad y sin volver a presentarse (Brown *et al.*, 1980). Posteriormente, se evidenció que su uso por sí sola, en igual dosis, presenta menos efectos colaterales y no requiere de una medicación anexa. Además, es el tratamiento de elección cuando se trata de TVT multifocal o que presenta metástasis (Calvert *et al.*, 1982). Por lo tanto, la terapia sólo con vincristina -administrada vía endovenosa en una dosis semanal de 0.03 mg/Kg hasta la remisión- hoy en día es el más efectivo, seguro y conveniente agente quimioterapéutico, dando como resultado la cura de la enfermedad incluso en pacientes que presentan metástasis extra genitales (Amber *et al.*, 1990; Lombardi, 1995; Singh *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2000).

Los efectos del tratamiento con vincristina se observan en los frotis como una disminución del número de células de TVT y con un aumento de células tumorales en degeneración, es decir, células con la cromatina agrupada, el núcleo deformado, los bordes celulares poco nítidos y vacuolización citoplasmática. Después de la tercera semana de tratamiento, casi todas las células tumorales presentan gran cantidad de vacuolas (Nak *et al.*, 2005).

Histopatológicamente, en respuesta a la quimioterapia, el tumor presenta células tumorales dispuestas en grupos más pequeños que lo observado previo al tratamiento, muchas de ellas en proceso degenerativo, rodeadas de abundante tejido conectivo, principalmente de tipo fibrótico y una marcada infiltración linfocitaria (Torres, 1999; González *et al.*, 2000).

Los efectos secundarios observados durante el tratamiento con vincristina, en general han sido leves pudiendo causar: mielosupresión, leucopenia, efectos gastrointestinales y vómitos en un 5 a 7 % de los pacientes tratados e injuria tisular local, debido a extravasación

del agente al momento de la administración (Rogers, 1997). Además, algunos estudios demuestran que la vincristina tiene efectos degenerativos moderados en los testículos con alteraciones espermáticas, disminución de la motilidad y de la concentración de los mismos. Sin embargo, la normalidad retorna luego de 15 días de finalizado el tratamiento (Martins *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento quimioterapéutico de elección para el TVT es el sulfato de vincristina, droga que en dosis terapéuticas provoca la remisión de la masa tumoral. Sin embargo, y a pesar de la gran irrigación que caracteriza esta neoplasia, no hay estudios de los efectos de esta droga sobre la vasculatura tumoral. Por lo tanto, el objetivo de esta memoria de título fue determinar, en el TVT canino como modelo biológico, el posible efecto antiangiogénico del sulfato de vincristina, a través de la cuantificación del área inmunomarcada de células endoteliales mediante la expresión de vWF, después de la quimioterapia.

### 3. Objetivos

- **Objetivo General:**

-Analizar morfométricamente el comportamiento vascular del tumor venéreo transmisible del canino, en fases de progresión y regresión inducida por vincristina.

- **Objetivos Específicos:**

- Detectar y cuantificar morfométricamente el lecho vascular inmunomarcado en el TVT canino, antes y después del tratamiento con sulfato de vincristina.
- Comparar el lecho vascular del TVT canino en fase progresiva y regresiva inducida por vincristina.
- Describir histológicamente las características de los vasos presentes en ambas fases tumorales.

## **4. Material y método**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Biológico**

Se utilizaron 8 tumores de TVT, de perros adultos, mestizos de ambos sexos y maduros sexualmente, con edades que fluctúan ente 1 y 10 años, que fueron diagnosticados clínicamente por el Servicio de Cirugía de pequeños animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y confirmado por el Servicio de Histopatología de esta misma Facultad.

#### **4.1.2. Anticuerpos**

Reactivos para inmunohistoquímica:

- Anticuerpo primario: anti-factor de vonWillebrand (Rabbit Anti-Human, vonWillebrand Factor. Code No A0082. DAKO A/S, Produktionsvej.42, DK-2600 Glostrup, Denmark).
- Anti-anticuerpo secundario de conejo (Swin anti-Rabbit immunoglobulins. Code No: E0353. DAKO A/S, Denmark).

- Amplificador de reacción: conjugado estreptavidina/peroxidasa (Streptavidin. Code No: P0397. DAKO A/S, Denmark).
- Sustrato cromógeno: 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAKO Liquid DAB Substrate-Chromogen System. Code No: K3465. DAKO Corporation, Carpintería USA).

## **4.2. Método**

De cada animal se obtuvo una primera muestra al momento del examen clínico, logrando así, el tumor en su fase progresiva. Se trató a los perros con sulfato de vincristina, endovenosa, en dosis única de 0,03 mg/kg. A los 7 días postratamiento se obtuvieron biopsias de los tumores en su fase regresiva. Las muestras fueron fijadas en formalina al 10% por 24 horas, luego fueron incluidas en parafina, según métodos convencionales. De este material se obtuvieron los cortes histológicos de 4 micrómetros de grosor usando un microtomo de rotación (Leitz). Una vez obtenidos los cortes fueron colocados en un portaobjetos silanizado (Anexo 1), con el fin de adherir el corte al vidrio y evitar que se suelten durante el tratamiento enzimático. Luego de 24 hrs. en la estufa a 60°C se procedió a desparafinar utilizando xilol, alcoholes descendentes y agua destilada.

### **4.2.1. Inmunohistoquímica**

Para visualizar y cuantificar la actividad angiogénica se utilizó un anticuerpo policlonal anti-factor de vonWillebrand. Luego se empleó un anticuerpo secundario anti-anticuerpo de

conejo biotinilado. Después, se usó el conjugado estreptovidina/peroxidasa como un amplificador de la reacción. Esta reacción enzimática se reveló con DAB dando un color café intenso en las células endoteliales.

Para obtener resultados inmunohistoquímicos adecuados para el tejido y la especie en estudio, se procedió a estandarizar la técnica inmunohistoquímica indirecta. Con este objeto, se realizaron varios ensayos usando diferentes tiempos para la digestión enzimática que permite exponer los epítomos, diferentes concentraciones y tiempos de los anticuerpos usados que permitieron lograr una adecuada reacción inmune. Como control negativo de la inmunohistoquímica, al mismo tiempo de procesar las muestras, se incorporaron placas de los mismos tumores a los cuales se les aplicó el mismo protocolo pero sin utilizar el anticuerpo primario. El protocolo utilizado se describe en el Anexo 2.

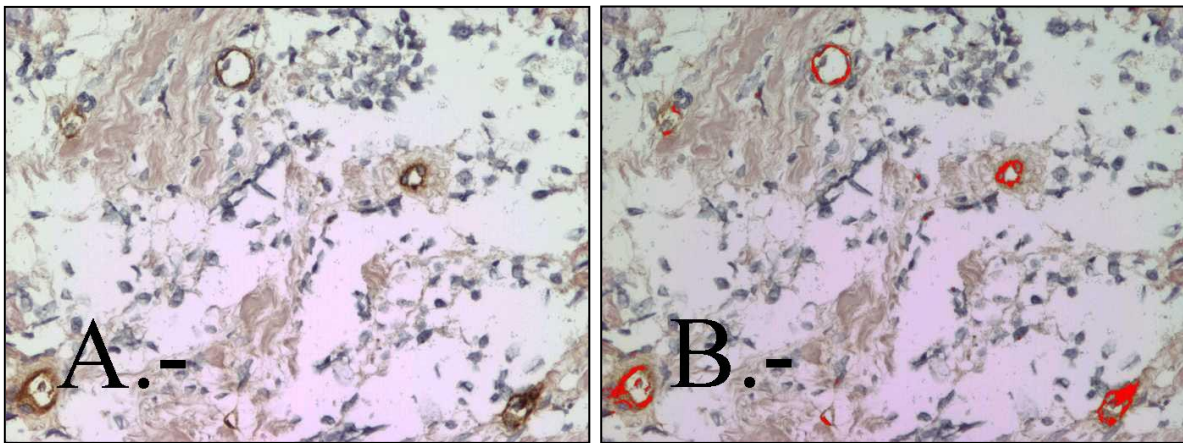
#### **4.2.2. Técnicas histológicas convencionales**

Para realizar la descripción general de los vasos sanguíneos presentes, los cortes de tumores se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E) para observar las características generales del tejido y con Van Gieson (vG) para destacar mejor la matriz extracelular.

#### **4.2.3. Análisis de resultados**

La actividad angiogénica se evaluó mediante la cuantificación del área vascular, en ambas fases del tumor, en 5 campos seleccionados por la presencia de vasos sanguíneos inmunomarcados por cada muestra, con aumento de 200X en un microscopio óptico (Nikon

Eclipse E 600), el cual está conectado a una cámara de video digital (Cool-Snap Pro, Media Cybernetics, USA) y ésta última a un computador. Para la obtención del área inmunomarcada se empleó un programa de análisis morfométrico computacional (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). De la lectura de los 5 campos, se obtuvo el área promedio, la que se expresó en micrómetros cuadrados ( $\mu\text{m}^2$ ). (Figura 1).



**Figura 1 A y B:** Ambas figuras corresponden a la misma muestra en fase regresiva con inmunohistoquímica anti-vWF. A) Microvasculatura de color café. B) Microvasculatura marcada de color rojo con el programa morfométrico computacional. (200X).

#### 4.2.4. Análisis estadístico

Los valores obtenidos de la medición computacional de los lechos vasculares realizadas sobre las imágenes logradas de los tumores en fase progresiva fueron comparados con los valores obtenidos de los tumores en fase regresiva. Con dichos datos se realizó la prueba de t Student para muestras pareadas, para determinar si existían diferencias significativas entre las muestras de ambas fases.

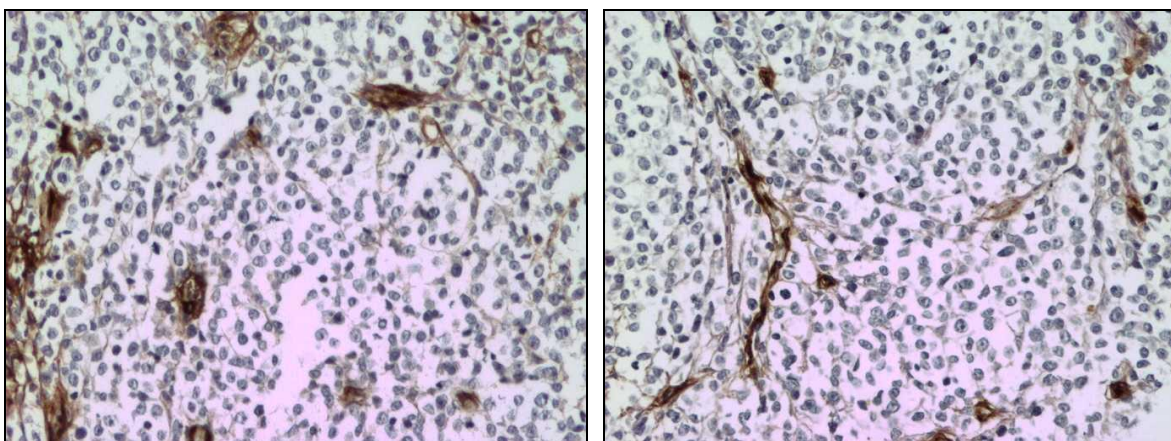


## 5. Resultados

### 5.1. Área Vascular

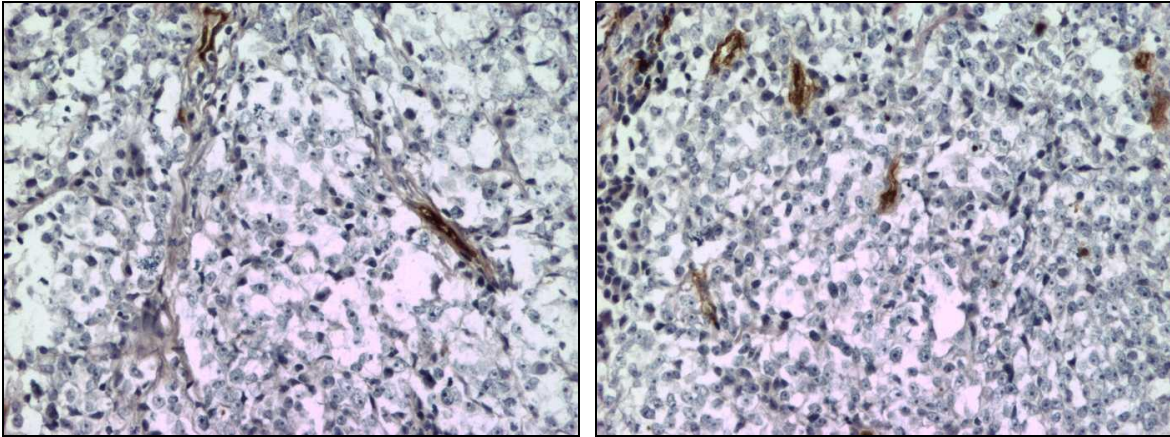
Los siguientes resultados se consiguieron con un total de 80 mediciones incluidas en el análisis, 40 mediciones antes del tratamiento -consideradas en fase progresiva de la enfermedad- y 40 mediciones posterior al tratamiento con vincristina- consideradas en fase regresiva de la enfermedad-. El valor de cada medición está expresado en el Anexo 3.

Las mediciones de las áreas vasculares en los cortes de los tumores, previo a la quimioterapia con vincristina –correspondientes a los tumores en fase progresiva- (Figura 2) arrojan un valor promedio de  $2.686,61 \mu\text{m}^2$ . Donde el valor promedio máximo obtenido fue de  $4.178,17 \mu\text{m}^2$  (muestra 10 A) y el promedio mínimo fue de  $1.259,13 \mu\text{m}^2$  (muestra 15 A). (Tabla 1).



**Figura 2.** Corresponde a muestras en fase progresiva, vasos sanguíneos de color café. Inmunohistoquímica anti-vWF. (200X).

Las mediciones de las áreas vasculares en los cortes de los tumores en fase regresiva del TVT (Figura 3), dieron un valor promedio de  $928,91 \mu\text{m}^2$ . Donde el valor promedio máximo fue de  $1.561,29 \mu\text{m}^2$  (muestra 7 B) y el mínimo de  $648,90 \mu\text{m}^2$  (muestra 15 B). (Tabla 1).



**Figura 3.** Corresponde a muestras en fase regresiva, vasos sanguíneos de color café. Inmunohistoquímica anti-vWF. (200X).

La prueba de t Student indica que las diferencias encontradas en las mediciones del área vascular antes y después del tratamiento con vincristina, son estadísticamente significativas, siendo el valor de  $p \leq 0,05$ . Así mismo, tanto los grupos de los tumores progresivos como regresivos fueron homogéneos ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas dentro de ellos.

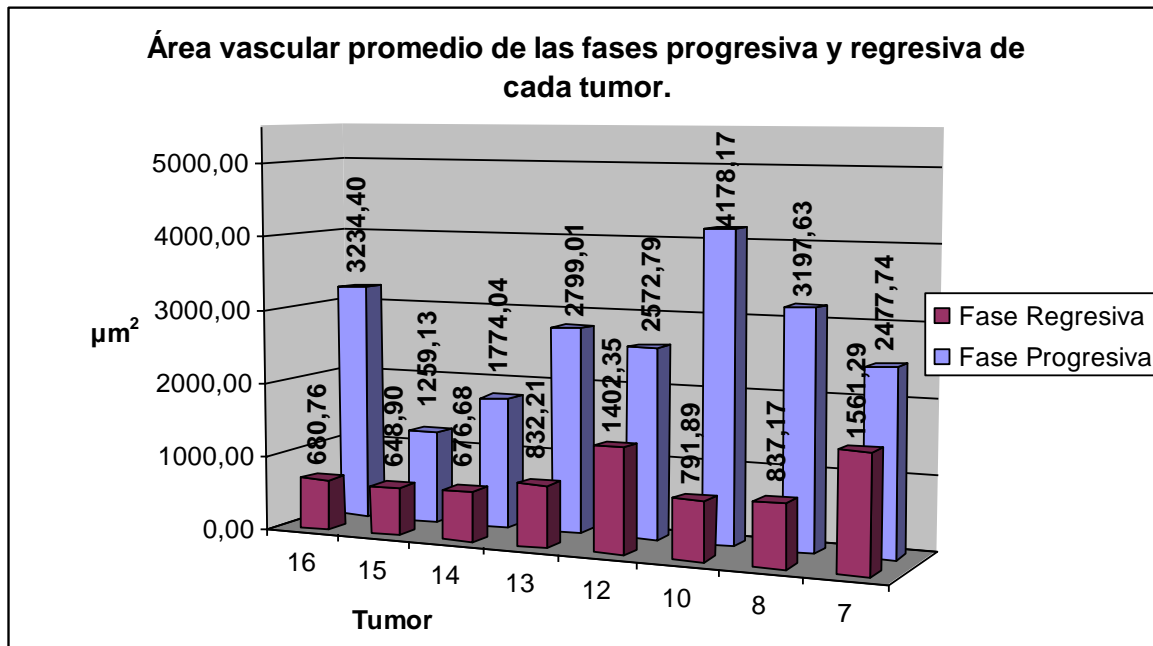
**Tabla 1**

<b>Área vascular promedio de las muestras de TVT progresivo y regresivo, en <math>\mu\text{m}^2</math>.</b>			
<b>Fase Progresiva</b>		<b>Fase Regresiva</b>	
<b>Nombre tumor</b>	<b>Área</b>	<b>Nombre tumor</b>	<b>Área</b>
7A	2477,74	7B	1561,29
8A	3197,63	8B	837,17
10A	4178,17	10B	791,89
12A	2572,79	12B	1402,35
13A	2799,01	13B	832,21
14A	1774,04	14B	676,68
15A	1259,13	15B	648,90
16A	3234,40	16B	680,76
<b>Promedio</b>	<b>2686,61 a</b>	<b>Promedio</b>	<b>928,91 b</b>

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para  $p \leq 0,05$

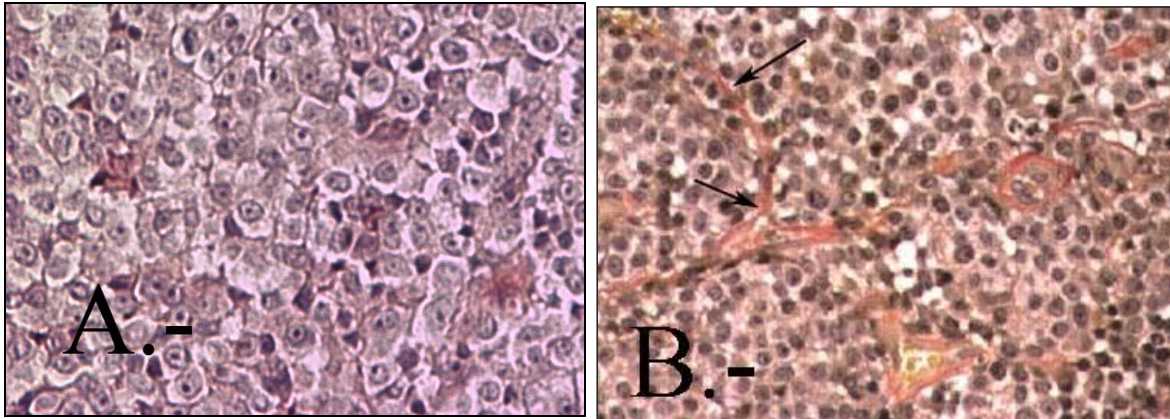
En el Gráfico 1 se muestran los resultados de los valores promedios de las áreas vasculares en fase progresiva y regresiva de cada tumor.

**Gráfico 1**



## 5.2. Características Histopatológicas del TVT en fase progresiva

En los cortes histológicos teñidos con H-E y vG, se puede apreciar que la fase de crecimiento tumoral progresiva se caracterizó por el predominio de una población uniforme de células tumorales grandes, redondeadas u ovaladas, de escaso citoplasma y dispuestas en grupos compactos. Los núcleos se presentaron grandes y redondeados, con nucleolos prominentes y excéntricos. Estos grupos de células están circundadas por tabiques de fibras de colágeno de color rojo con vG. Por otro lado, se visualizaron áreas aisladas de infiltración leucocitaria, principalmente alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 4).

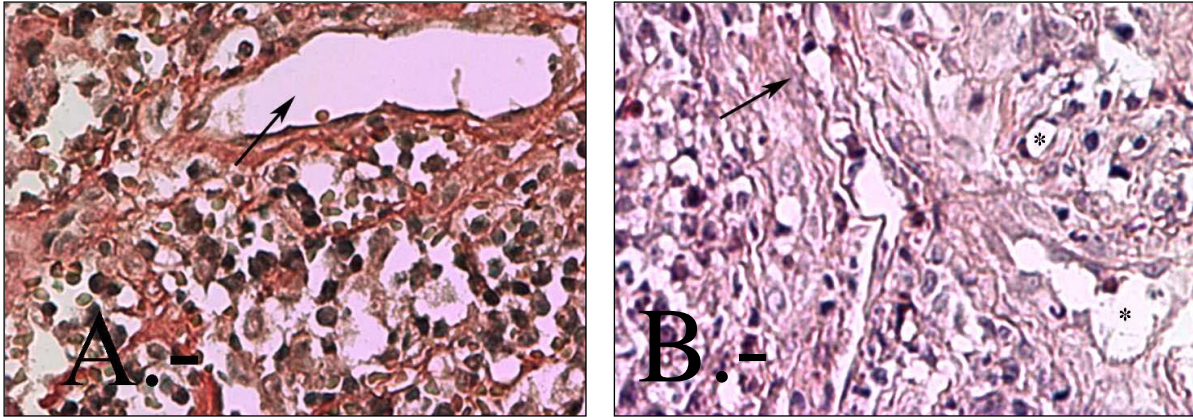


**Figuras 4 A y B:** Corresponden a muestras en fase progresiva. A) Fibras colágenas tipo I eosinófilas, núcleos azules, tinción con H-E. B) Fibras colágenas tipo I rojas, núcleos café, vasos sanguíneos (→), tinción de vG. (200X).

El lecho vascular -durante esta fase progresiva- se caracterizó por presentar numerosos vasos sanguíneos donde predominaron capilares, arteriolas y vénulas (Figura 4 A). Además se observaron abundantes brotes microvasculares emergentes de otros vasos (Figura 2).

### 5.3. Características Histopatológicas del TVT en fase regresiva

Las muestras de los tumores luego del tratamiento con sulfato de vincristina -en fase regresiva- mostraron células tumorales dispuestas en grupos más pequeños, muchas de ellas en procesos degenerativos o apoptóticos con vacuolización del citoplasma, rodeados de abundante y grueso tejido conectivo, observándose grandes áreas de infiltración de células leucocitarias. Se visualizaron escasas células tumorales viables, las que en general se apreciaron viables (Figura 5).



**Figura 5 A:** Corresponden a muestras en fase regresiva. A) Abundante fibras colágenas tipo I rojas, vasos sanguíneos de mayor calibre (→), tinción de vG. B) Fibras colágenas tipo I eosinófilas (→), núcleos azules, vasos sanguíneos (\*), tinción con H-E.

La fase regresiva se destacó por la gran cantidad de tejido conectivo con abundantes fibras colágenas tipo I, vasos sanguíneos de mayor calibre, con presencia de fibras musculares lisas y escasa cantidad de brotes microvasculares (Figura 3 y Tabla 1).

## 6. Discusión

La cuantificación del área vascular, mediante la marcación del vWF en los tumores antes y después del tratamiento con sulfato de vincristina, se realizó en áreas donde existía numerosa microvascularización, las que presentarían el mayor potencial angiogénico de acuerdo a lo descrito por Vermeulen *et al.*, (2002). Así, aplicando estas recomendaciones y el uso del software Image Pro-Plus, se logró apreciar nítidamente el área vascular inmunomarcada -de color café oscuro-, facilitando la percepción del proceso proangiogénico del TVT progresivo y el efecto del tratamiento con vincristina, en las muestras regresivas de cada tumor.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son consistentes con los presentados por Weidner *et al.*, (1991) en tumores humanos y por Ramos (2004) en TVT canino, utilizando éstos el mismo anticuerpo anti-vWF, empleado en esta memoria.

En el análisis histopatológico del tumor, las muestras sin tratamiento son concordantes con las características típicas del tumor con células grandes redondeadas y uniformes, ordenadas en grupos delimitados por escasas fibras de colágeno y escasa cantidad de células linfocitarias, lo que es similar a lo expuesto por Rogers (1997), Torres (1999) y Duarte (2002). Además, la alta capacidad proliferativa del TVT, fue posible evidenciarla por una importante presencia de células con figuras mitóticas.

Los cambios degenerativos producidos por el tratamiento con sulfato de vincristina en relación a la presencia de células tumorales redondeadas de tamaño más pequeño, mayor

cantidad de fibras de colágeno, disminución del tamaño de los grupos celulares y marcada infiltración linfocitaria, como lo han descrito diversos autores: Lombardi (1995), Oltra (1999), González *et al.*, (2000) y Duarte (2002), concuerdan con los cambios descritos para el TVT canino en fase regresiva.

Los aspectos histopatológicos observados en los cortes de los tumores en fase regresiva, son consistentes con la evidente disminución de los vasos sanguíneos del tumor post tratamiento. Resultados que indican claramente que la vincristina es capaz de reducir de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) el área del lecho vascular. Lo que difiere de lo expuesto por González *et al.*, (2000) donde presume que podría existir un incremento relativo del área vascular en la fase regresiva del tumor luego del mismo tratamiento.

Todo esto apunta a que la vincristina es capaz de detener la angiogénesis, sin embargo, existen diferentes mecanismos por los cuales esto estaría ocurriendo:

- La vincristina frena la proliferación de las células tumorales al unirse a la tubulina bloqueando la facultad de las proteínas para polimerizarse en los microtúbulos (Goodman, 1991) imposibilitando la formación del huso mitótico y deteniendo así, la mitosis celular. Al detener el crecimiento y disminuir el tamaño tumoral, una de las consecuencias inmediatas sería la disminución en la producción de factores proangiogénicos, en especial el VEGF, que estas células liberan. Así, al disminuir la producción de este factor, se inhibe al principal factor estimulador de angiogénesis. Por otro lado, la misma disminución del tamaño tumoral trae dos consecuencias: *i*) al existir menor cantidad de células demandantes de oxígeno, la hipoxia - principal estimulante de la secreción de VEGF (Escobar, 2002)- dejaría de tener un rol



determinante de angiogénesis; *ii*) el menor tamaño tumoral haría más efectiva la acción del propio sistema inmune en la remisión del tumor (Folkman, 1971).

- Al mismo tiempo, la disminución de los brotes vasculares y la presencia de vasos maduros en los cortes de tumores en fase regresiva, observados en nuestros resultados, nos permiten especular que la vincristina también actúa sobre las células endoteliales en división, consistente con lo expuesto por algunos autores quienes mencionan, que esta droga actúa sobre el citoesqueleto microtubular de las células endoteliales inmaduras o en proliferación (Micheletti *et al.*, 2005; Taraboletti *et al.*, 2005). Por consiguiente, el sulfato de vincristina evitaría que las células endoteliales activadas proliferen y migren para formar nuevas yemas vasculares y así completar el proceso angiogénico descrito por Griffioen y Molema (2000). De este modo, se conduciría al equilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos, a la detención del crecimiento microvascular, a la maduración y diferenciación de los vasos sanguíneos, con lo que se reduciría el aporte nutricional y de oxígeno a las células tumorales, ayudando en el proceso de remisión.

Los resultados obtenidos en esta memoria son compatibles con los expresados por Espinoza (2007) quien trató al TVT canino con talidomida -droga antiangiogénica-, utilizando también al vWF para medir el área vascular. La remisión tumoral, en ambos casos, presentó características similares con cambios degenerativos celulares y disminución del lecho vascular. Por otro lado, nuestros resultados también son consistentes a los obtenidos por Ramos (2004) quien describe disminución del lecho vascular post tratamiento con dexametazona, otra droga antiangiogénica, utilizando el mismo anticuerpo y tumor. Sin embargo, el aumento del estroma

tumoral y de la infiltración linfocitaria, observados en nuestro trabajo, no coinciden con los obtenidos por Ramos (2004) quien no observó diferencias con los tumores en fase progresiva.

Los beneficiosos efectos de la vincristina en el tratamiento contra el TVT son bastante conocidos. Sin embargo, no se disponía de información en la cual se describiera que la vincristina poseía además un efecto antiangiogénico en el control del TVT canino, como se ha presentado en esta memoria.

## 7. Conclusiones

- La aplicación de sulfato de vincristina es capaz de disminuir el área del lecho vascular de manera estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), sugiriendo así tener un efecto antiangiogénico en el tratamiento del TVT canino.
- El TVT resultó ser un excelente instrumento para el estudio de vasos sanguíneos en diferentes fases –progresiva y regresiva- debido a su profusa vascularización y a su rápida respuesta al tratamiento.
- El sulfato de vincristina es capaz de cambiar la morfología histológica del TVT, disminuyendo la cantidad de células tumorales, modificando las características de la MEC la que conduce a un proceso fibrótico y a la maduración de los vasos sanguíneos.
- El factor de vonWillebrand -como inmunomarcador- asociado a un programa de análisis morfométrico computacional, resultó ser eficaz cuantificando el área del lecho vascular, tanto en fase progresiva como regresiva.

## 8. Bibliografía

- **AHRAR, K.; MADOFF, D.; GUPTA, S.; WALLACE, M.; PRICE, R.; WRIGHT, K.** 2002. Development of a large animal model for lung tumors. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 13: 923-928.
- **AMARIGLIO, E.; HAKIM, I.; BROK-SIMONI, F.; GROSSMAN, Z.; KATZIR, N.; HARMELIN, A.; RAMOT, B.; RECHAVI, G.** 1991. Identity of rearranged LINE/c-MYC junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8136-8139.
- **AMBER, E. I.; HENDERSON, R.; ADEYANJU, J.; GYANG, E.** 1990. Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumour with cyclophosphamide, methotrexate or vincristine. *J. Vet Intern. Med.* 4: 144-147.
- **BEECKEN, W.D.; FERNANDEZ, A.; JOUSSEN, A.M.; ACHILLES, E.G.** 2001. Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice. *J. Nat. Cancer I.* 93(5): 382-387.
- **BEECKEN, W.D.; ENGL, T.; HOFMANN, J.; JONAS, D.; BLAHETA, R.** 2005. Clinical relevance of serum angiogenic activity in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Cell. Mol.* 9(3): 655-661.
- **BERGERS, G.; BENJAMIN, L.** 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 3(6): 401-410.
- **BLAKEY, D.; WESTWOOD, F.; WALKER, M.** 2002. Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. *Clin. Cancer Res.* 8: 1974-1983.

- **BOOTH, N.; MCDONALD, L.** 1988. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Zaragoza, España: Vol. II, Editorial Acribia. S.A. 119-120.
- **BOOTH, M.J.** 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadeno-carcinoma in a bitch. *J. Small Anim. Pract.* 35: 39-42.
- **BROWN, N.; CALVERT, C.; MACEWEN, E.** 1980. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. *J. Am. Vet Med. Assoc.* 176: 983-986.
- **CALVERT, C.; LEIFER, C.; MCEWEN, E.** 1982. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(2): 163-164.
- **CARMELIET, P.; JAIN, R.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407: 249-257.
- **CHANG, Y.; DI TOMASO, E.; McDONALD, D.; JONES, R.; JAIN, R.** 2000. Mosaic blood vassels in tumor: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceeding National Academy Sciences USA.* 97(26): 14608-14613.
- **CHU, R.; LIN, C.; LIU.; YANG S.; HSIAO, Y.; HUNG, S.; PAO, H.; LIAO, K.** 2001. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res.* 21(6A): 4017-4024.
- **COTCHIN, E.** 1974. Neoplasia in the dog. *Vet Sci.* 66: 879-888.
- **DAMERON, K.; VOLPERT, O. V.; TAINSKY, M.** 1994. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 265: 1582-1584.
- **DAS, U.; DAS, A.** 2000. Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet. Res. Commun.* 24: 545-556.

- **DASS, L. L.; SAHAY, P. N.** 1989. Surgical treatment of canine transmissible venereal tumour: a retrospective study. *Indian Vet. J.* 66: 255-258.
- **DAVIS, P.; DOUGHERTY, G.; BLAKEY, D.** 2002. ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. *Cancer Res.* 62: 7247-7253.
- **DENEKAMP, J.** 1993. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 66: 181-196.
- **DUARTE, M.** 2002. Indicadores de proliferación celular en tumor venéreo transmisible canino. Memoria de título Médico Veterinario. Stgo., Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 71 p.
- **ESCOBAR, A.** 2002. Gliomas y angiogénesis. *Revista Mexicana de Neurociencia.* 3(1): 21-24.
- **ESPINOZA, A.** 2007. Efecto de la talidomida sobre la angiogénesis en tumor venéreo transmisible canino. Memoria de título Médico Veterinario. Stgo., Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 64 p.
- **EWENSTEIN, B. M.; WARHOL, M. J.; HANDIN, R. I.; POBER, J. S.** 1987. Composition of the vonWillebrand factor storage organelle (Weibel-Palade Body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Cell Biology.* 104(5): 1423-1433
- **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. In: *Patología Animal.* 3(2): 8-12.
- **FLORES, E.; GONZÁLEZ, C.; CATTANEO, G.; LOMBARDI, C.; DIEZ, X.** 1997. Chemotherapy in transmissible venereal tumors (TVT) In Dogs. In: *Spontaneous*

animal tumors: A Survey. Edit. Lorenzo Rossi, Ralph Richardson, John Hsrshbargere, Italy. 399-402.

- **FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZÁLEZ, C.; CEPEDA, R.** 2000. Tumor venéreo transmisible. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. Monografía de Medicina Veterinaria. 20 (1): 82-93.
- **FOLKMAN, J.** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. New. Eng. J. Med. 285: 1182-1186.
- **FOLKMAN, J.** 1995. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. New Eng. J. Med. 333: 1757-1763.
- **FOLKMAN, J.** 2000. Incipient angiogenesis. J. Nat. Cancer Inst. 92(2): 94-95.
- **FREITAS, T.; MIGUEL, M.; SILVEIRA, E.; FREITAS, R.; GALVAO, H.** 2005. Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. Experimental and Molecular Pathology. 79: 79-85.
- **GARDINER-CALDWELL COMMUNICATIONS.** 2004. El VEGF y la antiangiogénesis. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Reino Unido. Pp 4-12.
- **GIL-BAZO, I.; CATALÁN, V.; PÁRAMO, J.; QUERO, C.; ESCRIVÁ DE ROMANI, S.; PÉREZ-OCHOA, A.; ARBEA, L.; NAVARRO, V.; DE LA CÁMARA, J.; GARRÁN, C.; ESPINÓS, J.; ROCHA, E.; GARCÍA-FONCILLAS, J.; MARTÍN-ALGARRA, S.** 2003a. El factor vonWillebrand como intermediario entre la hemostasia y la angiogénesis de origen tumoral. Rev. Med. Univ. Navarra. 47(3): 22-28.
- **GIL-BAZO, I.; PÁRAMO, J.; GARCÍA-FONCILLAS, J.** 2003b. Hemostasia, angiogénesis y cáncer: papel del factor vonWillebrand. Rev. Clin. Esp. 203(4): 199-201.

- **GIMBRONE, M.; LEAPMAN, S.; COTRAN, R.** 1972. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136: 261-276.
- **GLEICH, L. L.; BIDDINGER, P.W.; DUPERIER, F.D.** 1997. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2–T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical– pathologic correlation. *Head Neck* 19: 276–280.
- **GONZÁLEZ, C.** 1994. Biología de las neoplasias. In: Compendio del curso internacional de oncología Veterinaria. Villouta, G. y Gonzáles, C. Editores, Universidad de Chile. 8-9.
- **GONZÁLEZ, C.; GRIFFEY, S; NAYDAN, B.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B.** 2000. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J. Comp. Path.* 122(4): 241-248.
- **GONZÁLEZ, C.; CEPEDA, R.; FLORES, E.; CATTANEO, G.; COLARTE, K.** 2002. Separación y purificación de células del tumor venéreo transmisible canino espontáneo, en gradiente de densidad de polisucrosa y diatrizoato de sodio. *Avance en Ciencias Veterinarias* 17: 18-23.
- **GRIFFIOEN, A.; MOLEMA, G.** 2000. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2): 237-268.
- **GUREL, A.; KUSCU, B.; GULANBER, E.; ARUN, S.** 2000. Transmissible venereal tumors detected in the extragenital organs of dogs. *Veterinary Ophthalmol.* 3(1): 43-47.
- **GOODMAN, A.** 1991. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Octava edición. Edit. Médica Panamericana. México D. F., México. 1197-1199.



- **HANAHAN, D.; FOLKMAN, J.** 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 68: 353–364.
- **HIGGINS, D.A.** 1966. Observations on the canine transmissible venereal tumour as seen in the Bahamas. *Veterinary Record* 79: 67-71.
- **HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; HOLMGREN, E.; HAMBLETON, J.; NOVOTNY, W.; KABBINAVAR, F.** 2005. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer *Journal of Clinical Oncology* 23(15): 3502-3508
- **KARLSON, A.; MANN, F.** 1952. The transmissible venereal tumor of dogs: observations of forty generations of experimental transfers. *Ann. NY. Acad. Sci.* 54: 1197-1213.
- **JAIN, R.** 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9(6):685-693.
- **LÓPEZ-GRANIEL, C.; MENESES, A.** 2000. Angiogénesis. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 46(2): 78-80.
- **LOMBARDI, C.** 1995. Evaluación del tratamiento quimioterápico con vincristina en la regresión del tumor venéreo transmisible canino espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral. Tesis de Magíster, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet y Pecuarias. 43-44.
- **MARTINS, M.; DE SOUSA, F.; GOBELLO, C.** 2005. The canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. <http://www.ivis.org/docarchive/A1233.0405.pdf>
- **MANNUCCI, P.** 1998. vonWillebrand Factor. A marker of endotelial damage?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 1359-1362.

- **MCCARTY, M.; TAKEDA, A.; STOELTZING, O.** 2004. ZD6126 inhibits orthotopic growth and peritoneal carcinomatosis in a mouse model of human gastric cancer. *Br. J. Cancer.* 90: 705-711.
- **MCNAMARA, D.; HARMEY, J.; WALSH, T.; REDMOND, H.; BOUCHIER-HAYES, D.** 1998. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br. J. Surg.* 85: 1044-1055.
- **MICHELETTI, G.; POLI, M.; BORSOTTI, P.** 2005. Vascular-targeting activity of ZD6126, a novel tubulin-binding agent. *Cancer Res.* 63: 1534-1537.
- **MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; KUROSAWA, T.** 1996. Changes in lymphokine-activated killer activity in peripheral blood lymphocytes from canine transmissible venereal sarcoma models. *Exp. Anim.* 45(3): 289-293.
- **MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E.** 2003. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *Vet Q.* 25(3): 101-111.
- **NAK, D.; NAK, Y.; CANGUL, I.T.; TUNA, B.** 2005. A Clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52(7): 366-70.
- **OLTRA, O.** 1999. Respuesta inmune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fases progresiva y regresiva. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 60 p.
- **ORTEGA-PACHECO, A.; ACEVEDO-ARCIQUE, M.; SAURI-ARCEO, C.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.; GUTIERREZ-BLANCO, E.** 2003. Prevalencia de tumor venéreo transmisible en perros callejeros de la ciudad de Merida, Yucatán, México. *Rev. Biomed.* 14: 83-87.

- **PARK, MS.; KIM, Y.; KANG, MS.; OH, SY.; CHO, DY.; SHIN, NS.; KIM, DY.** 2006. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(1): 129-132.
- **PEÑA, M.** 2001. Angiogénesis. *Archivos de cardiología de México. Rev.* 71(1): 136-138.
- **PÉREZ, L.; VERGARA, K.; VENTURA, J.; LETELIER, I.** 1978. Tratamiento quirúrgico y quimioterápico del tumor venéreo transmisible de localización nasal en caninos. *Arch. Med. Vet.* 10(2): 149-152.
- **RAMOS, R.** 2004. Actividad anti-angiogénica de la dexametasona en tumor venéreo transmisible canino. Memoria de título Médico Veterinario. Stgo., Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 58 p.
- **RISAU, W.** 1997. Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 386:671-674.
- **ROGERS, K. S.** 1997. Transmissible venereal tumor. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 19: 1036–1044.
- **ROSEN, L.** 2000. Angiogénesis strategies and agents in clinical trials. *The oncologist.* 5(1): 20-27.
- **SÁNCHEZ, V.** 2001. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 20(3): 223-230.
- **SIEMANN, D.; ROJIANI, A.** 2002. Enhancement of radiation therapy by the novel vascular targeting agent ZD6126. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53: 164-171.
- **SINGH, J.; RANA, J.; SOOD, N.; PANGAWKAR, G.; GUPTA, P.** 1996. Clinico-pathological studies on the effect of different antineoplastic chemotherapy regimens on transmissible venereal tumours in dogs. *Vet Res. Commun.* 20: 71–81.

- **SOUSA, J.; SAITO, V.; NARDO, A.; RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.; BACILA, M.** 2000. A survey of incidence and the therapeutic procedures of the canine transmissible venereal tumor, the sticker's lymphosarcoma. *Arch. Vet. Sci.* 5: 41-48.
- **TARABOLETTI, G.; MICHELETTI, G.; DOSSI, R.; BORSOTTI, P.; MARTINELLI, M.; FIORDALISO, F.; RYAN, A.; GIAVAZZI, R.** 2005. Potential antagonism of tubulin-binding anticancer agents in combination therapies. *Clin. Cancer. Res.* 11(7): 2720-2726.
- **TATEYAMA, S.; NAZAKA, H.; ASHIZAWA, H.; OTSYKA, H.; WADA, S.; YAMOGUCHI, R.** 1986. Neoplasm in animals studied at Myazaki University in 1970-1979. *J. Japan Vet. Med. Assoc.* 39: 242-247.
- **TEICHER, B.; HOLDEN, S.; ARA, G.; SOTOMAYOR, E.; HUANG, Z.; CHEN, Y.** 1994. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with others anti-angiogenic agents. *Int. J. Cancer.* 57: 920-925.
- **TEICHER, B.; ARA, G.; MENON, K.; SCHAUB, R.** 1996. *In vivo* studies with interleukin-12 alone and in combination with monocyte colony-stimulating factor and/or fractionated radiation treatment. *Int. J. Cancer.* 65: 80-84.
- **TORRES, C.** 1999. Aspectos histopatológicos e inmunohistoquímicos del tumor venéreo transmisible canino, en progresión y regresión mediante análisis de imagen. Memoria de Título Médico Veterinario. Stgo., Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 64 p.
- **UHR, J.; SCHEUERMANN, R.; STREET, N.; VITETTA, E.** 1997. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat. Med.* 3: 505-509.

- **VERGARA, S.** 2001. características morfológicas e inmunofenotípicas del tumor venéreo transmisible del canino en cultivos celulares. Memoria de Título Médico Veterinario. Stgo., Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pecuarias. 43 p.
- **VERMEULEN, P. B.; GASPARINI, G.; FOKS, S. B.; COLPAERT, C.; MARSON, L.; GIONE, M., BELIE J.; DE WAAL R. E.; VAN MARCK E.; MAGNAN E.; N. WEIDNER N.; HARRIS A.; DIRIX L.** 2002. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. Eur. J. Cancer. 38: 1564-1579.
- **WEIDNER, N.; SEMPLE, J.; WELCH, W.; FOLKMAN, J.** 1991. Tumor angiogenesis and metástasis – correlation in invasive breast carcinoma. The New England Journal of Medicine, 324(1): 1-8.
- **YANG, T. J.** 1987. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190(5): 555-556.

## Anexos

### Anexo 1

#### **Silanización de portaobjetos.**

1. Limpieza del portaobjeto con solución de alcohol-clorhídrico (etanol 95% con 0,5% de HCL). Secar con un paño o papel absorbente. Enjuague con acetona pura p.a. por 1 minuto.
2. Inmersión de portaobjetos en solución de 3-aminopropiltrietoxisilano al 2% en acetona p.a. por 3 minutos.
3. Enjuague en acetona p.a. por 15 segundos.
4. Secado rápido utilizando aire caliente (Ej.: secador de pelo).
5. Dejar secar durante 1 hora a 60°C o toda la noche a temperatura ambiente.

## Anexo 2

### **Técnica inmunohistoquímica anti-factor de vonWillebrand.**

1. Desparafinado.
2. Recuperación de inmunoreactividad con : “Proteinase K Enzime”. 2 gotas en 4 ml de Tris Cloro, pH 7.6, por 10 minutos a T° ambiente.
3. Lavado con agua destilada: un enjuague rápido y 3 lavados de 5 minutos cada uno.
4. Bloqueo de Peroxidasa Endógena con: “Preoxidase Blocking Reagent”. Se retira el agua restante con una bomba de succión al vacío y sin dejar que se seque la muestra, se aplica 1 o más gotas del reactivo de forma tal que cubra el tejido por completo. Se deja en agitador por 20 minutos.
5. Se repite lavado del paso n° 3.
6. Bloqueo de uniones inespecíficas con: “Protein Block Serum-Free”. Se dejan por 10 minutos en agitador.
7. Incubación con anticuerpo policlonal primario de conejo DAKO<sup>R</sup> anti-vWF en concentración de 0.5/1000 en buffer PBS más BSA al 1%.
8. Lavado con PBS: un enjuague rápido y luego 3 lavados de 5 minutos cada uno.
9. Incubar con anticuerpo secundario biotilado DAKO<sup>R</sup> anti-conejo por 1 hora en dilución 1/400 en buffer PBS más BSA al 1%.
10. Se repite lavado del paso n° 8.
11. Incubar con conjugado estreptavidina/peroxidasa durante 1 hora en concentración 1/400 en buffer PBS más BSA al 1%.

12. Se repite lavado del paso n° 8.
13. Incubar con solución sustrato/cromógeno DAB: 1 gota/ml por tres minutos en oscuridad.
14. Se repite lavado del paso n° 3.
15. Contra tinción con Hematoxilina.
16. Deshidratación, aclaración y montaje.



**Anexo 3**

Área vascular de las 80 muestras medidas, expresadas en  $\mu\text{m}^2$ .

PROGRESIVO			REGRESIVO		
Tumor	Nº campo	Área	Tumor	Nº campo	Área
7A	1	2332.9	7B	1	1482.23
	2	1314.16		2	1762.67
	3	1251.57		3	967.78
	4	2785.66		4	2537.65
	5	4704.4		5	1056.12
8A	1	3233.96	8B	1	1029.1
	2	1957.49		2	702.1
	3	5498.76		3	838.84
	4	3126.84		4	609.52
	5	2171.1		5	1006.27
10A	1	3475.74	10B	1	830.24
	2	6514.8		2	555.95
	3	2576.08		3	789.37
	4	3814.75		4	1222.22
	5	4509.48		5	561.69
12A	1	3027.14	12B	1	1640.31
	2	2169.19		2	688.56
	3	2452.66		3	1592.43
	4	1158.2		4	1532.71
	5	4056.76		5	1557.76
13A	1	2306.47	13B	1	706.02
	2	2671.74		2	957.33
	3	3628.7		3	970.01
	4	2898.04		4	537.43
	5	2490.09		5	990.24
14A	1	1223.12	14B	1	1827.48
	2	2662.61		2	205.7
	3	1861.36		3	432.21
	4	2103.21		4	476.33
	5	1019.91		5	441.66
15A	1	958.39	15B	1	355.83
	2	2667.28		2	879.98
	3	614.35		3	840.06
	4	797.75		4	450.95
	5	1257.89		5	717.7
16A	1	2751.74	16B	1	1480.1
	2	3072.96		2	464.7
	3	4505.76		3	539.87
	4	2115.79		4	640.89
	5	3725.74		5	278.22