



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ACTIVIDAD ANTI-ANGIOGENICA DE LA DEXAMETASONA
EN TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE CANINO

RODRIGO RAMOS RAMOS

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

PROFESOR GUIA: ESTEFANIA FLORES PAVEZ

SANTIAGO, CHILE
2004



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ACTIVIDAD ANTI-ANGIOGENICA DE LA DEXAMETASONA EN TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE CANINO

RODRIGO RAMOS RAMOS

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	ESTEFANIA FLORES P.
PROFESOR CONSEJERO:	GINO CATTANEO U.
PROFESOR CONSEJERO:	RAQUEL CEPEDA C.

SANTIAGO, CHILE
2004

INDICE

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Tumor Venéreo Transmisible canino (TVT)	3
2.1.1. Aspectos generales	3
2.1.2. Biología	4
2.1.3. Presentación clínica	5
2.1.4. Diagnóstico	6
2.1.5. Tratamiento	7
2.2. Angiogénesis Tumoral	9
2.2.1. Aspectos generales de la angiogénesis	9
2.2.2. Angiogénesis y Cáncer	10
2.2.3. Determinación de la angiogénesis	14
2.2.4. Factores pro-angiogénicos	15
2.3. Terapia anti-angiogénica	17
2.3.1. Ventajas de la terapia anti-angiogénica	18
2.3.2. Dexametasona como droga anti-angiogénica	19
3. Objetivos	22
4. Material y Método	23
4.1. Materiales	23
4.1.1. Biológico	23

4.1.2. Farmacológico	23
4.1.3. Anticuerpos	23
4.2. Metodología	24
4.2.1. Análisis de resultados	25
5. Resultados	27
5.1. Hemograma y Perfil Bioquímico de los perros tratados con dexametasona	27
5.1.1. Hemograma	27
5.1.2. Perfil Bioquímico	28
5.2. Tamaño tumoral	29
5.3. Área vascular	31
5.4. Análisis descriptivo del lecho vascular	33
Galería de imágenes	35
6. Discusión	37
6.1. Hemograma y Perfil Bioquímico de los perros tratados con dexametasona	37
6.2. Área vascular y tamaño tumoral	38
7. Conclusiones	43
8. Bibliografía	44
9. Anexos	53

RESUMEN

La búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, ha llevado al desarrollo de un nuevo grupo de drogas, denominadas anti-angiogénicas, por su efecto negativo sobre la vasculatura tumoral. La angiogénesis se define como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes. Además de estar presente en el cáncer, donde la génesis de nuevos vasos sanguíneos es fundamental para el crecimiento y la proliferación hacia otros tejidos (metástasis), este fenómeno se presenta en otras patologías y en procesos fisiológicos.

Con el objetivo de estudiar el efecto de estas drogas sobre el lecho vascular tumoral se analizó el efecto de la dexametasona, corticoide que posee una probada actividad negativa sobre los vasos sanguíneos tumorales, en un modelo tumoral canino de presentación natural. Para ello se utilizaron 7 perros que presentaban tumor venéreo transmisible (TVT), a los cuales se les administró dexametasona durante 14 días, tiempo durante el cual se obtuvieron mediciones del tamaño tumoral, además de muestras de sangre y biopsias. Estas últimas para análisis del área del lecho vascular mediante técnica inmunohistoquímica, utilizando como marcador de células endoteliales anticuerpos contra el factor de vonWillebrand. Luego del tratamiento, se observó una disminución significativa del área del lecho vascular en las muestras tumorales, con respecto a las muestras tomadas antes de comenzar el tratamiento, sin embargo esto no ocurrió con el tamaño tumoral, que registró una disminución pequeña al final del tratamiento.

ABSTRACT

The search of new therapies against cancer, as both in human and in veterinary medicine, has led to the development of a new group of drugs, named anti-angiogenic drugs, due to their negative effect on the tumoral vasculature. The angiogenesis is defined as the development of new vessels starting from pre-existent vessels. Besides being present in cancer, where the genesis of new vessels is fundamental for the growth and proliferation to other tissues (metastasis), this phenomenon is presented in other pathologies and in physiologic processes.

With the objective of studying the effect of these drugs on the vascular bed of tumors, the effect of dexamethasone was analyzed in a canine model of natural presentation tumor. Steroids have a proven negative activity on the tumoral vessels.. With this purpose, 7 dogs affected with transmissible venereal tumor (TVT) were treated during 14 days with dexamethasone, time during which measures of tumoral size was obtained, besides samples of blood and biopsies. These last ones for analysis of the vascular bed area by means of immunohistochemical analysis, using antibodies against vonWillebrand factor as markers of endothelial cells. A significant decrease of the vascular bed area was observed in the tumoral samples after the treatment, in comparison with the samples taken before beginning the treatment, however this didn't happen with the tumor size, which registered a small variation at the end of the treatment.

1. NTRODUCCIÓN

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes, lo que lleva a neovascularización. Es un fenómeno complejo donde participan múltiples mecanismos que se pueden agrupar en tres grupos de eventos:

- Activación de células endoteliales, gatillada principalmente por fenómenos de hipoxia de células tumorales, que induce la síntesis de moléculas como el factor inducible por hipoxia (HIF) que, a su vez, estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una de las principales y más estudiadas moléculas del proceso angiogénico.
- Invasión y proliferación. Las células endoteliales activadas proliferan y comienzan a penetrar la matriz extracelular, ayudadas por la acción de las metaloproteinasas degradadoras de matriz (MMPs). En esta etapa actúa el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que favorece la adhesión de estas células en migración.
- Maduración y diferenciación. Las interacciones de las células endoteliales con la matriz extracelular estimulan moléculas que favorecen la diferenciación y formación tubular, además de la agregación de componentes extravasculares.

Teniendo en cuenta estos eventos, las estrategias para intervenir la neoformación vascular están dirigidas a evitar la proliferación celular, atacando las células o las moléculas estimuladoras, evitar la adhesión y migración, y actuar sobre las proteínas degradadoras de matriz. Dentro de las drogas que se ha encontrado que inhiben el proceso, actuando sobre las células endoteliales, están algunos corticoides como la dexametasona, cuyo principal efecto es estimular la apoptosis de estas células en proliferación, evitando con esto la neoformación vascular. Se ha visto que para realizar este efecto, los corticoides incluidos dentro del grupo de angiostáticos, estimulan unas proteínas llamadas caspasas, que se

estimulan en cadena, provocando alteraciones en el proceso de reparación celular, desorganizan el citoesqueleto, detienen la progresión del ciclo celular y marcan a la célula para ser fagocitada. Además de estos efectos, los corticoides también inhiben la síntesis y/o liberación de otras moléculas que participan en el proceso angiogénico, como el factor activador de plaquetas (PAF), el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 1 (IL-1) y el activador de plasminógeno.

En relación a estos antecedentes es el interés de esta memoria de título: estudiar el efecto de la dexametasona utilizando como modelo experimental el tumor venéreo transmisible canino (TVT), neoplasia de presentación natural que posee un alto nivel de vascularización y, por lo mismo, una elevada actividad angiogénica en su fase progresiva. Dadas estas condiciones, este tumor debería presentar una elevada susceptibilidad a la intervención con su flujo sanguíneo con drogas angiostáticas como la dexametasona.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVT)

2.1.1. Aspectos generales

El Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVT) es una neoplasia propia del canino que fue descrita por primera vez por Novinzky en el año 1876 (Epstein y Bennett, 1974).

Este tumor tiene una distribución mundial, pero parece ser más prevalente en ambientes urbanos, tropicales y subtropicales (Rogers, 1997). En la Región Metropolitana de Chile se ha descrito como la neoplasia de mayor incidencia en caninos (Flores *et al.*, 1989).

La edad promedio de presentación es entre los 4 y 5 años de edad (Rogers, 1997), afectando más a las hembras que a los machos (Flores *et al.*, 1989). Animales en alto riesgo de desarrollar TVT son aquellos sexualmente maduros y que habitan en áreas con alta concentración de perros vagabundos (Rogers, 1997).

Se caracteriza por ser transplantable, de un perro portador a uno susceptible. Esto ocurre en forma natural por contacto directo a través de la monta, afectando los genitales externos de ambos sexos (Cohen, 1973). El TVT puede ser transplantado a otros cánidos como coyotes, lobos, chacales y zorros rojos (Rogers, 1997).

A través de la historia, este tumor ha recibido otras denominaciones, tales como Tumor de Sticker, granuloma venéreo, sarcoma transmisible, linfosarcoma transmisible, condiloma canino y tumor venéreo contagioso (Brown *et al.*, 1980).

2.1.2. Biología

El origen celular del TVT es desconocido, pero se presume que esta neoplasia de células redondas sea de origen histiocítico (Polanco, 2001). Una posible causa viral ha sido estudiada debido a la transmisibilidad del tumor (Amber *et al.*, 1985), sin embargo esta teoría no ha sido confirmada (Hill *et al.*, 1984). Por otro lado, estudios cariogenéticos apoyan la hipótesis del trasplante de células viables como causa del TVT, ya que las células de este tumor presentan un número haploide de cromosomas igual a 59 ± 5 , a diferencia de las células normales del perro, que poseen un número diploide igual a 78. Además, de los 59 cromosomas del TVT, 42 a 43 son acrocéntricos y 16 a 17 son metacéntricos, en cambio, de los 78 cromosomas de las células del perro sólo 2 son acrocéntricos (Idowu, 1975).

Estudios con antígenos de histocompatibilidad de superficie en células de perro y de tumor han demostrado que el TVT no está compuesto por células del hospedero que han sido transformadas a neoplásicas, sino que más bien es un trasplante celular alogénico (Rogers, 1997).

El TVT es el único tumor que es transplantable a perros adultos inmunocompetentes (Cohen, 1973). En casos de trasplante experimental, el tumor muestra primero una fase de crecimiento progresivo, la cual es seguida por un breve período estático y luego regresión (González *et al.*, 2000b). En la presentación natural, el tumor crece rápidamente posterior a la transmisión sexual, seguido de un crecimiento local lento o progresión con metástasis; algunos tumores regresan espontáneamente (Beschoner *et al.*, 1979).

El TVT es altamente antigénico (Beschoner *et al.*, 1979). Se ha descrito una respuesta inmune humoral contra el tumor; anticuerpos antitumorales específicos del tipo IgG pueden ser detectados en el suero de la mayoría de los animales afectados,

independiente del estado de la enfermedad. Estudios sugieren que los anticuerpos anti-TVT están dirigidos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) (Rogers, 1997).

La regresión tumoral, tanto en casos de TVT experimental como espontáneo posterior a quimioterapia, está relacionada con altos niveles de linfocitos T. Además de esto, un elevado número de macrófagos y células plasmáticas, infiltradas en tumores regresivos, puede ser identificado citológica e histológicamente (Torres, 1999).

2.1.3. Presentación clínica

El sitio más común afectado por el TVT son los genitales externos de ambos sexos (Rogers, 1997). El tumor comienza como nódulos solitarios o múltiples y se desarrolla hasta masas con aspecto de “coliflor”, pedunculadas, nodulares, papilares o multilobuladas (Brown *et al.*, 1980), variando de tamaño desde unos pocos milímetros, hasta 10 a 15 cm (Rogers, 1997).

En el macho, el sitio más común es el cuerpo del pene, aunque además se puede localizar en el prepucio o en el escroto. En la hembra, el lugar de predilección es el vestíbulo de la vagina, pudiendo estar en vulva, cerviz, útero y trompas de Falopio. Además, el tumor ha sido reportado en las mucosas bucal, nasal y anal, conjuntiva y piel, con o sin compromiso de los genitales externos (Booth, 1994). También suele implantarse en sitios susceptibles como mucosas con abrasiones y, ocasionalmente en heridas cutáneas (Calvert *et al.*, 1982).

Los signos clínicos del tumor incluyen descarga genital (Flores *et al.*, 2000) intermitente o persistente con hemorragia, inflamación o malformación genital, lamidos excesivos del área genital, olor anormal y una masa visible (Rogers, 1997)

La descarga sanguinolenta puede ser confundida inicialmente con estro, uretritis, cistitis o prostatitis (Rogers, 1997).

En los TVT nasales, los signos clínicos inicialmente se manifiestan por descargas muco-sanguinolentas, intermitentes, por las fosas nasales, ya sea uni o bilateralmente, sin embargo, estas secreciones pueden ser tragadas por el animal, enmascarando su presencia, siendo la deformación el primer signo visible. Este tumor puede extenderse, por continuidad, a la cavidad oral, invadiendo el paladar blando y duro, siendo posible observarlo en su forma característica al examen clínico de la cavidad oral. Al expandirse en dirección orbital, puede fistular en la zona lagrimal (Flores *et al.*, 2000).

La metástasis no es común, desarrollándose en no más de un 5% de los casos de TVT. Esta se presenta, preferentemente, en cachorros y perros inmunosuprimidos (Rogers, 1997). Entre los sitios de metástasis se ha descrito la piel, nódulos linfáticos, cerebro, hígado, bazo, pulmones, corazón y adenohipófisis (Brown *et al.*, 1980; Flores *et al.*, 2000).

2.1.4. Diagnóstico

El prediagnóstico clínico del TVT se orienta por la morfología macroscópica, la localización, las secreciones y la anamnesis, pero el diagnóstico definitivo está dado por la citología y la histopatología (Flores *et al.*, 2000).

En casos de TVT de localización extragenital, en ausencia de lesiones genitales, debe hacerse un diagnóstico diferencial con otros tumores de células redondas, entre éstos están linfomas, histiocitomas, tumores poco diferenciados de mastocitos, melanomas amelanóticos, carcinomas de células escamosas, carcinoma epidermoide y lesiones granulomatosas no neoplásicas (Booth, 1994).

La muestra para citología se obtiene mediante una impronta o por aspiración con aguja fina de la masa tumoral (Flores *et al.*, 2000). Es una técnica de bajo costo que permite un diagnóstico inmediato, de fácil interpretación y no invasiva (Booth, 1994), además es un buen método para detectar casos tempranos y para monitorear el éxito en caso de tratamiento quirúrgico (Batamuzi y Kessy, 1993).

Con este método diagnóstico se observan numerosas células neoplásicas exfoliadas individualmente, de tamaño variable, forma redondeada u ovalada, con escaso citoplasma vacuolado y mal definido, grandes núcleos redondos de cromatina laxa con nucléolos centrales prominentes y presencia variable de mitosis (González *et al.*, 2000a).

El diagnóstico definitivo es mediante clasificación histopatológica, previa fijación con formalina y tinción de cortes de TVT con Hematoxilina–Eosina (Brown *et al.*, 1980). Las preparaciones histopatológicas revelan la presencia de grupos compactos de células compuestos de morfología similar a la observada al examen citológico. También se observa tejido conectivo en escasa cantidad y pequeños focos aislados de infiltración leucocitaria, principalmente de ubicación perivascular (González *et al.*, 2000a).

2.1.5. Tratamiento

Aunque se ha descrito la regresión espontánea para casos de TVT de presentación natural (Brown *et al.*, 1980), la indicación de tratamiento debe ser pronta, debido a la posibilidad de que se produzca metástasis y al hecho de ser un tumor transmisible (Booth, 1994).

La escisión quirúrgica del TVT es apropiada solamente para las formas nodulares o pedunculadas, pequeñas y solitarias (Flores *et al.*, 2000). Sin embargo, esta forma de tratamiento ha sido asociada con una alta recurrencia (Batamuzi y Kessy, 1993). El

transplante tumoral dentro de la herida quirúrgica con instrumentos o guantes puede ser un importante factor que explicaría la recurrencia tumoral post-operatoria (Rogers, 1997).

La inmunoterapia también ha sido estudiada, notándose algunas respuestas, pero los resultados han sido esporádicos y la recurrencia, frecuente (Rogers, 1997).

La radioterapia ha sido reportada como una modalidad efectiva para el tratamiento del TVT, usando dosis de radiación en rango de 10 a 30 Gy (Thrall, 1982). Sin embargo, su aplicación necesita personal y equipamiento especializado, además de la infraestructura apropiada (Calvert *et al.*, 1982).

Junto con la radioterapia, la quimioterapia ha probado ser el tratamiento más efectivo contra el TVT (Rogers, 1997). Dentro de esta modalidad, se han empleado agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, agentes naturales y otros, con variados resultados (Flores *et al.*, 2000). Entre estas drogas están: ciclofosfamida, prednisona, vincristina, vinblastina y metotrexato (Brown *et al.*, 1980), usadas solas o combinadas (Brown *et al.*, 1980).

La quimioterapia unidroga más eficiente es la vincristina (Flores *et al.*, 2000), fármaco alcaloide específico del ciclo celular (Jeglum, 1994). Actúa mediante la unión en forma específica a la tubulina, bloqueando su facultad para polimerizarse en los microtúbulos, causando la detención de la división celular en Metafase (Calabresi y Chabner, 2003). Se usa en dosis endovenosa semanal de 0,03 mg/kg, con la cual se obtiene recuperación en un periodo de 27,26 días en promedio y no se observan las reacciones adversas que se describen para la droga como signos neurológicos, celulitis perivascular severa, anorexia y constipación (Flores *et al.*, 1997). En casos resistentes a la terapia con vincristina, doxorubicina es la droga de elección (Rogers, 1997).

2.2. Angiogénesis Tumoral

2.2.1. Aspectos generales de la angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes, probablemente, de vénulas post-capilares (Rak *et al.*, 1995; Griffioen y Molema, 2000), fenómeno que debe ser diferenciado de la vasculogénesis o formación de vasos sanguíneos primitivos por diferenciación de angioblastos desde el mesoderma embrionario (Risau, 1997).

Hanahan y Weinberg (2000) describen la angiogénesis como uno de los seis sellos del cáncer, es decir, una de las seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente llevan a crecimiento maligno.

El resultado final de este proceso es neovascularización (Folkman, 2001), siendo un proceso clave en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos (Griffioen y Molema, 2000). Además del cáncer, tanto tumores sólidos como hematológicos (Aguayo *et al.*, 2000), está presente en otras patologías como soriasis, aterosclerosis, endometriosis, obesidad, artritis reumatoídea, pannus, retinopatía diabética, SIDA y otros procesos inflamatorios e infecciosos (Carmeliet y Jain, 2000).

Pero además de patologías, la angiogénesis es necesaria en eventos fisiológicos, siendo, en estos casos, un proceso altamente ordenado y bajo fuerte regulación (Papetti y Herman, 2002). Es así como se puede encontrar en el desarrollo embrionario, la reparación y el ciclo reproductivo (Griffioen y Molema, 2000).

Virtualmente todas las células en el cuerpo viven adyacentes a un vaso sanguíneo o, al menos, no más allá de la distancia límite para la difusión del oxígeno de 100 a 200 μ m (Folkman, 2001). Para que los organismos multicelulares crezcan más allá de esta distancia

deben reclutar nuevos vasos sanguíneos mediante vasculogénesis o angiogénesis (Carmeliet y Jain, 2000).

Durante condiciones normales la proliferación de células endoteliales es raramente detectable, ya que menos del 0,01% de las células endoteliales están en proliferación. Sin embargo, durante la angiogénesis estas células pueden emerger desde su estado de reposo y proliferar (Folkman, 2001).

2.2.2. Angiogénesis y Cáncer

Antes de plantearse que la angiogénesis ocurría en torno a los tumores se pensaba que la hiperemia tumoral era debido a la simple dilatación de los vasos existentes (Folkman, 2001). A comienzos de la década del 70, el doctor Judah Folkman postula que la generación de nuevos vasos sanguíneos es absolutamente requerida para el crecimiento tumoral más allá de un diámetro de 1 a 2mm (Zetter, 1998).

Parece haber 2 diferencias genéricas entre la angiogénesis que ocurre en tejidos normales y la del tejido neoplásico. Primero, la expansión tumoral es continua y esto, usualmente, gatilla un crecimiento y una remodelación vascular crónicas, mientras que los procesos de reparación son finitos (Rak *et al.*, 1995). La segunda diferencia radica en las características de los vasos neoformados, los que son estructural y funcionalmente anormales en los tumores, constituyendo una vasculatura altamente desorganizada. Estos vasos son tortuosos y dilatados, de diámetros irregulares, excesivas ramificaciones y desviaciones (Carmeliet y Jain, 2000), con una alta permeabilidad debido a la presencia de fenestraciones y agujeros transcelulares, además de la carencia de una membrana basal completa (Papetti y Herman, 2002). Por último, hay ausencia, dentro del tumor, de vasos linfáticos funcionales, los que son dilatados hacia la periferia (Carmeliet y Jain, 2000).

Existe evidencia experimental suficiente que indica que el crecimiento y la diseminación de una neoplasia son dependientes de la angiogénesis (Weidner *et al.*, 1991; López-Graniel y Meneses, 2000; Aguayo *et al.*, 2000). Entre las observaciones que soportan este hecho están las siguientes (López-Graniel y Meneses, 2000):

- El crecimiento de células neoplásicas implantadas en el tejido subcutáneo de ratones desnudos es lento y lineal antes de la vascularización, pero se vuelve acelerado y exponencial al aparecer la neovascularización.
- El crecimiento de células neoplásicas implantadas en órganos perfundidos de manera aislada, en donde no existe proliferación vascular, la carga tumoral no rebasa 1 a 2mm³. Sin embargo, después de transplantarse a ratones, las dimensiones del tumor alcanzan rápidamente 1 a 2cm³.
- La replicación de células neoplásicas implantadas en la córnea, tejido pobremente vascularizado, es extremadamente lenta; al sembrarse en tejido vascularizado, la replicación se acelera.
- Las células neoplásicas implantadas en el humor acuoso del ojo se mantienen viables, pero no se reproducen, manteniendo un tamaño menor a 1mm³; una vez que estas células son desplazadas al iris, tejido ricamente vascularizado, las dimensiones se incrementan 16.000 veces más su tamaño original en tan sólo 2 semanas.
- Las células metastásicas del retinoblastoma que se ubican en el humor acuoso o la cámara anterior del ojo, similarmente avasculares, se mantienen viables, pero sin reproducirse.

Junto con ser un proceso esencial para el crecimiento tumoral, la angiogénesis es un componente crítico para el desarrollo de metástasis (Obermair *et al.*, 1998; Izawa y Dinney, 2001), siendo los tumores altamente irrigados los que tienen el potencial de metástasis a

una tasa más alta que aquellos menos angiogénicos (Zetter, 1998). La capacidad de invasión y metástasis le permiten a la célula cancerosa escapar a la masa tumoral primaria y colonizar nuevos territorios donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no son limitados (Hanahan y Weinberg, 2000). Además de sus efectos sobre la expansión tumoral, quizá la forma más importante mediante la cual la angiogénesis puede facilitar el desarrollo de metástasis es proveyendo una vía de salida eficiente para que las células tumorales abandonen el sitio primario y entren al torrente sanguíneo (Zetter, 1998).

Las células tumorales son, usualmente, vertidas a la circulación después que ha ocurrido neovascularización (Folkman, 2001). El número de metástasis formadas, generalmente, es proporcional al número de células tumorales vertidas. Consecuentemente, una disminución de la angiogénesis en un tumor metastásico dado, produciría una disminución en el número de células tumorales vertidas a la circulación y una correspondiente disminución en el número de colonias metastásicas que se alcanzan corriente abajo (Zetter, 1998).

Finalmente, un hecho que tiene grandes implicancias en el desarrollo de metástasis es la estructura de los vasos tumorales. Además de las alteraciones nombradas anteriormente, la pared vascular no siempre está formada por una capa homogénea de células endoteliales. En lugar de eso, puede estar revestida sólo con células cancerosas o ser un mosaico de células cancerosas y endoteliales (Carmeliet y Jain, 2000). Este tipo de vasos puede ser el resultado de células cancerosas que invaden el lumen del vaso, de células cancerosas imitando células endoteliales o “mímica vasculogénica”, de vasos secuestrados por células tumorales que forman un microcilindro alrededor de éstas o de apoptosis de células endoteliales que exponen a células cancerosas subyacentes (Carmeliet y Jain, 2000).

Hoy está ampliamente aceptado que la angiogénesis no se produce cuando el efecto de moléculas pro-angiogénicas está balanceado con aquél de las moléculas anti-angiogénicas y se activa cuando el balance favorece hacia la angiogénesis (Hanahan y Weinberg, 2000).

Varias señales que gatillan el proceso han sido descubiertas. Entre estas se incluyen la hipoxia, hipoglicemia o el bajo pH, estrés mecánico (por ejemplo, la presión generada por las células en proliferación) y mutaciones genéticas (Carmeliet y Jain, 2000).

La existencia de áreas tisulares hipóxicas es un hecho constante en todos los tumores sólidos mayores a 1mm^3 debido al desequilibrio entre el aporte y el consumo celular de oxígeno en relación con trastornos de la difusión y la aparición de áreas con flujo comprometido por vascularización aberrante (Alberola, 2001). La hipoxia induce la expresión del factor inducible por hipoxia o HIF-1 (Tsuzuki *et al.*, 2000), el cual estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Veikkola *et al.*, 2000), que es una de las principales moléculas iniciadoras del proceso angiogénico. La hipoxia también puede inducir la expresión de otras moléculas angiogénicas como angiogenina, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF) e interleuquina-8 (IL-8), además de la enzima óxido nítrico-sintetasa (NOS) (Fidler *et al.*, 2001).

Un bajo pH, así como la hipoglicemia, pueden incrementar la producción de factores angiogénicos, especialmente VEGF (Folkman, 2001).

La sobre-expresión de reguladores positivos de la angiogénesis y la regulación negativa por parte de inhibidores del proceso durante el desarrollo tumoral temprano, están, generalmente, gatillados por mutaciones genéticas que controlan la angiogénesis. Por ejemplo, la sobre-expresión del oncogén ras aumenta la producción de VEGF, mientras que

una mutación o supresión en el gen supresor tumoral p53 disminuye la producción del inhibidor angiogénico trombospondina-1 (Folkman, 2001).

En el proceso de angiogénesis tumoral participan múltiples mecanismos que se pueden reunir en tres grandes grupos de eventos, cada uno regulado por varias moléculas que contribuyen significativamente al proceso que lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Malonne *et al.*, 1999):

1. Activación: los factores de crecimiento celular y las citoquinas liberadas por la célula tumoral y las células inflamatorias asociadas al tumor, interactúan con sus receptores específicos que son expresados por las células endoteliales. De esta manera el endotelio vascular es activado.
2. Invasión y proliferación: las células endoteliales activadas proliferan y producen niveles elevados de moléculas de adhesión y proteinasas degradadoras de la matriz extracelular.
3. Maduración y diferenciación: las interacciones célula-célula y de éstas con la matriz extracelular estimulan los mecanismos bioquímicos responsables de la diferenciación de las células endoteliales neoformadas.

2.2.3. Determinación de la Angiogénesis

La actividad angiogénica es difícil de determinar mediante la simple visualización con tinciones tradicionales de Hematoxilina – Eosina, por el diminuto tamaño de estos capilares (López-Graniel y Meneses, 2000). Es por esto que se requieren marcadores específicos del endotelio vascular como CD-31, CD-33, CD-34 y el factor de vonWillebrand (vWf) (Weidner *et al.*, 1991; Obermair *et al.*, 1998), siendo vWf y CD-31 los más usados en estudios de angiogénesis.

vWf o antígeno relacionado al factor VIII de la coagulación es considerado el “estándar de oro” para destacar células endoteliales (Obermair *et al.*, 1998). Corresponde a una glicoproteína de 225 kDa que está involucrada en el transporte del factor VIII (factor anti-hemofílico) y juega un importante rol en la hemostasis al permitir la adhesión y agregación plaquetaria ante daño o activación del endotelio.

Este factor se encuentra en el citoplasma de las células de vasos sanguíneos y linfáticos, normales y neoplásicos, además de plaquetas y megacariocitos.

2.2.4. Factores pro-angiogénicos

Como ya se mencionó, la angiogénesis depende de un balance entre moléculas inhibitoras y estimuladoras o factores angiogénicos. Una definición más refinada de un factor angiogénico es un factor que, selectivamente, altera las características de las células endoteliales y estructuras perivasculares asociadas (pericitos, células musculares lisas, etc.), pero que no afecta la función de otros tipos celulares (Fidler *et al.*, 2001). Estos factores no sólo estimulan la proliferación y migración de células endoteliales, además inhiben la apoptosis de éstas (Dimmeler y Zeiher, 2000). Algunos de estos se encuentran en la tabla 1 (modificada a partir de Folkman, 1995).

Tabla 1: Factores angiogénicos endógenos			
Factor	Peso molecular	Mitógeno endotelial*	Reportado**
Factor de crecimiento de fibroblastos			
Básico	18.000	Si	1984
Ácido	16.400	Si	1984
Angiogenina	14.100	No	1985
Factor de crecimiento transformante			1985
Alfa	5.500	Si	1986
Beta	25.000	No	1986
Factor de necrosis tumoral alfa	17.000	No	1987
Factor de crecimiento endotelial vascular	45.000	Si	1983 1989
Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas	45.000	Induce síntesis de ADN	1989
Factor estimulador de colonias de granulocitos	17.000	Si	1991
Factor de crecimiento placentar	25.000	Débil	1991
Factor de crecimiento de hepatocitos	92.000	Si	1993
Interleuquina 8	40.000	Si	1992
Proliferina	35.000	Si	1994

**in vitro*

**año reportado

Además de estos factores, otras moléculas facilitan el proceso. Entre estas están el óxido nítrico (NO) o factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) (Goldenberg, 1995), que mantiene el flujo sanguíneo al relajar la musculatura lisa e inhibir la agregación plaquetaria (Alberola, 2001).

Angiopoyetinas son una familia de moléculas requeridas para la comunicación de células endoteliales con el mesénquima, formando interacciones celulares y bioquímicas estables (Fidler *et al.*, 2001).

Otras moléculas fundamentales para el proceso son las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Goldenberg, 1995), una familia de endopeptidasas extracelulares que selectivamente degradan componentes de la membrana basal y de la matriz extracelular (Stetler-Stevenson, 1999), permitiendo la invasión y migración celular a través de ésta (Papetti y Herman, 2002). Además, se ha demostrado que actúan sobre el plasminógeno para generar angiostatina, una potente molécula anti-angiogénica (Cornelius *et al.*, 1998).

2.3. Terapia anti-angiogénica

Las aplicaciones clínicas de la investigación en angiogénesis han tomado tres direcciones (Folkman, 1995): la cuantificación de la angiogénesis para su uso en diagnóstico y pronóstico, la aceleración de la angiogénesis durante la reparación y la inhibición del proceso.

La anti-angiogénesis como concepto terapéutico fue desarrollado a comienzo de la década del 70, basado en las observaciones que tumores que no vascularizan, fallan en crecer más allá de unos pocos milímetros de diámetro (Hayes y Lippman, 1999). Hoy se ha demostrado que la terapia anti-angiogénica podría ser usada como única modalidad para regresar tumores a un estado de latencia microscópica (O'Reilly, 2002).

Como se discutió anteriormente, la angiogénesis principalmente depende de una apropiada activación, invasión, proliferación y maduración de las células endoteliales. Por esto, las acciones para modular la angiogénesis se pueden agrupar en las siguientes (Griffioen y Molema, 2000):

1. Intervención en el crecimiento de células endoteliales. La más exitosa acción para modular la angiogénesis, a la fecha, es el uso de agentes que específicamente inhiben el

crecimiento de células endoteliales, ya sea actuando directamente sobre éstas o interfiriendo con factores angiogénicos como VEGF, FGF o con sus receptores.

2. Intervención con la adhesión y migración de células endoteliales. Debido a que el proceso de angiogénesis también depende de la adhesión y migración de células a través de la matriz extracelular, se ha hecho esfuerzos en la investigación por moduladores de estas interacciones.
3. Intervención sobre metaloproteinasas. Otro mecanismo de inhibición de la angiogénesis, relacionado con la inhibición de la adhesión y migración de células endoteliales, es el uso de inhibidores específicos de proteinasas que degradan el tejido conectivo, facilitando la migración celular y la subsiguiente formación vascular.

2.3.1. Ventajas de la terapia anti-angiogénica

a) Una de las ventajas potenciales de esta terapia es que los agentes anti-angiogénicos pueden causar regresión de las lesiones metastásicas y, además, prevenir su diseminación, lo que es limitado para la terapia convencional del cáncer (Zetter, 1998). Este fenómeno se observa en algunos tumores que, en forma natural, inhiben el crecimiento de metástasis distantes mediante agentes anti-angiogénicos que ellos mismos producen y que, al tener una mayor vida media que los factores pro-angiogénicos, actúan en sitios lejanos (Ramanujan *et al.*, 2000).

b) Las células endoteliales tumorales son consideradas mejores objetivos para la terapia anticancerosa debido a que son fácilmente accesibles para los agentes terapéuticos (Griffioen y Molema, 2000). Así, la terapia anti-angiogénica burla el problema de limitada penetración de drogas a tumores sólidos con elevada presión intersticial (Rak *et al.*, 1995).

c) Uno de los principales problemas con la quimioterapia citotóxica es la resistencia que se debe, en parte, a la inestabilidad genética y heterogeneidad de las células malignas (Brem, 1999). Por el contrario, los procesos empleados por las células endoteliales en la angiogénesis no son resultado de alteraciones genéticas (Griffioen y Molema, 2000), lo que haría a la terapia anti-angiogénica menos expuesta a generar mecanismos de resistencia (Kerbel, 1997). Esto ha sido demostrado con endostatina, un inhibidor endógeno de la angiogénesis (O'Reilly, 1997), en tres modelos tumorales transplantables murinos, usando ciclos prolongados de tratamiento (Boehm *et al.*, 1997)

d) La terapia anti-angiogénica está dirigida, principalmente, a un pequeño foco de células endoteliales migrantes y proliferativas en los capilares del sitio de angiogénesis (Folkman, 1995). Por esto, un inhibidor específico del proceso angiogénico no causaría supresión de la médula ósea, síntomas gastrointestinales o caída del cabello (Brem, 1999).

e) La terapia anti-angiogénica ha demostrado ser eficaz y potenciarse al ser combinada con otras modalidades de tratamiento como quimioterapia, radiación, inmunoterapia, cirugía y con otros compuestos anti-angiogénicos (Brem, 1999).

2.3.2. Dexametasona como droga anti-angiogénica

La Dexametasona (9α -fluoro- 16α -metilprednisolona) es un glucocorticoide sintético sin actividad de mineralocorticoide (Schimmer y Parker, 2003). Su potencia anti-inflamatoria es 30 veces mayor que el cortisol (McDonald, 1988) y su actividad gluconeogénica es similar. Posee una vida media plasmática de 200 minutos, pudiendo llegar su actividad en tejidos por sobre las 72 horas, es por esto que se clasifica a la Dexametasona como un corticosteroide de larga acción (Schimmer y Parker, 2003).

El efecto angiostático o anti-angiogénico de la Dexametasona, junto con otros corticoides, fue demostrado por primera vez en el año 1987 en un modelo de embrión de pollo (Folkman e Ingber, 1987).

Los glucocorticoides disminuyen el tamaño tumoral e inducen regresión tumoral, probablemente, mediante tres mecanismos: i) Inhiben la actividad de la fosfolipasa A2, ii) Inducen apoptosis de la célula endotelial de capilares tumorales y de células tumorales, iii) Inhiben la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (Folkman e Ingber, 1987).

La fosfolipasa causa la transformación de los ácidos grasos de membranas destruidos en ácido araquidónico y éste, a su vez, en prostaglandinas, las que estimulan la angiogénesis aumentando los niveles de VEGF (Griffioen y Molema, 2000).

La actividad de la NOS se ha relacionado positivamente con el crecimiento tumoral, la progresión y el proceso de metástasis (Alberola, 2001). Se ha observado que la migración y proliferación endotelial promovida por el VEGF puede disminuir mediante la inhibición de la NOS. Además, el óxido nítrico generado por la NOS, induce vasodilatación del lecho vascular, un pre-requisito para que las células endoteliales entren en la cascada angiogénica (Griffioen y Molema, 2000).

El mecanismo por el cual la dexametasona induce apoptosis es mediante la activación de las caspasas, unas proteasas ricas en cisteína que pueden auto-activarse o actuar sobre otras caspasas iniciando una “cascada”, además de actuar sobre otras proteínas involucradas en la maquinaria apoptótica (Zhivotovsky *et al.*, 1997).

Su acción se puede resumir en los siguientes puntos (Korsmeyer y Zinkel, 2001):

- Alteran el proceso de reparación celular.
- Detienen la progresión del ciclo celular.
- Inactivan inhibidores de factores apoptóticos.

- Actúan como mediadores de cambios morfológicos celulares.
- Marcan a la célula apoptótica para ser fagocitada.
- Desorganizan el cito-esqueleto celular.

Estos efectos explican la morfología característica de la célula apoptótica: condensación de la cromatina y citoplasma, pérdida de volumen celular, fragmentación de la cromatina, fragmentación del ADN y exposición de marcadores de superficie celular para células fagocíticas (Cryns y Yuan, 1998).

Otras moléculas que tienen participación en el proceso angiogénico cuya síntesis y/o liberación es inhibida por glucocorticoides son el factor activador de plaquetas (PAF), el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina 1 (IL-1) y el activador de plasminógeno (Schimmer y Parker, 2003).

En relación a estos antecedentes es el interés de esta memoria de título: estudiar el efecto de dexametasona sobre el Tumor Venéreo Transmisible canino como un modelo experimental.

3. OBJETIVOS

- **Objetivo General:**

- Estudiar la influencia de la Dexametasona, como droga anti-angiogénica, en el control del crecimiento tumoral.

- **Objetivos específicos:**

- Identificar, describir y cuantificar el efecto anti-angiogénico de Dexametasona en TVT canino.
- Identificar, describir y cuantificar la actividad angiogénica del TVT canino, después del tratamiento con Dexametasona.
- Comparar la actividad angiogénica del TVT tratado con Dexametasona, con el TVT en fase progresiva (control sin tratamiento).

4. MATERIAL Y METODO

4.1. Materiales

4.1.1. Biológico:

Se utilizaron siete perros, machos, sexualmente maduros, con edades que fluctuaron entre los 2 y los 7 años, sin distinción de raza, atendidos en el Servicio de Cirugía de Pequeños Animales de la Facultad, con diagnóstico de TVT progresivo confirmado mediante citología e histopatología.

4.1.2. Farmacológico:

- Dispert-dex®: Dexametasona fosfato disódico, 2,63 mg (equivalente a 2 mg de Dexametasona) por cm³ en solución acuosa (Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay).

4.1.3. Anticuerpos:

- Anticuerpo primario: Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-factor de vonWillebrand humano (DAKO®, código N°A0082, Lote 111, Edición 13.12.01, Dinamarca), que corresponde a la fracción purificada de inmunoglobulina de conejo en solución 0,1 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN₃.
- Anticuerpo secundario: Se utilizó un anticuerpo biotinilado de cerdo anti-inmunoglobulinas de conejo (DAKO®, código N°A0082, Lote 111, Edición 13.12.01, Dinamarca) en solución 0,01 mol/L buffer fosfato, 0,15 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN₃, el cual reconoce el anticuerpo primario.
- Solución sustrato: Se utilizó DAB (3,3'-diaminobenzidina) en solución cromógena combinado con un buffer – sustrato (buffer imidazol – HCL, pH

7,5, conteniendo peróxido de hidrógeno y un agente anti-microbiano) en proporción de 1 gota/1 ml. Esta solución permite visualizar las células endoteliales teñidas de un color café.

4.2. Metodología

A cada paciente se le administró dexametasona, en dosis endovenosa diaria de 0,5 mg/kg, por siete días, seguido de aplicaciones de dosis decrecientes también por siete días. Las dosis, expresadas en mg/kg, se muestran en el siguiente esquema.

DIA	1 - 7	8	9	10	11	12	13	14
DOSIS	0,5	0,25	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01	0,005

Durante la aplicación de Dexametasona se realizaron los siguientes procedimientos:

- Examen clínico: todos los días, para evaluar el estado general del paciente
- Muestras para Hemograma y Perfil Bioquímico: previo al tratamiento con dexametasona y una vez terminado, para evaluar el estado general del paciente (Anexo 1).
- Medición del tamaño tumoral: se midieron dos dimensiones con un pie de metro: largo (l) y ancho (a), cada dos días. El volumen tumoral se calculó según la fórmula de O'Reilly (O'Reilly *et al.*, 1997).

$$\text{Volumen} = a^2 \times l$$

- Biopsias: se obtuvo muestras tumorales previo al tratamiento, durante y terminado el tratamiento con dexametasona. (Anexo 1)

Las biopsias (obtenidas con un equipo de instrumental quirúrgico básico) se fijaron en formalina al 10% por 24 hrs. Luego se procesaron según métodos convencionales para

inclusión en parafina (López *et al.*, 1982) y se obtuvieron cortes histológicos de 4 micrómetros de espesor con micrótopo de rotación (Leitz). Los cortes fueron desparafinados mediante paso por xilol, alcoholes descendientes y agua y se tiñeron con Hematoxilina–Eosina (H-E), van Gieson (vG) y Papanicolau para la descripción general del tumor (López *et al.*, 1982).

Inmunohistoquímica: Para identificar la actividad angiogénica, se utilizó inmunomarcación con anticuerpos anti-factor de vonWillebrand (vWf), para lo cual los cortes fueron montados en porta-objetos silanizados (Anexo 2) y luego fueron desparafinados según técnica descrita anteriormente. Esta técnica inmunohistoquímica permite visualizar las células endoteliales de color café oscuro. (Anexo 3)

4.2.1. Análisis de resultados:

Se determinó la actividad angiogénica mediante la cuantificación del área del lecho vascular, medida en micrómetros cuadrados (μm^2), en las placas inmunomarcadas. Esto se hizo con el uso de un programa de análisis morfométrico computacional (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA), calculándose un valor promedio entre 5 campos elegidos al azar, con aumento de 200X, determinados en un microscopio (Nikon Eclipse E600) conectado a una cámara de video (Cool-Snap Pro, Media Cybernetics, USA) y a un computador.

Análisis estadístico: Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza de dos criterios o Diseño de Bloques al Azar para determinar si hay diferencias entre las muestras. En este diseño, con las unidades experimentales se forman grupos o bloques que correspondan a los niveles de variación de la fuente y los tratamientos se distribuyen al

azar. A cada grupo de unidades que corresponden a un mismo nivel de variación y que, por lo tanto, forman un conjunto relativamente homogéneo, se denomina bloque.

5. RESULTADOS

5.1. Hemograma y Perfil Bioquímico de los perros tratados con Dexametasona

5.1.1. Hemograma

Una vez finalizado el tratamiento con dexametasona, 6 casos presentaron alguna alteración en el hemograma. Las más frecuentes se presentaron en la serie roja y fueron Policromacia, en 5 casos y Rouleaux, en 4 casos. Además se presentó Trombocitopenia en 3 casos.

En la tabla 1 se muestran las alteraciones del hemograma que se presentaron en los casos tratados con dexametasona y el número de casos en que se presentó cada una (los valores se muestran en el anexo 4, así como los valores normales para la especie).

Tabla 1: <u>Alteraciones del Hemograma de los perros con TVT luego de 14 días de tratamiento con dexametasona</u>	
Alteración	N° de casos
Anisocitosis	2
Policromacia	5
Rouleaux	4
Anemia macrocítica	1
Trombocitopenia	3
Linfopenia	1
Desviación a la izquierda	2
Monocitopenia	2
Eosinopenia	1
Linfocitos atípicos	1

5.1.2. Perfil Bioquímico

Una vez finalizado el tratamiento con dexametasona, los 7 casos en estudio presentaron alguna alteración en el Perfil Bioquímico. Las más importantes fueron los aumentos de las enzimas Fosfatasa alcalina (FA) y Alanino-amino-transferasa (ALT), presentes en 7 y 6 casos respectivamente.

La tabla 2 muestra las alteraciones del Perfil Bioquímico que se presentaron en los casos tratados con Dexametasona y el número de casos en que se presentó cada una (los valores se muestran en el anexo 4, así como los valores normales para la especie).

Tabla 2: <u>Alteraciones del Perfil Bioquímico de los perros con TVT luego de 14 días de tratamiento con dexametasona</u>	
Alteración	N° de casos
Hipoproteinemia	1
Hipoalbuminemia	2
Hipoglobulinemia	1
NUS aumentado	2
Bilirrubina total aumentada	2
Bilirrubina conjugada aumentada	1
Bilirrubina libre aumentada	1
FA aumentada	7
ALT aumentada	6
GGT aumentada	2

En la tabla 3 se muestran las alteraciones del hemograma y del perfil bioquímico por caso estudiado.

Tabla 3: Alteraciones del Hemograma y Perfil Bioquímico por caso de los perros con TVT luego de 14 días de tratamiento con Dexametasona

Alteración	Caso	1	2	3	4	5	6	7
Anisocitosis				x			x	
Policromacia				x	x	x	x	x
Rouleaux				x	x	x		x
Anemia macrocítica							x	
Trombocitopenia			x		x			x
Linfopenia								x
Desviación a la izquierda				x		x		
Monocitopenia					x	x		
Eosinopenia				x				
Linfocitos atípicos								x
Hipoproteinemia				x			x	
Hiperproteinemia	x							
Hipoalbuminemia				x			x	
Hipoglobulinemia						x		
Hiperglobulinemia	x							
NUS aumentado	x				x			
Bilirrubina total aumentada				x				x
Bilirrubina conjugada aumentada				x				
Bilirrubina libre aumentada								x
FA aumentada	x	x	x	x	x	x	x	x
ALT aumentada	x	x		x	x	x	x	x
GGT aumentada						x		x

5.2. Tamaño Tumoral

En los 14 días que duró el tratamiento, la mayor disminución lograda fue de 0,2 cm. para las 2 dimensiones evaluadas (largo y ancho) y en varias mediciones no hubo cambio.

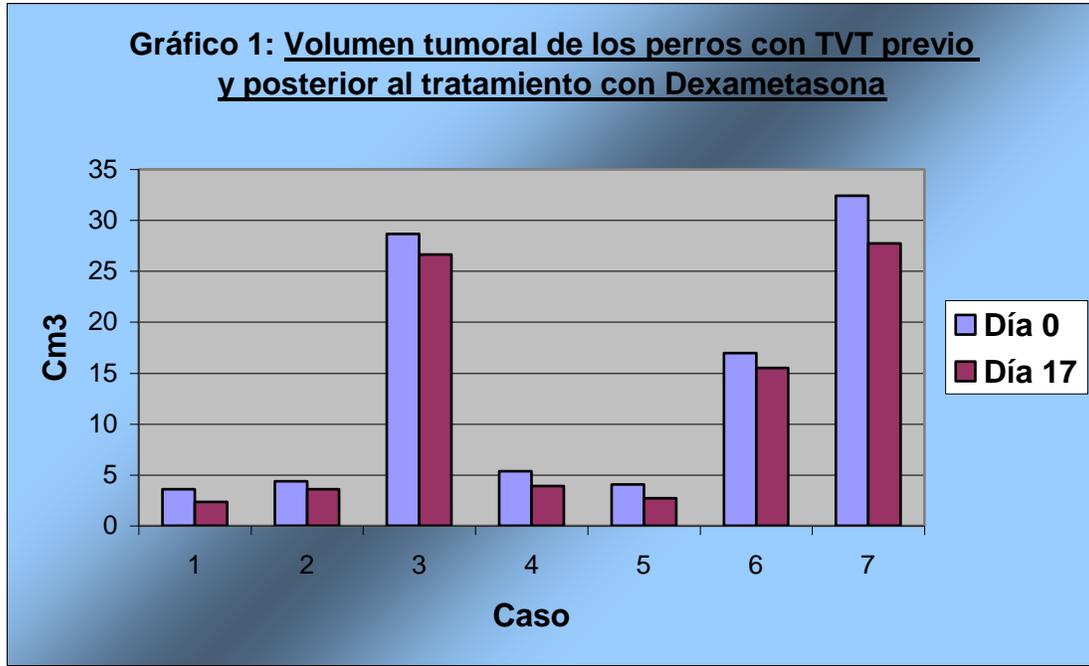
Previo al tratamiento con dexametasona el volumen promedio fue de 13,63 cm³, teniendo 3,6 cm³ el tumor más pequeño (caso 1) y 32,4 cm³ el más grande (caso 7).

Al final del tratamiento con dexametasona se observó una disminución en todos los casos, aunque ésta no fue estadísticamente significativa. El volumen promedio fue de 11,78 cm³, siendo el caso 2 el que presentó la menor variación volumétrica (0,79 cm³) y el caso 7 el que presentó la mayor disminución (4,66 cm³). La disminución promedio de los 7 casos fue de 1,85 cm³ al día 17.

La tabla 4 muestra el volumen tumoral previo, durante y posterior al tratamiento con dexametasona, los promedios de cada día y la disminución volumétrica luego del tratamiento.

Tabla 4: <u>Volumen tumoral (cm³) de los perros con TVT previo, durante y posterior al tratamiento con Dexametasona</u>										
Caso	día 0	día 2	día 4	día 6	día 8	día 10	día 12	día 14	día 17	0 - 17
1	3,6	3,6	3,38	2,94	2,94	2,74	2,37	2,37	2,37	1,23
2	4,39	4,39	4,39	4,39	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	0,79
3	28,67	28,67	28,67	28,67	28,67	27,65	27,65	27,65	26,62	2,05
4	5,38	5,38	5,38	5,38	4,5	3,92	3,92	3,92	3,92	1,46
5	4,05	4,05	3,76	3,76	3,47	3,07	2,7	2,7	2,7	1,35
6	16,93	16,93	16,93	16,93	16,93	16,93	16,93	15,49	15,49	1,44
7	32,4	32,4	32,4	29,4	29,4	29,4	29,4	29,4	27,74	4,66
promedio	13,63	13,63	13,56	13,07	12,79	12,47	12,37	12,16	11,78	1,85

El gráfico 3 compara los valores del día 0 y el día 17 (los valores con que se calculó el volumen se muestran en el anexo 5).



5.3. Área Vascular

Previo al tratamiento con Dexametasona, el área vascular promedio de los 7 casos fue de $5070,8 \mu\text{m}^2$. El caso 5 presentó el valor promedio más alto ($8214,07 \mu\text{m}^2$) y el caso 1 el menor ($1646,41 \mu\text{m}^2$) (Figuras 1a y 1b).

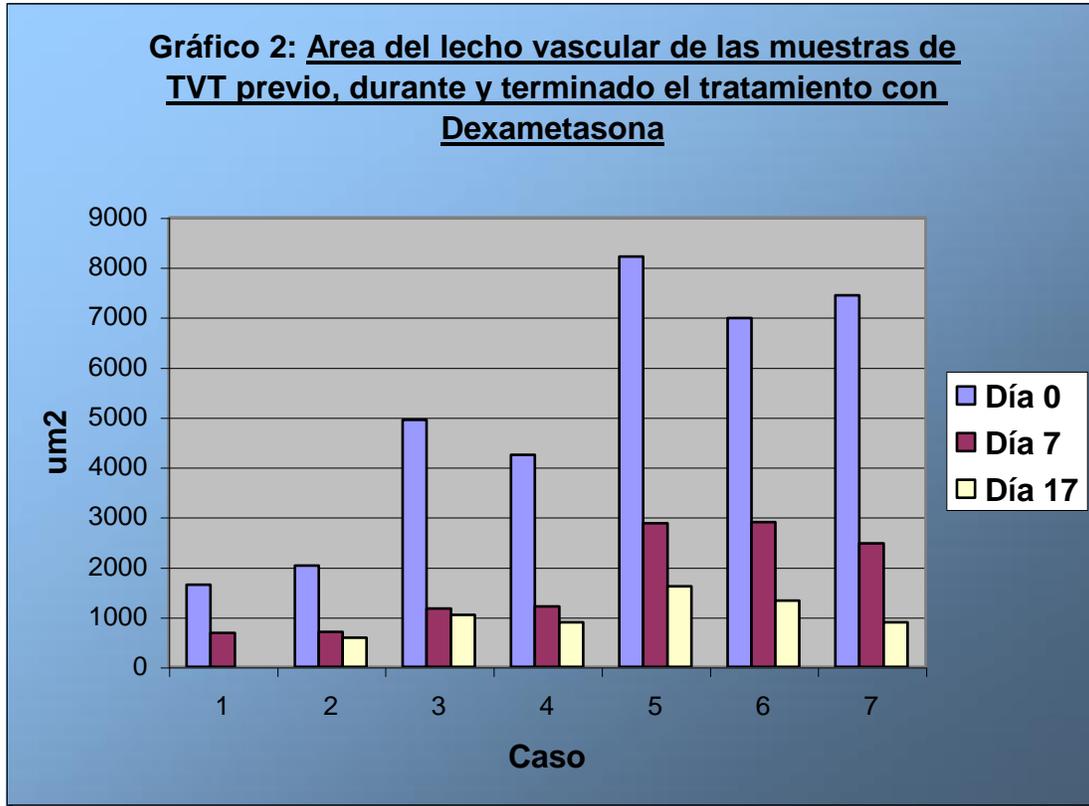
En todos los casos se observó disminución del área inmunomarcada en relación con el día 0. El área vascular promedio, para los 7 casos, fue de $1716,82 \mu\text{m}^2$ al día 7 de tratamiento y de $1056,88 \mu\text{m}^2$ al día 17, lo que significa una disminución promedio de $4013,92 \mu\text{m}^2$ con respecto al promedio antes del tratamiento. El caso que presentó el mayor cambio fue el 5, cuya área vascular presentó una disminución de $6603,41 \mu\text{m}^2$, mientras que la menor disminución fue del caso 2, que perdió $1443,15 \mu\text{m}^2$ (Figuras 2a y 2b).

La Tabla 5 muestra el área del lecho vascular (promedio de 5 campos), expresada en micrómetros cuadrados (μm^2), de los tumores previo al tratamiento con dexametasona (día

0), durante (día 7) y terminado éste (día 17). Además se muestran los promedios por día y la disminución al día 7 de tratamiento y terminado éste (los valores obtenidos por campo se muestran en el anexo 6).

Tabla 5: <u>Área vascular (μm^2) de las muestras de TVT previo, durante y terminado el tratamiento con Dexametasona</u>					
Caso	Día 0	Día 7	Día 17	0 - 7	0 - 17
1	1646,41	677,35		969,06	
2	2026,95	702,11	583,8	1324,84	1443,15
3	4941,64	1168,15	1041,35	3773,49	3900,29
4	4249,69	1211,43	894,76	3038,26	3354,93
5	8214,07	2880,58	1610,66	5333,49	6603,41
6	6982,2	2900,15	1323,37	4082,05	5658,83
7	7434,58	2477,97	887,31	4956,61	6547,27
Promedio	5070,8	1716,82	1056,88	3353,97	4013,92

El Gráfico 4 muestra los valores de la tabla 5 para el área vascular de las muestras tumorales previo, durante y terminado el tratamiento con dexametasona. Se encontraron diferencias significativas entre el área vascular de las muestras tumorales antes del tratamiento (día 0) y luego de 14 días de tratamiento (día 17) ($p \leq 0,05$), incluso las hubo luego de 7 días de tratamiento con Dexametasona ($p \leq 0,05$).



5.4. Análisis descriptivo del lecho vascular

Previo al tratamiento con Dexametasona se observó, con la tinción de van Gieson, que los tipos de vasos sanguíneos predominantes correspondían a capilares, arteriolas y vénulas, sin un predominio notorio de uno sobre otro (Figura 3). Estos vasos se observaron, en general, dilatados conteniendo una cantidad importante de glóbulos rojos en su interior, los que se observaron de un color anaranjado con la tinción Papanicolau (Figura 4). Además se observan brotes endoteliales, que corresponden a células endoteliales que emergen para originar nuevos vasos (Figura 5a y 5b).

Luego de 14 días de tratamiento con dexametasona, los tipos de vasos sanguíneos y su distribución fueron similares a lo observado previo al tratamiento, sin embargo, estos vasos no se encontraron distendidos y con escasa presencia de glóbulos rojos en su interior (Figura 6).

La cantidad de vasos sanguíneos presentes en las muestras posteriores al tratamiento fue notoriamente menor que en las muestras tomadas previo al tratamiento con dexametasona (Figuras 2a y 2b).

Galería de Imágenes

Fig. 1a

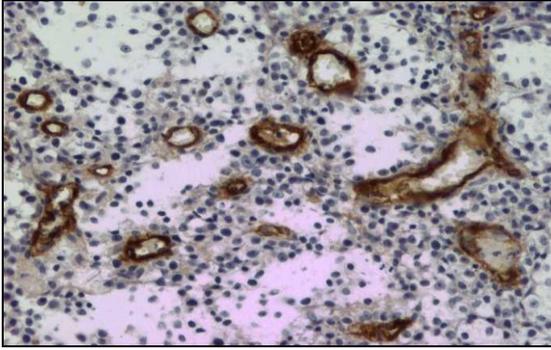
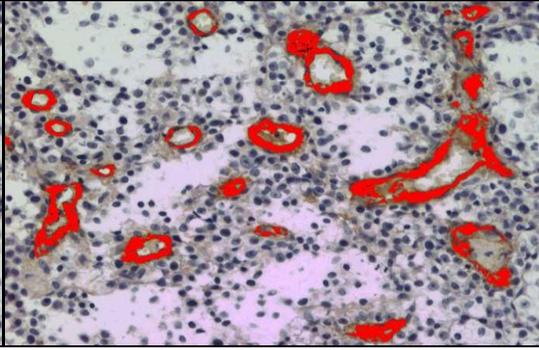


Fig. 1b



Cortes de TVT previo al tratamiento con dexametasona, donde se observan abundantes vasos sanguíneos teñidos de color café oscuro con tinción inmunohistoquímica anti-factor de vonWillebrand (1a) y luego de ser marcados de color rojo para medición del área vascular (1b) (200X).

Fig. 2a

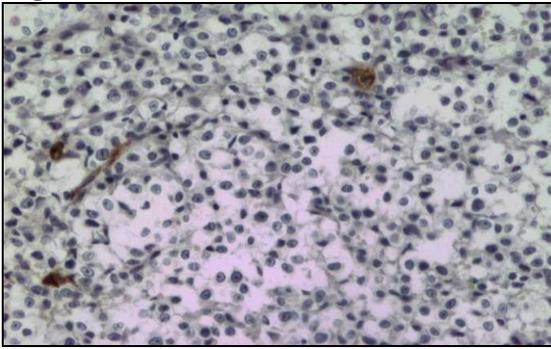
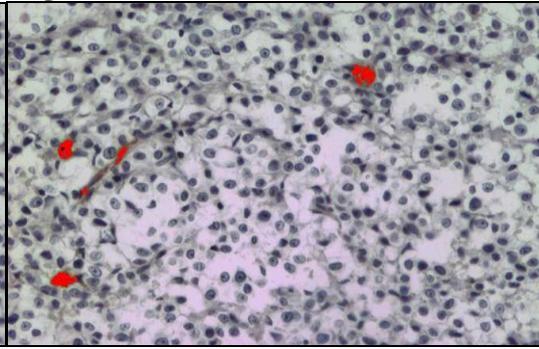


Fig. 2b



Cortes de TVT luego de 14 días de tratamiento con dexametasona donde se observa escasa cantidad de vasos sanguíneos teñidos de color café oscuro con tinción inmunohistoquímica anti-factor de vonWillebrand, previo (2a) y posterior (2b) a ser marcados de color rojo para medición del área vascular (200X).

Fig. 3

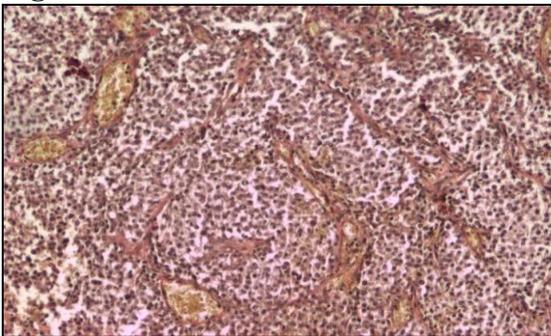
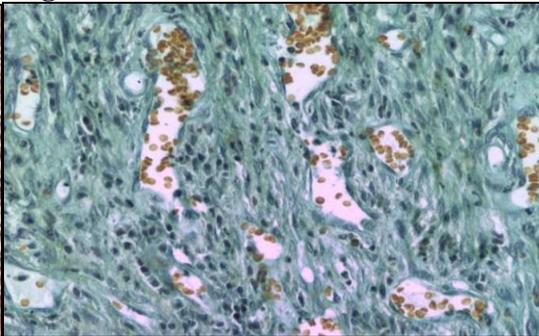


Fig. 4



Cortes de TVT previo al tratamiento con dexametasona donde se observa abundante cantidad de capilares y pequeños vasos teñidos de color anaranjado con tinción de

vanGieson (3). Estos vasos contienen una importante cantidad de glóbulos rojos en su interior, los que se observan de color anaranjado con tinción Papanicolau (4) (200X).

Fig. 5 a

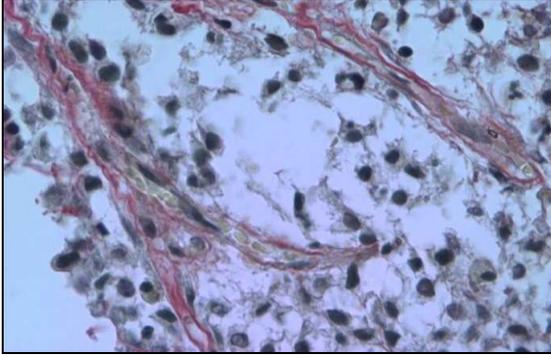
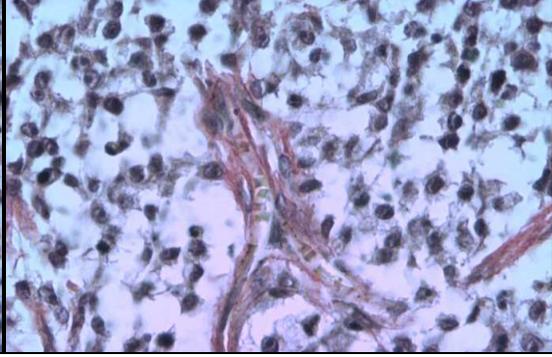
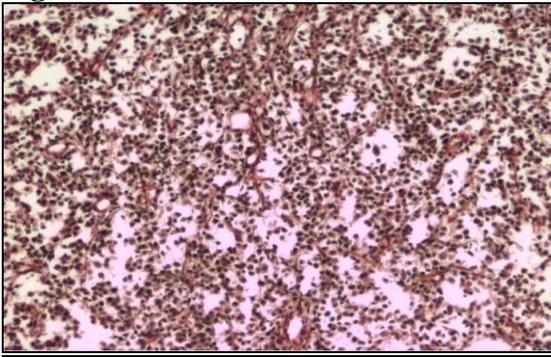


Fig. 5b



Cortes de TVT teñidos con vanGieson donde se observan “brotos” endoteliales que emergen de pequeños capilares (400X).

Fig. 6



Corte de TVT luego de 14 días de tratamiento con dexametasona, teñido con vanGieson, donde se observa escasa cantidad de vasos sanguíneos (capilares), los que no contienen glóbulos rojos en su interior (200X).

6. DISCUSION

6.1. Hemograma y Perfil Bioquímico de los perros tratados con Dexametasona

Al analizar en forma conjunta el Hemograma y el Perfil Bioquímico, especialmente este último, de los perros tratados con dexametasona, se apreciaron alteraciones compatibles con un efecto negativo del corticoide a nivel hepático, lo que coincide con lo descrito por Rogers y Ruebner (1977), quienes observaron lesiones hepáticas asociadas a la administración de corticoides en perros, los que parecen ser particularmente susceptibles a presentar hepatopatías inducidas por el uso de corticoides. Estos hallazgos se relacionan con un incremento de los niveles de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en la sangre (Schimmer y Parker, 2003), incremento que se vio en los 7 casos en estudio. Junto con esto se observó un aumento de la enzima alanino amino-transferasa (ALT) en 6 casos, cuyo incremento se relaciona con alteración a nivel de canalículos hepáticos. Otras alteraciones características en patologías hepáticas como el aumento de los niveles sanguíneos de bilirrubina sólo las presentó un caso, lo que podría estar explicado por factores individuales y un por un efecto a menor nivel del corticoide en el hígado.

Otros efectos del uso de corticoides que podrían explicar las alzas de las enzimas anteriormente señaladas, especialmente de FA, serían aquellos derivados de su actividad catabólica sobre músculo y hueso (Schimmer y Parker, 2003), sin embargo, esto no pudo ser corroborado en este trabajo.

En 4 y 5 casos respectivamente se presentó rouleaux (distribución de los glóbulos rojos en “pilas de monedas”) y policromacia (coloración plomiza de los eritrocitos), que, aunque fueron de grado leve, podrían tener relación con una alteración de la función hepática, ya que el hígado, junto con el bazo, ayuda a la eliminación de eritrocitos envejecidos (Montes, 2002). Sin embargo, ambas son alteraciones que se presentan en animales sanos y no se relacionan necesariamente con alguna patología.

La presencia de trombocitopenia en 3 casos no estaría asociada con los hallazgos señalados anteriormente, por el contrario, se postula que los corticoides aumentarían la producción de plaquetas (McDonald, 1988). Además, los valores observados no serían suficientes para provocar un desorden de coagulación, el que se produciría con valores inferiores a 20.000 plaquetas/ μ L (Rudolph, 2002)

Es importante señalar que ninguno de los 7 casos en estudio presentó signos clínicos de enfermedad durante o terminado el tratamiento con la dexametasona, excepto algunos episodios de diarrea en los primeros días de tratamiento que fueron atribuidos al cambio de alimento. Esto no descarta, sin embargo, la presentación subclínica de alguna patología que pudiera explicar las alteraciones antes señaladas y que, ya sea por la duración del tratamiento o por las dosis empleadas, no evolucionó a un cuadro clínico.

6.2. Área vascular y tamaño tumoral

La disponibilidad de anticuerpos dirigidos contra células endoteliales ha hecho posible, mediante técnicas inmunohistoquímicas, una fácil y rápida evaluación de la actividad angiogénica en neoplasias, permitiendo determinar el efecto de drogas que

interfieren con la proliferación vascular. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en medicina humana (Obermair *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000; Izawa y Dinney, 2001).

Los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo anti-factor de vonWillebrand fueron muy satisfactorios, coincidiendo con lo observado en varios tipos de cáncer en humanos (Weidner *et al.*, 1991; Obermair *et al.*, 1998) y en animales (Griffei *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000c). Este método, complementado con el análisis de imágenes asistido por un computador permitió obtener registros precisos, rápidos y objetivos, demostrando ser una metodología útil para la evaluación de neoplasias, coincidiendo con lo informado sobre vascularización tumoral en tumores mamarios en caninos (Griffei *et al.*, 1998) y en TVT (González *et al.*, 2000c).

La disminución significativa ($p \leq 0,05$) del área del lecho vascular lograda en este trabajo, después de 14 días de tratamiento con dexametasona, concuerda con el aspecto macroscópico que presentaron los tumores terminado el tratamiento, los que se observaron moderadamente más pálidos y menos hemorrágicos que al inicio del tratamiento, así como también con lo observado histológicamente en las muestras teñidas con tinciones corrientes.

Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura para la dexametasona, aunque no hay datos del uso de la droga en TVT, así Crum *et al.* (1985) e Ingber *et al.* (1986) encontraron que dexametasona y otros corticoides asociados con heparina, inhibían la proliferación vascular en la membrana corio-alantoídea de embriones de pollo. Kull (1988) observó que Dexametasona inhibía la angiogénesis en una línea de carcinoma mamario humano implantado en ratas, Arizawa *et al.* (1995) observaron que esta droga inhibía la angiogénesis y disminuía la metástasis de una línea de cáncer de colon humano en un modelo animal. Hori *et al.* (1987) vieron que el corticoide también inhibía el proceso

en implantes de esponja colocados en ratones. Lansink *et al.* (1998) observaron, en un modelo *in vitro* de células endoteliales humanas, que dexametasona inhibía casi completamente la formación tubular de los vasos sanguíneos.

En la mayoría de estos casos, la inhibición de la angiogénesis estaría dada, además de su efecto pro-apoptótico sobre las células endoteliales, por la inhibición de algunas moléculas como el activador de plasminógeno (PA), el cual transforma el plasminógeno en plasmina, molécula que tiene un efecto proteolítico sobre la matriz extracelular, permitiendo el avance de las células endoteliales activadas y la formación de nuevos vasos (Lansink *et al.*, 1998). Además, la plasmina activa ciertas metaloproteinasas, moléculas fundamentales para la migración de células endoteliales (Griffioen y Molema, 2000). Otra molécula inhibida por la dexametasona sería el factor de necrosis tumoral (TNF), que induce la activación de integrinas y estas facilitan la adhesión de los nuevos vasos a la matriz extracelular (Griffioen y Molema, 2000).

A pesar de estos resultados, en la literatura también se describe que, por sí sola, la Dexametasona no inhibiría la proliferación vascular (Folkman *et al.*, 1983).

Aunque el análisis computacional mostró una significativa disminución del lecho vascular, al análisis descriptivo con técnicas corrientes no se encontraron variaciones en los tipos de vasos sanguíneos a pesar de que se esperaba encontrar un tipo de vaso más maduro si pensamos que las drogas anti-angiogénicas deberían actuar sobre los nuevos vasos en formación. Esto podría deberse a un efecto anti-angiogénico indirecto de la dexametasona, caracterizado por la inducción de apoptosis sobre las células endoteliales, mecanismo mediado por la activación de caspasas, según Zhivotovsky *et al.* (1997) más que a un efecto anti-angiogénico propiamente tal. De esta forma se inicia la cascada apoptótica, llevando a la muerte celular.

La disminución observada en el tamaño tumoral de los 7 casos luego de 2 semanas de tratamiento con dexametasona, concuerda con lo descrito en la literatura para otras drogas anti-angiogénicas en general (Folkman, 1995; Brem, 1999). Es decir que si bien existe una disminución, sólo es importante en períodos prolongados de tratamiento. Sin embargo, no hay datos consignados en la literatura sobre la relación entre tamaño tumoral y el tratamiento con dexametasona como droga anti-angiogénica.

Esta leve disminución podría deberse a que este tipo de drogas, generalmente, bloquean la neovascularización inhibiendo la proliferación y migración de células endoteliales, más que matando estas células. Así mismo, hay que considerar que en un tumor como el TVT de nuestro estudio (no así otros estudios, que generalmente utilizan tumores inducidos o modelos de embrión de pollo), la regresión o involución de un lecho capilar que crece vigorosamente es un proceso más lento que la lisis de las células tumorales (Folkman, 1995), requiriendo, esta modalidad de terapia, de tratamientos prolongados que deberían estar dirigidos a producir una estabilización de la enfermedad más que la reducción completa del tumor, según lo planteado por Fidler *et al.* (2001). Además, no se debería esperar una reducción total del volumen tumoral ya que, como se ha informado en la literatura (Rak *et al.*, 1995; Carmeliet y Jain, 2000; Folkman, 2001) tumores menores a 1 o 2 mm de diámetro pueden sobrevivir sin aporte de nuevos vasos sanguíneos, lo que haría imposible eliminar completamente una masa tumoral utilizando sólo terapia anti-angiogénica.

Por estas razones, se postula que esta nueva modalidad de terapia y, por lo tanto, cualquier droga anti-angiogénica, debería ser utilizada como complemento a otras modalidades de terapia contra el cáncer como quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, más que como única estrategia.

De esta forma se ha abierto un nuevo campo en el área de la terapia anticancerosa, con prometedores resultados, llevando al desarrollo de inhibidores sintéticos del proceso angiogénico, como la talidomida, o de origen endógeno, como la angiostatina o la endostatina, orientados principalmente al campo de la medicina humana, pero con la posibilidad cierta de que en un futuro próximo se logre un desarrollo de este campo en la medicina veterinaria y tengamos nuevas armas con que contar para el tratamiento del cáncer en animales.

7. CONCLUSIONES

- La dexametasona disminuyó significativamente la actividad angiogénica en el TVT canino de ocurrencia natural.

- La actividad angiogénica disminuida por la dexametasona no se refleja en una disminución significativa con el tamaño tumoral, al menos en el corto plazo en que se realizó este ensayo.

- La dexametasona, con las dosis y el tiempo empleados, no afectó la salud de los pacientes, sin embargo, su uso más prolongado o con dosis más elevadas requeriría evaluación permanente del paciente.

- El uso de anticuerpos policlonales contra el factor de vonWillebrand, asociado al análisis morfométrico a través un programa computacional, resultó ser una metodología fácil, rápida y confiable para evaluar la actividad angiogénica del TVT canino de ocurrencia natural.

8. BIBLIOGRAFIA

AGUAYO, A.; KANTARJIAN, H.; MANSHOURI, T.; GIDEL, C.; ESTEY, E.; THOMAS, D.; KOLLER, C.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KEATING, M.; FREIREICH, E.; ALBITAR, M. 2000. Angiogenesis in Acute and Chronic Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. *Blood*, 96(6): 2240-2245.

ALBEROLA, J. 2001. Oxigenación tumoral, Angiogénesis y Metástasis. Una Vía Abierta a la Investigación. *Revisiones en Cáncer*, 15(2): 8-18.

AMBER, E.I.; ISITOR, G.N.; ADEYANJU, J.B. 1985. Viral-like particles associated with naturally occurring transmissible venereal tumor in two dogs: Preliminary report. *American Journal of Veterinary Research*, 46(12): 2613-2615.

ARIZAWA, Y.; SUTANTO-WARD, E.; FORTUNATO, L.; SIGURDSON, R. 1995. Hepatic Artery Dexamethasone Infusion Inhibits Colorectal Hepatic Metastases: a Regional Antiangiogenic Therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 2(2): 114-120.

BATAMUZI, E.K.; KESSY, B.M. 1993. Role of exfoliative cytology in the diagnosis of canine transmissible venereal tumour. *Journal of Small Animal Practice*, 34: 399-401.

BESCHORNER, W.E.; HESS, A.D.; NERENBERG, S.T.; EPSTEIN, R.B. 1979. Isolation and Characterization of Canine Venereal Tumor-associated Inhibitory and Blocking Factors. *Cancer Research*, 39: 3920-3927.

BOEHM, T.; FOLKMAN, J.; BROWDER, T.; O'REILLY, M. 1997. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390: 404-407.

- BOOTH, M.J.** 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadeno-carcinoma in a bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 35: 39-42.
- BREM, S.** 1999. Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control Journal*, 6(5): 436-459.
- BROWN, N.O.; CALVERT, C.; MACEWEN, E.G.** 1980. Chemotherapeutic Management of Transmissible Venereal Tumors in 30 Dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 176: 983-986.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B.** 2003. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. In: Goodman-Gilman, A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 10^a edición. Editorial MacGraw Hill. Ciudad de México, México. Pp: 1667-1696.
- CALVERT, A.; LEIFER, C.E.; MACEWEN, E.G.** 1982. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *Journal of American Veterinary Association*, 181: 163-164.
- CARMELIET, P.; JAIN, R.** 2000. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* 407: 249-257.
- COHEN, D.** 1973. The Biological Behaviour of the Transmissible Venereal Tumour in Immunosuppressed Dogs. *European Journal of Cancer*, 9: 253-258.
- CORNELIUS, L.; NERHING, L.; HARDING, E.; BOLANOWSKI, M.; WELGUS, H.; COBAYASHI, D.; PIERCE, R.; SHAPIRO, S.** 1998. Matrix Metalloproteinases Generate Angiostatin: Effects on Neovascularization. *The Journal of Immunology*, 161: 6845-6852.
- CRUM, R.; SZABO, S.; FOLKMAN, J.** 1985. A New Class of Steroids Inhibits Angiogenesis in the Presence of Heparin or a Heparin Fragment. *Science*, 230(4732): 1375-1378.

- CRYNS, V.; YUAN, J.** 1998. Proteases to Die for. *Genes and Development*, 12(11): 1551-1570.
- DIMMELER, S.; ZEIHNER, A.** 2000. Endothelial Cell Apoptosis in Angiogenesis and Vessel Regression. *Circulation Research*, 87: 434-441.
- EPSTEIN, R.B.; BENNETT, B.T.** 1974. Histocompatibility Typing and Course of Canine Venereal Tumors Transplanted into Unmodified Random Dogs. *Cancer Research*, 34: 788-793.
- FIDLER, I.; KERBEL, R.; ELLIS, L.** 2001. Biology of cancer : Angiogenesis. **In:** DeVita, V.; Hellman, S. ; Rosenberg, S. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 6^{ta} edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos. Pp: 137-147.
- 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.
- FLORES, E.; GONZALEZ, C.; CATTANEO, G.; LOMBARDI, C.; DIEZ, X.** 1997. Chemotherapy In Transmissible Venereal Tumor(Tvt) In Dogs. **In:** Rossi L.; Richardson R.; Harshbargere J. *Spontaneous Animal Tumors: A Survey*. Italy. Pp: 399-402.
- FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZALEZ, C.; CEPEDA, R.** 2000. Tumor Venéreo Transmisible. Aspectos Históricos, Epidemiológicos y Terapéuticos. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 20 (1): 82 – 93.
- FOLKMAN, J.; LANGER, R.; LINHARDT, R.; HAUDENSCHILD, C.** 1983. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science*, 221: 719-725.

FOLKMAN J. INGBER D. 1987. Angiostatic steroids: method of discovery and mechanism of action. *Annals of Surgery*, 206: 374-383.

FOLKMAN, J. 1995. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 333: 1757-1763.

FOLKMAN, J. 2001. Angiogenesis. **In:** Braunwald, E.; Fauci, A.; Hauser, S.; Jameson, J.; Kasper, D. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Vol. 1). 15th edition. Editorial McGraw-Hill. USA. Pp: 517-530.

GOLDENBERG, N. 1995. Elucidating Angiogenesis: The Role of Basement Membrane Proteolysis and Endothelial Cell Motility and Proliferation. *McGill Journal of Medicine*, 1: 127-137.

GONZALEZ, C.M.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO,G.; MADEWELL, B.R. 2000a. Canine Transmissible Venereal Tumour: a Morphological and Immunohistochemical Study of 11 Tumours in Growth Phase and during Regresión alter Chemotherapy. *Journal of Complete Pathology*, 122: 241-248.

GONZALEZ, C.; FLORES, E.; CATTANEO, G.; CEPEDA, R.; LOMBARDI, C. 2000b. Respuesta Leucocitaria Local en Tumor Venéreo Transmisible del Canino en Fase Progresiva y en Regresión Inducida con Vincristina. *Avances de Medicina Veterinaria*, 15 (1 y 2): 45 - 53.

GRIFFEY, S.; VERSTRAETE, F.; KRAEGEL, S.; LUCROY,M.; MADEWEL, B. 1998. Computer-assisted Image Analysis of Intratumoral Vessel density in Mamary Tumors from Dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 59(10): 1238-1242.

- 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.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.** 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- HAYES, A.; LIPPMAN, E.** 1999. Antivascular Therapy: a New Approach to Cancer treatment. *British Molecular Journal*, 318: 853-856.
- HILL, D.L.; YANG, T.J.; WACHTEL, A.** 1984. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Tumor Cell and Infiltrating Leukocyte Ultrastructure at Different Growth Stages. *Veterinary Pathology*, 21: 39-45.
- HORI, Y.; HU, D.; YASUI, K.; SMITHER, R.; GRESHAM, G.; FAN, T.** 1987. Differential Effects of Angiostatic Steroids and Dexamethasone on Angiogenesis and Cytokine Levels in Rat Sponge Implants. *British Journal of Pharmacology*, 118: 1584-1591.
- IDOWU, A.L.** 1975. Chromosomes of an Extragenitally Located Transmissible Venereal Tumor in a Dog. *Journal of Small Animal Practice*, 25: 193-198.
- INGBER, D.; MADRI, J.; FOLKMAN, J.** 1986. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology*, 119: 1768-1775.
- IZAWA, J.; DINNEY, C.** 2001. The Role of Angiogenesis in Prostate and Other Urologic cancers: a review. *Canadian Medical Association Journal*, 164(5): 662-670.
- JEGLUM, K.** 1994. Principios de la Terapia Anticancerosa. **In:** Villouta, G.; Gonzáles, C. Compendio del Curso Internacional de Oncología Veterinaria. U. Chile, Fac. Cs.

Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Postgrado, Dpto. Patología Animal. Santiago, Chile. pp: 26-30.

KERBEL, R. 1997. A Cancer Therapy Resistant to Resistance. *Nature*, 390: 335-336.

KORSMEYER, S.; ZINKEL, S. 2001. Molecular biology of cancer: Apoptosis. **In:** DeVita, V.; Hellman, S. ; Rosenberg, S. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 6^{ta} edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos. Pp: 111-122.

KULL, F. 1988. Reduction in Tumor Necrosis Factor Receptor Affinity and Cytotoxicity by Glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Commun*, 153(1): 409-409.

LANSINK, M.; KOOLWIJK, P.; VAN HINSBERGH, V.; KOOISTRA, T. 1998. Effects of Steroid Hormones and Retinoids on the Formation of Capillary-like Tubular Structures of Human Microvascular Endothelial Cells in Fibrin Matrices is Related to Urokinase Expression. *Blood*, 92(3): 927-938.

LOPEZ, M.; LEYGTHON, C.; GRAF, M. Técnicas de Laboratorio para Citología e Histopatología. 2^a edición. U. de Chile, Fac. de Medicina, Dpto. de Biología celular y Genética. Pp: 104-111.

LOPEZ-GRANIEL, C.; MENESES, A. 2000. Angiogenesis. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 46(2): 78-80.

MALONNE, H.; LANGER, I.; KISS, R. 1999. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical and Experimental Metastasis* 17: 1-14.

MCDONALD, L. 1988. Hormonas que influyen sobre el metabolismo. **In:** Booth, N.; McDonald, L. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria (Vol 1)*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pp: 629-672.

MONTES, G. 2002. Eritrocitos. **In:** Rudolph, W.; Villouta, G. Manual de hematología clínica veterinaria. U. de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pec., Dpto. de Patología Animal. Santiago, Chile. Pp: 23-33.

MORENO, A.; VIDART, J.; GONZALEZ, L.; ASENJO, J.; FURIO, V.; CORONADO, P.; CRISTOBAL, I.; HERRAIZ, M.; ESCUDERO, M. 2000. La Medición de la Angiogénesis Tumoral Como Factor Pronóstico Eficaz Para el Cáncer de Ovario. Resultados Preliminares. Acta Obstetricia et Ginecológica, 13(6): 326-330.

OBERMAIR, A.; WANNER, C.; BILGI, S.; SPEISER, P.; KAIDER, A.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; GITSCH, G. 1998. Tumor Angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density With Survival. American Journal of Obstetric and Gynecology, 1996: 126-131.

O'REILLY, M.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 88: 277-285.

O'REILLY, M. 2002. The Combination of Antiangiogenic Therapy with Other Modalities. The Cancer Journal, 8(1): 89-99.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. 2002. Mechanisms of Normal and Tumor-Derived Angiogenesis. American Journal of Physiology and Cell Physiology, 282(5): 947-970.

PEREZ, L.; VERGARA, K.; VENTURA, J.; LETELIER, I. 1978. Tratamiento Quirúrgico y Quimioterapéutico del Tumor Venéreo Transmisible de Localización Nasal en Caninos. Archivos de Medicina Veterinaria, 10(2): 149-152.

POLANCO, M. 2001. Expresión de antígenos de histocompatibilidad clase 2 en tumor venéreo transmisible del canino, en fase progresiva y regresión. Memoria de título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pec. 52 p.

- RAK, J.; ST CROIX, B.; KERBEL, R.** 1995. Consequences of Angiogenesis for Tumor Progression, Metastasis and Cancer Therapy. *Anti Cancer Drugs*, 6: 3–18.
- RAMANUJAN, S.; KOENING, G.; PADERA, T.; STOLL, B.; JAIN, R.** 2000. Local Imbalance of Proangiogenic and Antiangiogenic Factors: A Potential Mechanism of Focal Necrosis and Dormancy in Tumors. *Cancer Research*, 60: 1442-1448.
- RISAU, W.** 1997. Mechanism of Angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
- ROGERS, W.; RUEBNER, B.** 1977. A retrospective study of probable glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 170: 603-611.
- ROGERS, K.S.** 1997. Transmissible Venereal Tumor. *The Compendium of Continuing Education*, 19(9): 1036-1045.
- RUDOLPH, W.** 2002. Hemostasis. **In:** Rudolph, W.; Villouta, G. *Manual de Hematología Clínica Veterinaria*. U. de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pec., Dpto. de Patología Animal. Santiago, Chile. Pp: 59-71.
- SCAPPATICCI, F.** 2002. Mechanisms and Future Directions for Angiogenesis-Based Cancer Therapies. *Journal of Clinical Oncology*, 20(18): 3906-3927.
- SCHIMMER, B.; PARKER, K.** 2003. Corticotropina; esteroides de la corteza suprarrenal y sus análogos sintéticos; inhibidores de la síntesis y efectos de las hormonas suprarrenales. **In:** Goodman-Gilman, A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 10^a edición. Editorial MacGraw Hill. Ciudad de México, México. Pp: 1667-1696.
- STETLER-STEVENSON, W.** 1999. Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis: a Moving Target for Therapeutic Intervention. *Journal of Clinical Investigation*, 103(9): 1237-1241.

- THRALL, D.E.** 1982. Orthovoltage radiotherapy of canine transmissible venereal tumors. *Veterinary Radiology*, 23(5): 217-219.
- 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. Santiago, Chile. U. De Chile, Fac. De Cs. Vet. Y Pec. 64 p.
- TSUZUKI, Y.; FUKUMURA, D.; OOSTHUYSE, B.; KOIKE, C.; CARMELIET, P.; JAIN, R.** 2000. Vascular Endothelial growth Factor (VEGF). Modulation by Targeting Hypoxia-inducible Factor-1. Hypoxia Response Element VEGF Cascade. Differentially Regulates Vascular Response and Growth Rate in Tumors. *Cancer Research*, 60: 6248-6252.
- VEIKKOLA, T.; KARKKAINEN, M.; CLAEISSON-WELSH, L.; ALITALO, K.** 2000. Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cancer Research*, 60: 203-212.
- WEIDNER, N.; SEMPLE, J.; WELCH, W.; FOLKMAN, J.** 1991. Tumor Angiogenesis and Metastasis – Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 324(1): 1-8.
- ZETTER, B.** 1998. Angiogenesis and Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Med.*, 49: 407-424.
- ZHIVOTOVSKY, B.; BURGESS, D.; SCHKEGEL, J.; PORN, M.; VANAGS, D.; ORRENIUS, S.** 1997. Proteases is Fas-mediated Apoptosis. *Journal of Cell Biochemistry.*, 64(1): 43-49.

Anexos

Anexo 1

<u>Anexo 1: Esquema de procedimientos realizados a los pacientes con TVT</u>				
Día 0	Días 1 a 7		Días 8 a 14	Día 17
	Dexametasona		Dexametasona (reducción)	
1 ^{era} biopsia 1 ^{er} Hemograma y Perfil Bioquímico		Día 7 2 ^{da} biopsia		3 ^{era} biopsia 2 ^{do} Hemograma y Perfil Bioquímico

Anexo 2

Silanización de portaobjetos

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

Anexo 3

Técnica inmunohistoquímica anti – factor de vonWillebrand

- Desparafinado
- Recuperación de inmuno-rreactividad con Proteinase K enzyme (DAKO[®], Dinamarca): 2 gotas diluídas en 4 ml de Tris-cloro. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente, en agitador.
- Lavado con agua destilada: un lavado rápido, seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Bloqueo de la peroxidasa endógena con Peroxidase Blocking reagent (ready to use) (DAKO[®], Dinamarca): sacar el excedente de agua y luego aplicar el producto sobre todo el tejido. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente, en agitador.
- Lavado con agua destilada: un lavado rápido, seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Bloqueo de uniones inespecíficas con Protein Block Serum-free (ready to use) (DAKO[®], Dinamarca): sacar el excedente de agua y luego aplicar el producto sobre todo el tejido. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente, en agitador.
- Incubación con anticuerpo primario anti-factor de Von Willebrand (DAKO[®], Dinamarca): diluir 0.5ul/1000ul en PBS más BSA al 1%. Sacar el excedente del bloqueador aplicado en el paso anterior y luego aplicar la dilución sobre todo el tejido. Incubar toda la noche en refrigeración (2°-4°).
- Lavado con PBS: un lavado rápido seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Incubación con anticuerpo secundario biotinilado Swine anti-rabbit (DAKO[®], Dinamarca): diluir 1ul/400ul en PBS más BSA al 1%. Sacar el excedente de PBS y

luego aplicar el producto sobre todo el tejido. Dejar 1 hora a temperatura ambiente, en agitador.

- Lavado con PBS: un lavado rápido seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Incubación con conjugado Estreptavidina-peroxidasa, Streptavidin (DAKO[®], Dinamarca): diluir 1ul/400ul en PBS más BSA al 1%. Sacar el excedente de PBS y luego aplicar el producto sobre todo el tejido. Dejar 1 hora a temperatura ambiente, en agitador.
- Lavado con PBS: un lavado rápido seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Revelado con Sustrato cromógeno/DAB (DAKO[®], Dinamarca): diluir 1gota/1ml de DAB. Sacar el excedente de PBS y luego aplicar el producto sobre todo el tejido. Dejar 3 minutos en oscuridad.
- Lavado con agua destilada: un lavado rápido, seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Contraintinción con Hematoxilina.
- Deshidratado, aclarado y montaje.

Anexo 4

Anexo 4: Valores obtenidos en el Hemograma y Perfil Bioquímico de los perros tratados con Dexametasona y valores normales para la especie									
Alteración	Caso	1	2	3	4	5	6	7	Valores normales*
Anisocitosis				++			++		-
Policromacia				+	+	+	+	++	-
Rouleaux				+	+	+		++	-
Anemia macrocítica							35		37 - 55 %
Trombocitopenia		176.000			188.000			147.000	200.000 - 500.000 plaquetas/ μ l
Linfopenia								660	1.000 - 4.800 linfocitos/ μ l
Desv. A la izq.				+		++			-
Monocitopenia						122			150 - 1.350 monocitos/ μ l
Eosinopenia				0					100 - 1.250 eosinófilos/ μ l
Linfocitos atípicos								+	-
Hipoproteinemia				4,3					5,4 - 7,1 g/dl
Hiperproteinemia	7,6								5,4 - 7,1 g/dl
Hipoalbuminemia				1,7			2,3		2,6 - 3,3 g/dl
Hipoglobulinemia	4,7					2,6			2,7 - 4,4 g/dl
Hiperglobulinemia									2,7 - 4,4 g/dl
NUS aumentado	35				34				10 - 30 mg/dl
Hiperbilirrubinemia total				0,8				0,7	0,1 - 0,5 mg/dl
Hiperbilirrubinemia conjugada				0,3					0,06 - 0,12 mg/dl
Hiperbilirrubinemia libre								0,6	0,01 - 0,49 mg/dl
FA aumentada	172	302	621	299	469	456	572		< 159 U/L
ALT aumentada	109	210		310	240	134	393		< 68 U/L
GGT aumentada					10		19		< 8 U/L

* Los valores normales para la especie son entregados por el Laboratorio de Patología Clínica de la facultad en sus exámenes y corresponden a valores de Shalm's Veterinary Hematology y de Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Kaneco, J.)

Anexo 5

<u>Anexo 5: Medidas tumorales (cm) de los perros con TVT tratados con Dexametasona</u>										
Caso	medición	día 0	día 2	día 4	día 6	día 8	día 10	día 12	día 14	día 17
1	largo	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4
	ancho	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3
	fondo	1,1	1,1	1,1	1	1	1	1	1	1
2	largo	2,6	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	ancho	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	fondo	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
3	largo	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,7	2,7	2,7	2,6
	ancho	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
	fondo	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
4	largo	2,1	2,1	2,1	2,1	2	2	2	2	2
	ancho	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4
	fondo	1	1	1	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8
5	largo	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	ancho	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,6	1,5	1,5	1,5
	fondo	1,2	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
6	largo	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
	ancho	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	2,2
	fondo	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
7	largo	2,5	2,5	2,5	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
	ancho	3,6	3,6	3,6	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,4
	fondo	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2

Anexo 6

Anexo 6: Area vascular (μm^2) por campo de los perros con TVT tratados con Dexametasona							
Caso	Día	campo 1	campo 2	campo 3	campo 4	campo 5	promedio
1	0	986,65	1332,65	2736,82	1838,83	1337,08	1646,406
	7	808,11	657,82	269,83	595,45	1055,53	677,348
	17						
2	0	4023,17	1633,57	1716,81	1584,57	1176,62	2026,948
	7	1700,24	282,52	619,66	571,19	336,93	702,108
	17	537,48	931,37	283,21	488,27	678,69	583,804
3	0	2512,38	10935,78	3801,97	4539,95	2918,11	4941,638
	7	1453,14	256,19	1001,17	2260,76	869,47	1168,146
	17	1002,86	1174,39	946,81			1041,3533
4	0	1979,73	4375,7	4404,47	5894,77	4593,77	4249,688
	7	1450,69	2222,6	867,24	1196,31	320,31	1211,43
	17	890,12	855,88	478,27	1211,07	1038,44	894,756
5	0	11934,7	6853,9	6188,64	6705,16	9387,94	8214,068
	7	4308,34	3966,24	3982,98	1285,44	859,92	2880,584
	17	3552,42	980,74	552,08	1896,6	1071,46	1610,66
6	0	5689,21	7998,3	6552,06	6556,21	8115,2	6982,196
	7	1889,7	1845,22	3156,19	5302,61	2307,05	2900,154
	17	2016,47	516,35	1204,43	1855,25	1024,35	1323,37
7	0	5764,5	5794,01	6330,01	8424,94	10859,44	7434,58
	7	2048,9	2376,22	1344,95	4203,97	2415,82	2477,972
	17	387,52	1570,08	885,5	1098,69	494,75	887,308