



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**APOPTOSIS EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE
CANINO, DURANTE FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA**

SUSANA REYES CABRERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: CARLOS GONZALEZ RIVEROS

SANTIAGO, CHILE

2004



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**APOPTOSIS EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE
CANINO, DURANTE FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA**

SUSANA REYES CABRERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: CARLOS GONZALEZ RIVEROS
PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA
PROFESOR CONSEJERO: GINO CATTANEO

SANTIAGO, CHILE
2004

RESUMEN

La apoptosis o muerte celular programada es la eliminación de células que ya no son necesarias o que están dañadas genéticamente. Es controlada por una variedad de genes, muchos de los cuales presentan mutación y/o disfuncionalidad en su regulación, asociada a cáncer. Cuando esto ocurre, los pacientes presentan tumores más agresivos.

La medición morfológica cuantitativa del índice apoptótico, especialmente por microscopía de luz, es difícil ya que los cambios celulares asociados son de corta duración.

En la apoptosis ocurre fragmentación del ADN, la que puede ser detectada y marcada enzimáticamente mediante la técnica denominada TUNEL (terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling). Permite detectar estados tempranos de apoptosis, incluso antes que el núcleo experimente los primeros cambios morfológicos.

El Tumor Venéreo Transmisible (T.V.T), se caracteriza por presentar una fase de crecimiento progresivo muy acelerado con gran destrucción tisular local. Sin embargo, el tratamiento con sulfato de Vincristina, a diferencia de lo que ocurre en otras neoplasias, induce la regresión de la masa tumoral hasta su completa desaparición.

En este trabajo se seleccionaron 10 caninos adultos con TVT de ubicación genital en fase progresiva de crecimiento para inducirles regresión tumoral con Sulfato de Vincristina en dosis única de 0.03mg/Kg. Se obtuvieron muestras histológicas para estudiar el comportamiento apoptótico del tumor después del tratamiento, mediante la técnica de inmunotinción TUNEL. Se digitalizaron imágenes que fueron analizadas con un software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

Se observó una intensa inmunomarcación para apoptosis en tejidos de TVT en fase regresiva, involucrando muchas células que no presentaban aún cambios morfológicos asociados a apoptosis, contrastando con una inmunomarcación ocasional, de células aisladas, en la fase progresiva de crecimiento. El área promedio de células apoptóticas fue

de $51.3 \pm 37.9 \mu\text{m}^2$ y $1396 \pm 828.6 \mu\text{m}^2$, por campo de 200X, para fase progresiva y regresiva, respectivamente, indicando una diferencia significativa entre ambas fases ($p < 0.0001$).

El tipo celular principal dentro de la población apoptótica, en ambas fases, correspondió a células tumorales con un 80.7% para fase progresiva y 89.4% para fase regresiva. Mientras, que los linfocitos representaban un 16.1% y 8.4%, en las fase progresiva y regresiva, respectivamente. Las epiteliales constituían sólo un 3.2% en fase progresiva y 2.2% en fase regresiva.

Dentro de la población apoptótica, las células de T.V.T. mostraron un aumento significativo en fase regresiva ($p < 0.001$). Los linfocitos disminuyeron en forma significativa en regresión ($p < 0.001$). En cambio, la disminución registrada en las células epiteliales en fase regresiva no fue estadísticamente significativa ($p \geq 0.05$).

Este estudio indica que la Vincristina induce regresión en T.V.T. a través de apoptosis, llevando al colapso de la masa tumoral. El mecanismo por el cual la Vincristina induciría apoptosis en T.V.T. permanece aún por aclarar, sin embargo se ha demostrado, en otras neoplasias, activación de caspasas 9 y 3, sugiriendo que este tratamiento induce apoptosis por la vía mitocondrial, involucrando mecanismos asociados a la generación de radicales derivados del oxígeno y sobre expresión de gen Bcl-2.

SUMMARY

Apoptosis or programmed cell death is a mechanism of cell elimination when they are unnecessary or genetically damaged. It is controlled by a variety of genes, many of which present mutation or dysfunction associated to cancer. When this occurs patients have more aggressive tumors. A characteristic DNA fragmentation occurs during apoptosis which can be traced and enzymatically revealed by TUNEL terminal transference mediated dUTP-biotin nick end labelling technique. This allow early apoptosis detection even before the first morphologic nuclear changes take place. In this work 10 adult canine with genital TVT were selected to undergo once single doses (0.03mg/kg) Vincristine sulphate treatment, in order to induce tumor regression. TVT samples were obtained and processed for Histological study by TUNEL immune staining. Images were digitalized and analyzed by a morphometric software (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). The mean area obtained for apoptotic cells was $51.3 \pm 37.9 \text{ mm}^2$ and $1396 \pm 828.6 \text{ mm}^2$ /200X fields, for progressive and regressive growth, respectively. This indicates an significant difference between both phaces ($p < 0.0001$). The main cell type for both tumor stages corresponded to tumor cells with 80, 7% for progressive and 89.4% for regressive growth, resulting in a significant augmentation for this latter tumor stage ($p < 0.0001$). This results indicate that Vincristine induces T.V.T. to collapse through apoptosis. The exact underlying mechanism remains to be demonstrated, however in other neoplams caspasas-9 and 3 activation has been described suggesting that the mitochondrial way is involved, through oxygen derived radical production and Bcl-2 gene overexpression.

Key words: Apoptosis, T.V.T, Vincristine, Morphometric analysis, TUNEL.

1. INTRODUCCIÓN

Las células del cáncer se diferencian de las normales por su crecimiento incontrolable, capacidad de producir metástasis, pérdida de la diferenciación celular y resistencia farmacológica.

En el cáncer, no solamente hay una alteración a nivel de proliferación celular, sino que también, en las vías apoptóticas, permitiendo la supervivencia de células neoplásicas a pesar de sus anomalías genéticas (Sjöström y Bergh, 2001).

El objetivo de la apoptosis o muerte celular programada es la eliminación de células del huésped, que ya no son necesarias, a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos (Cotran *et al.*, 2000) y puede ser gatillada por una gran variedad de estímulos externos.

La causante de los cambios morfológicos y bioquímicos que reconocemos en la apoptosis, es la activación de una familia de proteasas de cisteína intracelulares, conocidas como caspasas las cuales degradan residuos del ácido aspártico (Alnemri *et al.*, 1996). Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos, en todas las células animales, pudiendo ser gatillada a asumir un estado activo (Reed, 2000). Muchas de las vías, por la cual se lleva a cabo la apoptosis, se ven alteradas en la génesis de un tumor.

Una de las razones del gran interés científico, que ha provocado la apoptosis en los últimos años, es el hecho de estar influenciada por una variedad de genes, tanto positiva como negativamente, muchos de los cuales presentan mutación y/o disfuncionalidad en su regulación, asociada a cáncer (Mc Gill y Fisher, 1997). Entre los genes más importantes se encuentran los miembros de la familia Bcl-2 y el gen supresor tumoral p53 (Reed *et al.*, 1996).

La medición cuantitativa del índice apoptótico por medios morfológicos, especialmente por microscopía de luz, puede ser difícil ya que, la apariencia celular apoptótica se limita a unos pocos minutos y los cuerpos apoptóticos, en diversas formas pueden ser vistos sólo unas pocas horas antes de ser fagocitados (Soini y Paakko, 1999).

La fragmentación del ADN está, directamente, asociada con los cambios ultraestructurales en la morfología celular de la apoptosis (Thiry, 1992; Migheli *et al.*, 1995), estos fragmentos pueden ser detectados mediante electroforesis en gel agarosa mostrando una apariencia típica conocida como escalera de ADN (Arends *et al.*, 1990; Bursch *et al.*, 1990; Gavrieli *et al.*, 1992).

Es posible detectar apoptosis por vía de la fragmentación del ADN, mediante la técnica denominada TUNEL (terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling), donde los fragmentos de ADN y los quiebres en las hebras de ADN son detectados por un marcaje enzimático en el extremo libre 3-OH con nucleótidos modificados (Gavrieli *et al.*, 1992; Wijsman *et al.*, 1993).

Entre los tumores de más alta incidencia en caninos, se encuentra el Tumor Venéreo Transmisible (T.V.T). Esta neoplasia no se origina por transformación de células del paciente sino que se trata de un alotrasplante de células previamente transformadas, en una mucosa susceptible, generalmente genital.

El T.V.T. se caracteriza por presentar una fase de crecimiento progresivo muy acelerado con la formación de una masa tumoral importante y gran destrucción tisular local asociada. Sin embargo, el tratamiento quimioterapéutico con sulfato de Vincristina, a diferencia de lo que ocurre en otras neoplasias, logra no sólo detener el crecimiento, sino que además induce la regresión de la masa tumoral hasta su completa desaparición (Mozos *et al.*, 1996)

En este trabajo, se estudió el comportamiento apoptótico del tumor venéreo transmisible, mediante la técnica TUNEL, en fase de crecimiento progresivo y durante la regresión, inducida por el tratamiento con sulfato de Vincristina.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Generales de apoptosis

Los organismos multicelulares han desarrollado un mecanismo altamente organizado y cuidadosamente regulado de muerte celular. Durante el desarrollo embrionario normal se produce un exceso en la proliferación celular, el cual es removido por un proceso genéticamente programado y evolutivamente conservado, este mismo programa de muerte celular (apoptosis) es usado por los organismos para remover células dañadas, incluyendo células infectadas por virus (Korsmeyer y Zinkel, 2001).

Las primeras observaciones de muerte celular programada fueron hechas hace más de un siglo, donde fue reconocida en el desarrollo neuronal de la rana, por Vogt en 1842.

Kerr *et al.*, en 1972 observaron y describieron las características morfológicas de la muerte celular programada, ellos notaron que esas características eran consistente con un activo y regulado proceso y acuñaron el término apoptosis del griego, el cual significa desprendimiento o caída, de los pétalos de las flores o árboles (Wyllie, 1987).

Apoptosis, es un tipo de muerte celular morfológica y bioquímicamente, distinta, que puede ser gatillada por una variedad de agentes extracelulares, ocurriendo, tanto en el

desarrollo normal, como en estados patológicos adultos (Mc Gill y Fisher, 1997). Se puede observar en los siguientes contextos generales:

1) durante el desarrollo ; 2) como mecanismo homeostático para el mantenimiento de poblaciones celulares de tejidos; 3) como mecanismo de defensa en reacciones inmunitarias; 4) cuando las células son lesionadas por la edad o agentes lesivos, y 5) en el envejecimiento.

2.2 Fases de la apoptosis

Según Cotran *et al.*, (2000) morfológicamente la apoptosis se puede dividir en cuatro fases, claramente distinguibles:

Contracción celular. La célula tiene un tamaño menor; el citoplasma es denso; y los organelos, aunque relativamente normales, están más agrupados.

Condensación de la cromatina. Éste es el rasgo más característico de la apoptosis. La cromatina se agrega en la periferia por debajo de la membrana nuclear en masas densas bien definidas de diversas formas y tamaños. El núcleo puede romperse produciendo dos o más fragmentos.

Formación de vesículas citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos. Las células apoptóticas muestran al principio una intensa vesiculación en la superficie, después sufren fragmentación en numerosos cuerpos apoptóticos rodeados por membrana y compuesto por citoplasma y organelos muy agrupados, con o sin un fragmento nuclear.

Fagocitosis de las células o cuerpos apoptóticos. Las células sanas adyacentes ya sean células parenquimatosas o macrófagos. Los cuerpos apoptóticos se degradan con rapidez dentro de los lisosomas y las células adyacentes migran o proliferan para reemplazar el espacio ocupado por la célula apoptótica suprimida.

Los lisosomas y por ende las enzimas lisosomales no son liberadas al tejido circundante por lo que no hay una inflamación asociada (Kerr *et al.*, 1994), a diferencia de la necrosis, otra forma de muerte celular, donde sí existe un daño en la membrana, provocando un vaciamiento del contenido celular y liberando, con ello, enzimas lisosomales que estimulan el proceso inflamatorio (Thompson, 1995). La necrosis, en contraparte, es una respuesta pasiva a una injuria en la que las células se deforman y mueren, provocando una reacción inflamatoria, a diferencia de la apoptosis, que involucra la activación de un programa genético durante el cual las células pierden viabilidad antes que ellas pierdan la integridad de la membrana.

Las proteasas son enzimas causantes de los cambios morfológicos y bioquímicos que reconocemos en la apoptosis, específicamente, la activación de una familia de proteasas de cisteína intracelulares, conocidas como caspasas las cuales degradan residuos del ácido

aspártico (Alnemri *et al.*, 1996). Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos, en todas las células animales pudiendo ser gatillada a asumir un estado activo (Reed, 2000).

2.3- Activación de caspasas

Existen dos vías de activación de las caspasas, una es la vía TNF (factor de necrosis tumoral), el cual usa la activación de las caspasas como un mecanismo de señalización, esto es cuando existe unión receptor ligando a la superficie celular para la inducción de apoptosis (Salvesen y Dixit, 1997) (Yuan, 1997). La otra vía implica la participación de la mitocondria, la cual libera proteínas activadoras de caspasas al citosol, gatillando así la apoptosis (Green y Reed, 1998) (Reed, 1997). Los receptores de muerte y la vía mitocondrial para la activación de las caspasas son a veces referidos como vías extrínsecas e intrínsecas, respectivamente (Reed, 2000).

El complejo rol de la mitocondria, en células apoptóticas mamíferas, es el centro de estudios bioquímicos de identificación de muchas proteínas mitocondriales las cuales activan directamente, los programas de apoptosis (Liu *et al.*, 1996; Susin *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2000). Normalmente, estas proteínas residen en el espacio intermembrana de la mitocondria y en respuesta a una variedad de estímulos apoptóticos, ellas son liberados al citosol, promoviendo la apoptosis, por la activación de caspasas y endonucleasas o por neutralización de inhibidores del citosol en este proceso (Wang, 2001).

2.3.1- Vía mitocondrial Intrínseca

La vía mitocondrial o intrínseca es gobernada por la familia Bcl-2 de proteínas (Reed, 2000) que juega un importante rol en la apoptosis, esta incluye a miembros pro apoptóticos y anti apoptóticos (homólogos de los genes de muerte celular en nematodos) Los miembros pro apoptóticos de Bcl-2 se componen por Bcl-2, Bcl Xl, Bcl-w, Bfl-1, Bra-1, A1, los miembros antiapoptóticos son Bax, Bak, Bcl-xs, Ba, bid, Bik, Hrk (White, 1996; Yang y Korsmeyer, 1996; Hockenbery, 1994).

Muchos miembros de la familia Bcl-2, tales como, Bcl-2, Bcl-xl y Bax son residentes proteicos de la membrana mitocondrial (Jacobson, 1997; Kroemer, 1997). En la mitocondria, ellos forman poros y actúan como canales iónicos (Hirsch *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), esto probablemente, es la clave de su función en la apoptosis que, casi infaliblemente, está acompañada por una disrupción del potencial transmembrana de la mitocondria y liberación de sustancias activadoras de caspasas, como el citocromo C y el factor activador de proteasas (Apaf-1) de la mitocondria (Yang *et al.*, 1997).

El citocromo C, es un componente de la cadena de electrones en la mitocondria y en el citosol, forma parte esencial del apoptosoma, el cual está compuesto por el citocromo C,

Apaf-1 y procaspasa-9 (Li *et al.*, 1997) El resultado es la activación de la caspasa-9, la cual activa a otras caspasas a ejecutar la muerte celular (Green y Reed, 1998). La inducción de la expresión de Bcl-2 y Bcl-xl, efectivamente detiene el flujo de estas moléculas al citosol, al permitir su unión con éstas (Kluck *et al.*, 1997; Manon *et al.*, 1997) Bcl-2 y Bcl-xl también frenan la inducción de apoptosis por la unión a Apaf-1, lo cual previene la activación de la caspasa 3 o caspasa ejecutora (Vaux, 1997 ; Zou *et al.*, 1997).

Todas las alteraciones producidas desde la mitocondria, la llevan a presentar cambios en la permeabilidad, tanto en la membrana interna, como externa. Bcl-2 suprime la apoptosis por acción directa en la mitocondria, impidiendo el aumento de permeabilidad; en efecto, la permeabilidad mitocondrial esta determinada por el cociente entre miembros de apoptóticos y anti apoptóticos de la familia Bcl-2 en la membrana (Yang y Korsmeyer, 1996).

2.3.2- Vía mitocondrial extrínseca

Por otra parte, la vía extrínseca, formada por TNF, es uno de los mecanismos mejor estudiados, muchos de estos receptores son conocidos por traducir señales apoptóticas, incluyendo FAS / APO-1/ CD95/ TNFR-1, DR3, DR4/ TRAIL-R1, estos receptores de muerte contienen un dominio citosólico conocido como dominio de muerte, que es responsable de movilizar proteínas adaptadoras tales como Fadd/ mort-1 al complejo receptor, después de la unión con un ligando.

La interacción receptor ligando estimula la formación de un complejo proteico en el dominio citosólico del receptor, en el cual la interacción proteína a proteína resultan en la activación de la caspasa 8 (Wyllie y Golstein, 2001), que activa a su vez a la caspasa 3. Esta, caspasa, al igual que en la vía intrínseca y junto a otras proteasas, serán las ejecutoras finales de la apoptosis, generando las características morfológicas, ya descritas.

2.4- Genes asociados a apoptosis

Estudios genéticos de muerte celular programada en nematodos, *Caenorhabditis elegans*, han identificado tres genes que participan en la apoptosis (Hengartner y Horvitz, 1994), de los cuales, CED 3 y CED 4 son reguladores positivos de la apoptosis y CED 9 es anti apoptótico (Horvitz, *et al.*, 1994).

Una razón por el interés que ha provocado la apoptosis en los últimos años, es el hecho de estar marcadamente influenciada por una variedad de genes, tanto positiva, como negativamente, muchos de los cuales presentan mutación y/o disfuncionalidad en su regulación (Mc Gill y Fisher, 1997).

Entre los genes más importantes se encuentran los miembros de la familia Bcl-2 y el gen supresor tumoral p53 (Reed *et al.*, 1996), señalados anteriormente.

El gen p53 actúa como supresor tumoral por medio de la inducción de la detención del crecimiento, senescencia o por apoptosis en respuesta a estrés celular incluyendo exposición a agentes que dañan el ADN, hipoxia, activación de oncogenes. Esta respuesta protege a la célula de una descontrolada proliferación y una transformación neoplásica (Burns y El-Deiry, 1999).

La pérdida de p53, se presenta en casi todos los tumores, donde se han observado mutaciones por sobre el 50 % (Hollstein *et al.*, 1991). Los pacientes que presentan mutación en p53, usualmente, tienen peor pronóstico en términos de respuesta a la terapia en una gran variedad de tumores (Brown y Wouters, 1999). Tumores con mutación en p53 pueden ser más anaplásicos, tener una mayor proporción de células en proliferación, pueden ser más metastásicos y, en general, son más agresivos fenotípicamente (Elledge, 1996).

Es aceptado, que la muerte celular después de un daño en el ADN por agentes anticancerígenos es a causa de apoptosis, y las células que evaden la apoptosis, serán resistentes a la muerte celular (Mc Gill y Fisher, 1997; Reed *et al.*, 1996; Rudin y Thompson, 1997; Weinberg, 1996).

El gen Bax es otro miembro pro apoptótico de la familia Bcl-2 de proteínas que reside en la membrana externa de la mitocondria. Bax promueve muerte celular, directamente, como proteína formadora de canales e, indirectamente, inhibiendo reguladores celulares de muerte celular (caspasas) (Jürgensmeier *et al.*, 1998).

Por todas estas razones, es importante el uso de nuevas terapias que induzcan muerte celular en forma independiente de p53, como por ejemplo, las vías del gen Bax.

2.5 Detección de apoptosis

2.5.1. Detección morfológica

Morfológicamente, las células apoptóticas, pueden ser observadas bajo microscopia electrónica, mostrando condensación de la cromatina nuclear, compactación de organelos citoplasmáticos y la aparición de protuberancias pedunculadas en la superficie celular (Wyllie *et al.*, 1987) (Kerr *et al.*, 1987).

En general, es difícil observar células en apoptosis “in situ” bajo microscopia de luz (Kerr *et al.*, 1987). La posibilidad de detectar células apoptóticas es mayor cuando el índice apoptótico es más alto (% de células apoptóticas por las células totales del tumor) (Soini *et al.*, 1998). Por esto, la medición cuantitativa del índice apoptótico, por medios morfológicos, puede ser difícil ya que la apariencia celular apoptótica se limita a unos pocos minutos y los cuerpos apoptóticos, en diversas formas, pueden ser vistos sólo unas pocas horas antes de ser fagocitados.

En la apoptosis la fragmentación del ADN esta directamente asociada con los cambios ultraestructurales en la morfología celular (Migheli *et al.*, 1995; Thiry, 1992). Así, mostrarán una fragmentación primaria del ADN en grandes fragmentos de 50-300 Kb, luego por acción de endonucleasas dependientes de Ca^{+2} y Mg^{+2} , ocurre una nueva fragmentación del ADN, correspondiendo a oligonucleosomas de 180 a 200 pares de bases, estos fragmentos pueden ser detectados mediante electroforesis en gel agarosa, mostrando una apariencia típica conocida como escalera de ADN (Arends *et al.*, 1990; Bursch *et al.*, 1990; Gavrieli *et al.*, 1992).

2.5.2. Detección mediante TUNEL

Recientemente se han desarrollado técnicas más refinadas para la detección de apoptosis en tejidos, basadas en cambios bioquímicos específicos de apoptosis (Gavrieli *et al.*, 1992; Wijsman *et al.*, 1993). Una de estas, es la técnica de TUNEL (terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling), donde los quiebres en las hebras de ADN son detectados por un marcaje enzimático en el extremo libre 3-OH con nucleótidos modificados, generados por la fragmentación del ADN localizada en el núcleo y cuerpos apoptóticos. Un núcleo normal o en proliferación tiene relativamente insignificantes números de extremos 3-OH de ADN, a diferencia de una célula apoptótica.

Para la detección de esos extremos libres 3-OH, se han elaborado diferentes kits que identifican hebras simples y dobles de ADN, en estados tempranos de apoptosis, cuando la condensación de la cromatina ha comenzado y los fragmentos de hebras son pocos, incluso antes que el núcleo experimente los principales cambios morfológicos (Attanasio y Schiffer, 1995 ; Chapman *et al.*, 1995).

2.6 Tumor Venéreo Transmisible T.V.T.

La oncología veterinaria ha presentado un gran desarrollo durante los últimos años, principalmente, en el campo de la medicina de pequeños animales, siendo su principal objetivo, el lograr la remisión de la masa tumoral y mejorar la calidad de vida del paciente. La remisión general puede ser lograda por medio de la aplicación, sola o combinada, de técnicas, tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia, entre otras.

Las neoplasias se originan por la proliferación de poblaciones de células transformadas, que no responden a los mecanismos fisiológicos de control de la proliferación celular, lo que las lleva a seguir las instrucciones de replicación interna (Taussing, 1989). El peligro mayor de las neoplasias, es la posibilidad de producir metástasis a otros tejidos, debido a que las células pueden emigrar del sitio donde se originaron, para formar masas tumorales en otras regiones del organismo (Fidler, 1990; Weinberg, 1996).

Una de las neoplasias caninas más frecuentes, es el Tumor Venéreo Transmisible (TVT) (Flores *et al.*, 1989), corresponde a un tumor contagioso y de transmisión sexual, que en forma natural afecta a caninos (Rogers, 1997). Se localiza en genitales externos de ambos sexos, aunque también se ha descrito en cavidad bucal y nasal, conjuntiva y piel (Cohen *et al.*, 1984; Pérez *et al.*, 1998). Fue descrito por primera vez por Novinsky en 1876, quien lo transplantó subcutáneamente de un perro a otro.

El TVT, a través del tiempo, ha recibido muchas denominaciones tales como: tumor venéreo infeccioso, linfosarcoma transplantable, linfosarcoma infeccioso, linfosarcoma transmisible, linfosarcoma contagioso, tumor de Sticker o tumor de células reticulares. En el año 1951, Bloom *et al.*, proponen el nombre de Tumor Venéreo Transmisible a modo de unificar los criterios, debido a que su histogénesis es desconocida y a la principal característica de transmitirse, de un perro a otro, a través de conductas relacionadas con el coito.

Al igual que otras neoplasias, el desarrollo de TVT puede ser considerado, como una alteración en los componentes básicos de la dinámica de poblaciones celulares, como son la proliferación, la diferenciación y muerte celular.

En la mayoría de los estudios de ocurrencia natural del TVT, no ha existido predisposición por sexo o raza (Rogers, 1997), siendo los perros vagabundos el reservorio de este problema (Feldman y Nelson 1987). La edad promedio de perros afectados es de cuatro a cinco años (Rogers, 1997).

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

2.6.1 Biología del T.V.T.

Su transmisión en forma natural es el resultado del transplante de células tumorales viables exfoliadas desde un perro portador e implantadas en un perro receptor; esto puede suceder durante el coito, el lamido o incluso el olfateo lo cual ayuda a explicar los casos de este tumor en cavidad nasal y oral (Rogers, 1997). La susceptibilidad esta dada, principalmente, por la presencia de abrasiones en las superficies de las mucosas expuestas (Brown *et al.*, 1980) a diferencia de la mayoría de las neoplasias, las cuales se producen por la transformación de las propias células del huésped (Taussing, 1989).

El TVT se observa, principalmente, en los genitales externos de perros de ambos sexos (Moulton, 1993). En el macho se ubica de preferencia en la mucosa peneana y zona parietal del prepucio y en escroto y en la hembra, en la mucosa vaginal, vulvar y vestíbulo

(Moulton, 1993; Idowu, 1975). También, se ha observado en piel, tejido subcutáneo, mucosa nasal y bucal, paladar blando y región anal, entre otras (Feldman y Nelson, 1987; Vermooten, 1987; Booth, 1994; Rogers, 1997).

El T.V.T consiste en nódulos únicos o múltiples, de superficie irregular, consistencia friable y forma semejante a una coliflor. Además de las formas nodulares, se han observado pedunculados, papilares o multilobulados (Feldman y Nelson, 1987; Lombardi, 1995).

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

El TVT puede presentar un comportamiento biológico variable, es así, que en TVT experimental presenta una fase de crecimiento tumoral progresiva y una fase regresiva (Hill *et al.*, 1984), esto ocurre como consecuencia de una respuesta inmune adecuada, especialmente si los perros poseen buenas condiciones de salud (Vermooten, 1987). Trail y Yang, en 1985, describieron que en muchos perros inoculados con células de TVT, el tumor permanece en fase estática por un tiempo variable, durante la cual el volumen de la masa tumoral es relativamente constante. Sin embargo, ellos sugieren que el tumor no pasaría por un período de estabilidad, del punto de vista cinético, sino, que los mecanismos de progresión y regresión tumoral van ocurriendo en forma simultánea y permanecerían en un equilibrio dinámico.

Para que la defensa inmunológica se active contra las neoplasias, es esencial que las células tumorales presenten antígenos específicos, que permitan diferenciarlas de las células del huésped (González, 1994).

Beschorner *et al.*, en 1979, encontraron que el TVT es altamente antigénico y la respuesta inmune podría ser una de las causas que facilitan la regresión tumoral (Vermooten, 1987; Rogers, 1997). Se ha descrito una respuesta inmune humoral en contra del TVT ya que se ha detectado anticuerpos específicos, IgG en el suero de la mayoría de los animales afectados, independiente de la etapa de la enfermedad que curse. Algunos estudios sugieren, que los anticuerpos anti-TVT actuarían, directamente, contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) (Rogers, 1997).

2.6.2. Origen y etiología.

En cuanto a la etiología y el origen de las células del TVT, se han postulado dos teorías: la de origen viral y la del trasplante de células. Así, trabajos con microscopía electrónica en cultivos celulares del tumor, describen la presencia de partículas virales icosaédricas y del tipo C (Sapp y Adams., 1970). Sin embargo no se ha podido reproducir un extracto tumoral libre de células a ejemplares caninos susceptibles (Hill *et al.*, 1984; Amber *et al.*, 1985).

La teoría de implantación de células tumorales, está sustentada por Kudo *et al.*, (1974), quienes demostraron que células neoplásicas marcadas con timidina tritiada e inyectadas por vía subcutánea, crecen por multiplicación estricta de ellas sin participación de células del huésped (Pérez *et al.*, 1978), de esta forma, ellos discrepan de la teoría viral ya que el ADN del hospedador no fue marcado con timidina tritiada lo que era esperable, en el caso de participación viral.

Por otro lado, estudios cariogenéticos demostraron que el canino posee un número diploide de cromosomas. Las células de TVT siempre presentan 59 ± 5 cromosomas y cantidades similares de ADN (Feldman y Nelson, 1987), considerando que el número normal de cromosomas en el perro es 78 (Rogers, 1997). Esto, junto con el resultado de estudios de antígenos de histocompatibilidad de superficie, conducen a postular que el origen del TVT a nivel mundial sea el mismo (Booth, 1994).

2.6.3. Signos clínicos:

Se pueden observar, descargas genitales persistentes o intermitentes de tipo sanguinolenta y/o hemorrágica, con masas o malformaciones que incrementan el tamaño del genital, además de mal olor (Rogers, 1997). En los estados avanzados de la enfermedad, se pueden presentar ulceraciones, necrosis y posterior infección bacteriana (Booth, 1994; Rogers, 1997).

Aunque es un tumor que afecta principalmente genitales externos también, se han encontrado lesiones en otros sitios, como por ejemplo: cavidad nasal, oral y ocular, recto y también se puede desarrollar en heridas cutáneas. Si es así, los signos pueden incluir descargas nasales, estornudos, linfadenopatía regional, inflamación cutánea o subcutánea, dificultad para comer o deformación facial (Rogers, 1987).

2.6.4. Diagnóstico:

El diagnóstico está basado en la historia clínica del paciente, examen físico, el signo más frecuente es el goteo de sangre desde el pene o la vulva y la protrusión del tumor

(Feldman y Nelson, 1987). Aunque, la típica localización del tumor es una ayuda para la interpretación, se debe realizar un diagnóstico diferencial de otras neoplasias de células redondas como linfomas, histiocitomas, melanomas, carcinomas de células escamosas, mastocitoma (Mozos *et al.*, 1996), y lesiones granulomatosas no neoplásicas ya que estas patologías también se caracterizan por presentar células redondas (Booth, 1994).

El examen citológico del TVT, muestra generalmente una gran cantidad de células, las cuales son redondas a ovals poseen abundante citoplasma y bordes poco definidos, moderadamente basófilo y a menudo, contiene vacuolas claras (Maxey, 1996; Yang 1987) el núcleo es de tamaño variable, e hipercromático y de ubicación excéntrica (Yang, 1987 ; Willard *et al.*, 1994), presentando una relación núcleo citoplasma 1:2, posee un nucléolo prominente y la cromatina es granular.

La muestra citológica también puede contener diferentes tipos de células leucocitarias, células plasmáticas, macrófagos e incluso bacterias (Maxey, 1996). Las células del TVT, generalmente, tienen un citoplasma más abundante que la mayoría de las células de neoplasias linfoides y además, la forma de la célula y su núcleo es más redonda que las células del histiocitoma (Maxey, 1996).

Histológicamente, las células de TVT tienen una forma oval, o poliédrica disponiéndose en masas compactas interconectadas a través de finos vasos sanguíneos, lo cual permite a las células ordenarse en racimos o cordones (Rogers, 1997).

Se han realizados otros métodos diagnósticos en estudios de TVT, que no son frecuentemente utilizados, como;

- i) microscopia electrónica de transmisión
- ii) ensayos inmunohistoquímicos específicos, evaluaciones citogenéticas y estudios experimentales de transmisión celular (Yang y Jones, 1973; Sandusky *et al.*, 1987; Rogers, 1987).

2.6.5. Tratamiento:

El tratamiento en esta neoplasia es indicado ya que es poco probable que ocurra una regresión espontánea (Rogers, 1997). Sin embargo, a pesar de su potencial naturaleza maligna, el TVT responde a varias modalidades de tratamiento

El tratamiento más efectivo, para este tumor ha sido la quimioterapia, para lo cual se han utilizado distintos agentes quimioterápicos y protocolos (Rogers, 1997). De todos ellos, la vincristina ha dado excelentes resultados, usándola sólo o en combinación con Ciclofosfamida y Metotrexato. El uso de Vincristina como único agente, es de bajo costo,

tiene pocos efectos colaterales y logra un 100% de remisión después de un promedio de tres a seis sesiones de quimioterapia, con sólo un 10% de recurrencia después de un año (Booth, 1994), la dosis de administración varía entre 0,5 a 0,7 mg/m² (Rogers, 1997). En otros trabajos, se ha determinado una dosis de 0.03mg/kg , efectivo para su tratamiento (Flores, *et al.*, 2000).

Vincristina es un alcaloide derivado de la Vinca, que inhibe la etapa de metafase de la mitosis. Su administración debe ser estrictamente endovenosa debido a que causa irritación y necrosis perivascular. Debe ser diluida y administrarse lentamente, ya que pacientes humanos sienten una sensación de quemadura cuando es aplicada en bolo. Clínicamente puede aparecer alopecia, estomatitis, constipación y neuropatía periférica, sintomatología no es observada con frecuencia en perros, solo se ha descrito una leve anorexia en algunos casos. (Booth, 1994).

La radioterapia, también ha sido utilizada con éxito en esta, neoplasia Feldman y Nelson en 1987, informaron que de 18 perros tratados con este método obtuvo una remisión total en el 100% de los animales, la mayoría de ellos con la primera dosis de radioterapia. Otros autores, también han reportado el éxito de la radioterapia con un 100% de remisión en este tumor (Vermooten, 1987).

A pesar de la eficiencia de este tipo de tratamiento su uso se ve limitado debido a que se debe contar con personal adiestrado y con un equipamiento adecuado (Booth, 1994).

En cuanto a los resultados obtenidos con cirugía, el éxito ha sido variable ya que los casos de recidiva son comunes (Vermooten, 1987). Entre un 17% a 58% de los casos, la cirugía por sí sola, a pesar de ofrecer garantías para la extirpación de la neoplasia de localización nasal, no asegura la total eliminación de núcleos tumorales como fosas nasales. El empleo de un quimioterápico posterior a la cirugía, tiene por objeto evitar recidivas debido a pequeños focos neoplásicos de difícil eliminación (Pérez, *et al* 1978). En presencia de metástasis la cirugía constituye una alternativa poco aceptable para el tratamiento (Rogers, 1997).

La propagación de esta enfermedad en la población canina puede ser controlada reduciendo el número de perros vagos, ya que el contacto sexual, es el principal método de transmisión, la esterilización, tanto de las mascotas, como de los perros afectados limitaría su propagación.

3. HIPÓTESIS

Existe un aumento en la apoptosis de células tumorales en el TVT como resultado de la regresión inducida por el tratamiento con Vincristina y de la respuesta inmune antitumoral.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Estudiar el rol de la apoptosis en la regresión del crecimiento tumoral.

4.2. Objetivos Específicos:

- Identificar apoptosis a través de la detección de fragmentación de DNA.
- Cuantificar y diferenciar células en proceso de apoptosis en fases de progresión y regresión de crecimiento tumoral.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. MATERIALES

- **Animales**

Se obtuvieron muestras de tumores venéreos transmisibles de ubicación genital de 10 caninos adultos de entre 1 a 10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, que presentaron una masa tumoral detectada clínicamente en el Servicio de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Tabla 1).

Los casos fueron confirmados, seleccionándose aquellos en fase progresiva de crecimiento tumoral mediante estudio citológico e histopatológico de acuerdo a criterios previamente descritos (González *et al.*, 2000), en el Servicio de Anatomía Patológica de la misma Facultad.

TABLA 1. Datos clínicos de los pacientes en estudio.

<i>Nº DEL CASO</i>	<i>SEXO</i>	<i>EDAD</i>	<i>RAZA</i>	<i>CURSO DE LA ENFERMEDAD</i>	<i>UBICACION</i>
<i>Caso 1</i>	<i>H</i>	<i>+ de 2ª</i>	<i>Mestizo</i>	<i>+/- 3m</i>	<i>Vulva</i>
<i>Caso 2</i>	<i>H</i>	<i>1 a 2m</i>	<i>Mestizo</i>	<i>+/- 20 dias</i>	<i>Vulva</i>
<i>Caso 3</i>	<i>M</i>	<i>3 A</i>	<i>Mestizo</i>	<i>+/-1 m</i>	<i>Pene</i>

Caso 4	H	6 A	Mestizo	+/- 2 m	Vulva y Vagina
Caso 5	H	2 A	Mestizo	+/- 1 m	Vagina
Caso 6	M	1 a 3 m	Mestizo	+/- 5 m	Pene y Prepucio
Caso 7	H	10 A	Cocker	+/- 3 m	Vagina
Caso 8	M	8 A	Mestizo	+/- 6 m	Prepucio y Pene
Caso 9	M	6 A	Siberiano	+/- 4 m	Pene y Prepucio
Caso 10	H	5 A	Mestizo	5 dias	Vaginal y Vulvar

- **Tratamiento**

Los pacientes fueron sometidos a quimioterapia con Sulfato de Vincristina (Vincristina Sulfato® Pharmachemie B.D.Holland), en dosis única de 0.03mg/Kg diluida en agua bidestilada, administrada vía endovenosa para obtener la remisión tumoral (Lombardi, 1995).

- **Inmunohistoquímica**

Para este estudio se utilizó un Kit específico para la detección de apoptosis; “ApopTag® Plus Peroxidase *in situ* apoptosis detection Kit”, que se caracteriza por detectar células apoptóticas por marcaje específico de ADN fragmentado, producido en los procesos apoptóticos.

Los componentes que provee el kit ApopTag®, han sido diseñados para marcar los extremos libres 3-OH del ADN, con nucleótidos marcados. Estos nucleótidos son adheridos al ADN por medio de una enzima denominada, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Schmitz *et al.*, 1991; Gavrieli *et al.*, 1992), TdT cataliza, independiente de la temperatura la adición de un nucleótido trifosfato al extremo 3-OH de una hebra doble o simple de ADN. La incorporación de nucleótidos forma un oligómero compuesto de nucleótidos marcados con digoxigenina y nucleótidos no marcados, en una secuencia al azar. La relación de nucleótidos marcados con no marcados en ApopTag® es optimizada para promover la posterior unión al anticuerpo anti-digoxigenina.

El anticuerpo anti-digoxigenina usado en este kit, es un anticuerpo policlonal de oveja purificado, este anticuerpo exhibe menos del 1% de reactividad cruzada. La porción Fc del

anticuerpo ha sido removida por medio de digestión proteolítica para eliminar cualquier unión no específica de los receptores celulares Fc.

Los fragmentos de ADN, los cuales han sido marcados con el nucleótido-digoxigenina, son expuestos a la unión del anticuerpo anti-digoxigenina, que esta conjugado con peroxidasa. La unión de peroxidasa-anticuerpo conjugado enzimáticamente, genera una reacción permanente, intensa y localizada proveniente de sustratos cromogénicos, entregando una sensible detección de color marrón (Gavrieli *et al.*, 1992; Thiry *et al.*, 1992; Gorczyca *et al.*, 1993; Wijsman *et al.*, 1993).

5.2. MÉTODOS

Obtención de muestra

Se obtuvieron, de todos los pacientes, biopsias (que se fijaron en formalina y se procesaron para el estudio histológico descriptivo y morfométrico) y frotis celulares de T.V.T progresivo y regresivo.

a. Diagnóstico citológico

El diagnóstico de T.V.T se confirmó mediante, mediante impronta o raspado de la masa tumoral. Estas fueron fijadas en metanol, teñidas con colorante Giemsa durante 10 minutos, lavadas con agua destilada y secadas al medio ambiente.

b. Biopsias Tumorales

Las biopsias se fijaron en formalina al 10% por 24 horas a temperatura ambiente y se procesaron de acuerdo a las técnicas convencionales para tejidos incluidos en parafina (López *et al.*, 1985).

De cada muestra, se obtuvieron tres cortes de 5µm de grosor en un micrótopo de rotación, luego se realizaron las siguientes técnicas Hematoxilina-Eosina (López *et al.*, 1985) e inmunohistoquímica, a través del Kit ApopTag[®]

6. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Este estudio consideró un análisis cuantitativo de los cambios regresivos en células neoplásicas a nivel histológico, para esto se cuantificó el área de células de TVT que representaban a la población apoptótica inmunomarcada, en ambas fases de crecimiento tumoral, para cumplir este objetivo, se digitalizaron las imágenes de 5 campos de 200X por muestra, con una resolución de 512 X 480 pixeles, mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico científico (Nikon, Eclipse E-600) y conectada a una computadora con un software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

Además, se realizó un recuento celular para determinar la distribución de células tumorales en apoptosis a nivel histológico, para lo cual se consideró un total de 300 células tumorales por preparación.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos en la fase progresiva del tumor fueron comparados con los de la fase regresiva mediante el empleo de la prueba de t para muestras asociadas, para las variables de áreas de apoptosis (inmunomarcadas) y distribución celular.

7. RESULTADOS

7.1. Estudio histopatológico de TVT en fase progresiva y regresiva

En los cortes procesados, según el protocolo del Kit Apoptag[®] se pudo apreciar, que tanto en la fase de crecimiento tumoral progresiva, previa al tratamiento, como en la fase regresiva posterior al tratamiento, existía inmunoreactividad positiva a fragmentación de ADN, que se visualizó como la aparición de tinción de color marrón en núcleo y/o citoplasma (ver Fig. 1a y 2a), en aquellas células que se encontraban en apoptosis. El resto de las células que no presentó inmunomarcación, mostró reacción sólo de sus núcleos con la tinción de contraste que correspondía a Hematoxilina, presentando un color azul oscuro, característica de esta técnica (ver Fig. 1a y 2a).

La morfología nuclear y citoplasmática de las células, en el tejido tumoral, fue observada a diferentes magnificaciones (200X a 1000X). En células en estados tempranos de apoptosis, se observó marginación de la cromatina nuclear. En estados más avanzados se apreció condensación del núcleo junto a encogimiento citoplasmático, indicado por un claro espacio que rodea a la célula. Finalmente, se observó la presencia de cuerpos apoptóticos, en el espacio extracelular o dentro de células fagocíticas. La mayor parte de estos hallazgos morfológicos coincidió con inmunoreactividad positiva, observándose en forma muy ocasional, algunos cuerpos apoptóticos sin inmunotinción. Por otro lado, es interesante destacar que se observó gran cantidad de núcleos inmunoteñidos, sin evidencias de alteraciones morfológicas.

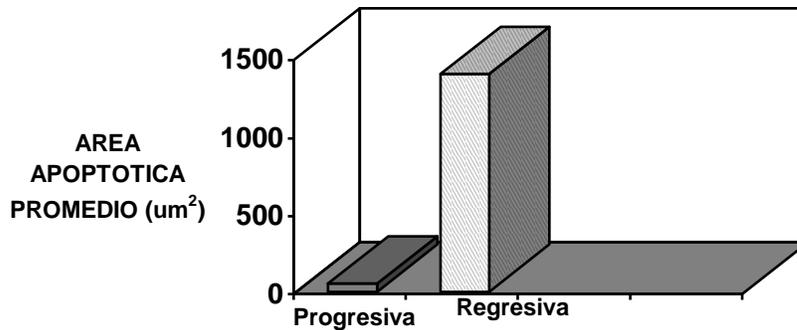
7.2. Recuento Celular

Con ayuda de la inmunomarcación se realizó un recuento del área correspondiente a la población celular en apoptosis. Para cumplir este objetivo se digitalizaron las imágenes de 5 campos de 200X por muestra, obteniendo un valor promedio para el área inmunomarcada, previa marcación morfométrica (ver Fig. 1b y 2b).

En general, en la fase de crecimiento progresivo (Fig. 1b), se observó una inmunomarcación para apoptosis, más bien ocasional, de células aisladas, contrastando con la intensa inmunotinción en fase regresiva, involucrando muchas células que no presentaban aún cambios morfológicos asociados a apoptosis (Fig 2b). El Gráfico 1,

muestra el área promedio correspondiente a la fracción de células apoptóticas, ésta fue de $51.3 \pm 37.9 \mu\text{m}^2$ y $1396 \pm 828.6 \mu\text{m}^2$, por campo de 200X, para fase progresiva y regresiva respectivamente, indicando que estadísticamente existe una diferencia significativa entre ambas fases ($p < 0.0001$).

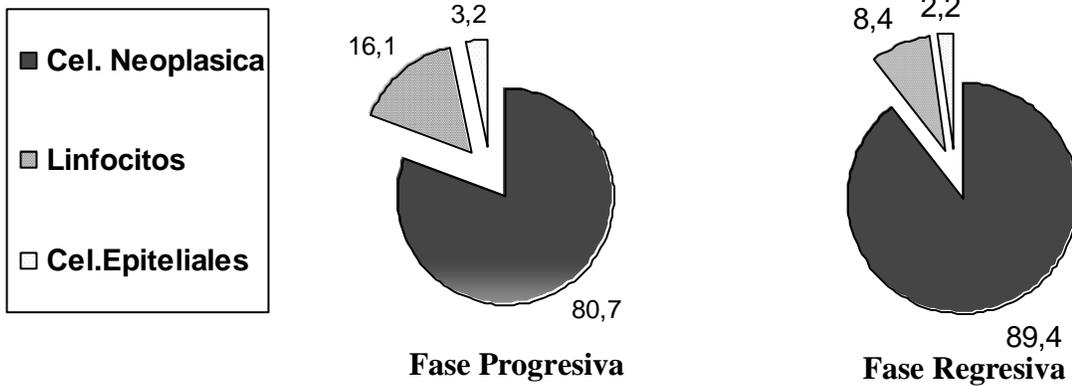
GRÁFICO 1.
Células apoptóticas en T.V.T. Progresivo y Regresivo.



7.3. Distribución de Celular

En el Gráfico 2, se muestra la distribución porcentual, del recuento diferencial de células en apoptosis, según tipo celular, dentro de la población apoptótica. El tipo celular principal, dentro de la población apoptótica, en ambas fases del T.V.T., correspondió a células tumorales con un 80,7% para fase progresiva y 89,4% para fase regresiva. Mientras, que los linfocitos representaron un 16,1% y 8,4%, en las fase progresiva y regresiva, respectivamente, las células epiteliales correspondieron sólo un 3,2% en fase progresiva y 2,2% en fase regresiva.

GRÁFICO 2.
Distribución de células apoptóticas según tipo celular fase de crecimiento celular



Dentro de la población apoptótica, las células de T.V.T. mostraron un aumento significativo en fase regresiva ($p < 0.001$). En cambio en el caso de los linfocitos, estos disminuyeron en forma significativa en regresión ($p < 0.001$). En el caso de las células epiteliales la disminución registrada en fase regresiva no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). (Tabla 2)

TABLA 2. Distribución Porcentual (%) de tipos celulares apoptóticos en TVT en fase progresiva de crecimiento y en regresión.

Fase tumoral	%Progresiva	%Regresiva
N=	10	10
Células T.V.T.	80.7^{a*}	89.4^b
Linfocitos	16.1^a	8.4^b
Células epiteliales	3.2^a	2.2^a

Los datos corresponden a los promedios obtenidos en recuentos de 300 células.

***= letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes.**

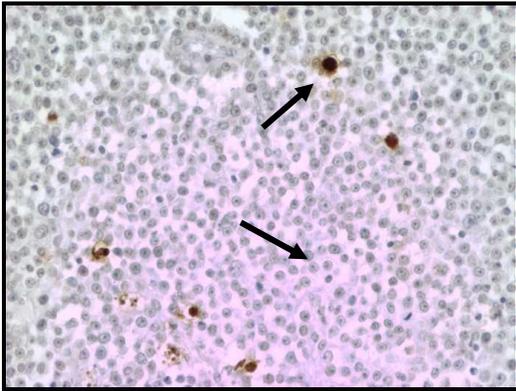


Figura 1a.TVT en fase progresiva de crecimiento tumoral. Inmunotinción para apoptosis con Apoptag[®].200X

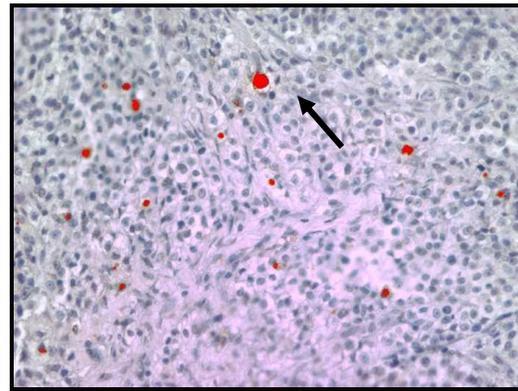


Figura 1b.TVT en fase progresiva de crecimiento tumoral. Inmunotinción para apoptosis con Apoptag[®].200X.Marcación morfométrica del área inmunoteñida

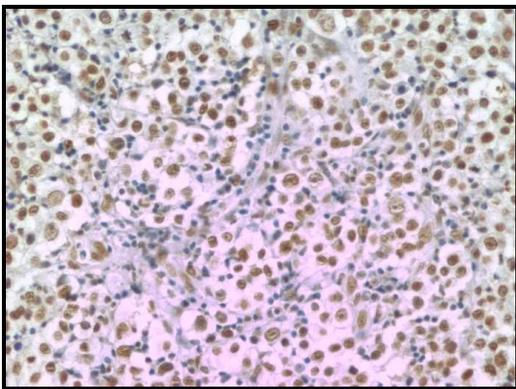


Figura 2a.TVT en fase regresiva inducida por tratamiento con Vincristina. Inmunotinción para apoptosis con kit Apoptag[®].200X

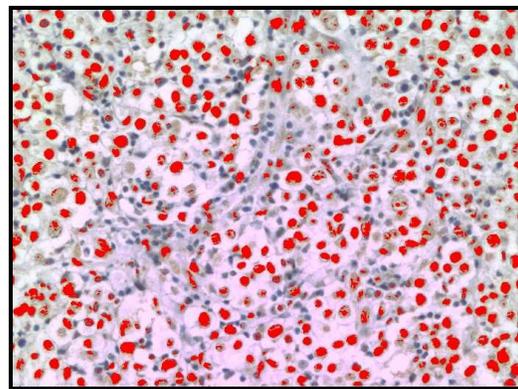


Figura 2b.TVT en fase regresiva inducida por Vincristina. Inmunotinción para apoptosis con kit Apoptag[®].200X.Marcación morfométrica del área inmunoteñida

8. DISCUSIÓN

8.1. Cambios morfológicos

En este estudio, se observó como cambios morfológicos apoptóticos tempranos, la marginación de la cromatina nuclear. Como cambios intermedios apareció condensación del núcleo junto a encogimiento citoplasmático, indicado por un espacio claro que rodea a la célula. Como estados más avanzados aparecieron los cuerpos apoptóticos que se encontraron en el espacio extracelular o dentro de células fagocíticas. Estos cambios morfológicos concuerdan con lo descrito por otros autores para apoptosis (Kerr y Harmon, 1991; Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Además, estos cambios coincidieron con inmunoreactividad positiva para la técnica Apoptag[®].

8.2. Inmunomarcación

La inmunomarcación de apoptosis mediante la técnica Apoptag[®], generó una excelente señal, visualizada como un área de tinción color marrón intenso, detectando signos de fragmentación de ADN, no sólo a nivel de cuerpos apoptóticos, sino que también, en núcleos aparentemente intactos. Este tipo de evidencia temprana de apoptosis no podría haber sido detectada por métodos morfológicos convencionales. Esto permitió demostrar un claro y significativo aumento, del proceso apoptótico relacionado con la regresión inducida por Vincristina. La detección *in situ* de los quiebres de las hebras de ADN, por la técnica TUNEL, hace que las células apoptóticas sean fácilmente detectables mediante microscopía de luz, permitiendo un estudio mucho más exacto y específico del proceso de apoptosis, comparado con el examen de tejidos sometidos a tinciones corrientes (Gavrieli *et al.*, 1992; Gorczyca *et al.*, 1993).

Apoptag[®] distingue apoptosis de necrosis por una detección específica de fragmentos de ADN y condensación de la cromatina asociados con apoptosis (Gold, 1994). En algunos casos, aunque morfológicamente es posible distinguir estructuras celulares como cuerpos apoptóticos, estos pueden que no presenten inmunomarcación, debido a que algunos no contienen material nuclear (Perry, *et al.*, 1997). Sin embargo, esta subestimación es pequeña y no parece ser importante, de acuerdo a los resultados obtenidos

en este estudio, donde se observó sólo en forma ocasional la presencia de cuerpos apoptóticos negativos a la inmunotinción. De todos modos, es importante evaluar las tinciones en conjunto con criterios morfológicos, para considerar este tipo de situaciones.

8.3 Células apoptóticas en T.V.T.

Durante la regresión del T.V.T., no sólo aumento el número total de células afectadas por el proceso apoptótico, sino también el predominio de las células tumorales dentro de la población apoptótica. Esto es concordante con lo descrito por Hill *et al.*, en 1984, Lombardi (1995) y González *et al.*, (2000) quienes encontraron una disminución significativa del número y proporción de células tumorales en T.V.T. en la fase regresiva inducida por Vincristina. Por otro lado, Oltra (1999) y González *et al.*, (2002) describieron un aumento relativo de la población linfocitaria en esta fase tumoral, inducida por el mismo tratamiento, lo que concuerda con la disminución de la proporción de linfocitos dentro de la población apoptótica, observada en este estudio.

Se ha visto, que el T.V.T. en fase de crecimiento progresivo presenta mayor índice apoptótico que otras neoplasias del canino (Guvenc *et al.*, 2002). En este estudio, el marcado aumento de apoptosis observado en relación a la regresión tumoral inducida por Vincristina, es concordante con la dramática y exitosa desaparición de la masa tumoral observada a nivel clínico con este tratamiento. Se destaca una diferencia notoria con otros tipos de neoplasia que, en general, presentan una respuesta parcial frente al tratamiento con quimioterapia. Esto sugiere que en T.V.T., probablemente, no se encuentren afectados los genes involucrados en la inducción de apoptosis, lo cual difiere de otras neoplasias donde, generalmente, se encuentran afectados miembros de la familia Bcl-2 y el gen supresor tumoral p53 (Hollstein *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1996). Sin embargo, recientemente se ha informado de una mutación puntual del nucleótido 964 (T-C), en TVT, resultando en el cambio de aminoácidos (Phe-Ser) de la proteína supresora tumoral p53 (Choi y Kim, 2002). Esto difiere de las observaciones clínicas que indican que los pacientes que presentan mutación en p53, usualmente, tienen peor pronóstico en términos de respuesta a la terapia en una gran variedad de tumores (Brown y Wouters, 1999). Tumores con mutación en p53 pueden ser más anaplásicos, tener una mayor proporción de células en proliferación, ser más metastáticos y, en general, son más agresivos fenotípicamente (Elledge, 1996).

Este estudio indica, que durante la fase regresiva del T.V.T., inducida por vincristina, las células tumorales entrarían en apoptosis, llevando al colapso de la masa tumoral, quedando sólo una matriz fibrosa (González *et al.*, 2000). Algunos estudios han sugerido, que al menos algunas células del T.V.T. presentarían una suerte de transformación fibroblástica en la fase regresiva del T.V.T. Sin embargo ninguna célula de morfología fibroblástica tanto de fase progresiva como regresiva reaccionó con una sonda

genética específica para células de T.V.T., como lo muestran estudios recientes (Liao *et al.*, 2003), realizados por quienes usaron la técnica de PCR *in situ* para marcar células de T.V.T. a través de la detección del elemento nuclear denominado LINE (*A long interspersed nuclear element*) que se inserta constante y exclusivamente en el terminal 5' del gen c-myc de las células de T.V.T., por fuera del primer exon. Como el largo total del gen LINE insertado no es constante, se han usado *primers* para cubrir sólo un segmento estable de 0.55kb.

El mecanismo por el cual la vincristina induciría apoptosis en T.V.T. permanece aún por aclarar, sin embargo, se sabe que agentes anti microtúbulos como la vincristina, inducen apoptosis (Wang *et al.*, 1999). Así, existen estudios en leucemia aguda infantil, que han demostrado activación de caspasas 9 y 3 tras una sola dosis de vincristina (Groninger *et al.*, 2002), sugiriendo que este tratamiento induce apoptosis por la vía mitocondrial, involucrando mecanismos asociados a la generación de radicales derivados del oxígeno y sobre expresión de gen Bcl-2. Otros estudios, también han demostrado apoptosis inducida por vincristina en cáncer mamario (Aoudjit y Vuori, 2001), osteosarcoma (Seki *et al.*, 2000) y otros tumores humanos o líneas de células tumorales (Belhoussine *et al.*, 1999).

9. CONCLUSIONES

- Dentro de la población apoptótica, tanto en fase progresiva, como regresiva existe un predominio de células tumorales apoptóticas por sobre las otras poblaciones celulares.
- La Vincristina produce un aumento significativo ($p \leq 0.0001$) de las células apoptóticas en el T.V.T. regresivo, con una disminución de las células tumorales.
- En fase regresiva existe un aumento de linfocitos, debido a la respuesta inmune antitumoral, observándose además una disminución significativa ($p \leq 0.0001$) de linfocitos en apoptosis durante esta fase.
- El kit Apoptag® es un método objetivo y específico que permite detección temprana de apoptosis en células que aun no manifiestan cambios morfológicos con formación de cuerpos apoptóticos.

10. BIBLIOGRAFÍA

ALNEMRI, E.S.; LIVINGSTON, D.J.; NICHOLSON, D.W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N.A.; WONG, W.W.; YUAN, J. 1996 Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87:171-176.

AMBER, E.I.; HENDERSON, R. 1982. Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesion in Zaria-Nigeria. *Journal of American Animal Hospital Association*, 18: 350 – 352.

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

AOUDJIT, F.; VUORI K. 2001. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 16; 20(36):4995-5004.

ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. 1990. Apoptosis: the role of endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136:593-608.

ATTANASIO, A.; SHIFFER, D. 1995. Ultrastructural detection of DNA strands breaks by in situ end- labeling techniques. *Journal of Pathology*, 176:27-35.

BELHOSSINE, R.; MORJANI, H.; GILLET, R.; PALISSOT, V.; MANFAIT M. 1999. Two distinct modes of oncoprotein expression during apoptosis resistance in vincristine and daunorubicin multidrug-resistant HL60 cells. [*Advances in Experimental Medicine and Biology*](#) 457:365-381

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:(10) 3920-3927.

BLOOM, F.; PAFF, G.; NOBACK C. 1951. The transmissible venereal tumor of the dog. *American Journal of Pathology*, 27 (1): 119 – 139.

BOOTH, M. J. 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadeno-carcinoma in a bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 35: 39 – 42.

BROWN, N.O.; CALVERT, C.; MACEWEN, E.G. 1980. Chemoterapeutic management of transmissible venereal tumor in 30 dogs. *Journal of The American Veterinary and Medical Assosiation*, 176: 983-986.

- BROWN, J.M.; WOUTERS, B.G. 1999.** Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Research*, 59: 1391-1399.
- BURNS, T.; EL-DEIRY, W. 1999** The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular Physiology*, 181: 231-239.
- BURSCH, W.; KLEINE, L.; TENNISWOOD, M. 1990.** Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, 11:847-853.
- CHAPMAN, R.S.; CHERSTA, C.M.; HERBERG, A.A.; BEERE, H.M.; WHETTON, A.D.; HICKMAN, J.A.; DIVE, C. 1995.** Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. *Cytometry*, 20: 245-256.
- CHOI, Y.K.; KIM, C.J. 2002.** Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. [*Journal of Veterinary Science*](#) 3(4): 285-292.
- COHEN, D.; SHALEV A.; KRUP, M. (1984).** Lack of β - 2-microglobulin on the surface of canine TVT cells. *Journal of National Cancer Institute*, 72(2):395-401
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. 2000** Patología estructural y funcional.. 6^o Edición Mc Graw Hill-Interamericana, Págs. 19-27.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, F. 1997.** Cytometry in cell microbiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27: 1-20.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L., AND WANG, X. 2000.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cel*, 102: 33-42.
- ELLEDEGE, R. M. 1996.** Assessing p53 status in breast cancer prognosis: where should you put the thermometer if you think your p53 sick?. *Journal of National Cancer Institute*, 88:141-143.
- FELDMAN, E.; NELSON R. 1987.** Endocrinología y reproducción canina y felina. 2^a ed. Filadelfia, Editorial WV, Saunders Filadelfia USA.. 7: 531 – 532.
- FIDLER, 1990;** Host and tumor factors in cancer metastasis [*European Journal of Clinical Investigation*](#), .20: 481-486.
- 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.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. 1992.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119:493-501.

- GOLD, R. 1994.** Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques *Laboratory Investigation*, 71: 219-225.
- GONZALEZ, C. (1994).** Biología de las neoplasias, en compendio del Curso Internacional de Oncología Veterinaria. Villouta y Gonzále. *Universidad de Chile*, Pág. 8–17.
- GONZALEZ, C.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B.R. 2000.** Canine transmissible venereal tumor: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumors in growth phase and during regression after chemotherapy. *Journal of Pathology*. 122 (4): 241-248.
- GONZALEZ, 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. *Avances en Ciencias Veterinarias* 17:18-23.
- GORCZYCA, W.; BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, R.J.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. 1992.** DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International Journal of Oncology*, 1: 639-648.
- GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. 1993.** Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research*, 53: 1-7.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. 1998.** Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281:1309-1310.
- GRONINGER, E.; MEEUWSEN-DEBOER, G.J.; DE GRAAF, S.S.; KAMPS, WA.; DE BONT, E.S. 2002.** Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *International Journal of Oncology*, 21(6):1339-45.
- GUVENC, T.; HALIGUR, M.; ORMAN, M.N.; HAZIROGLU, R. 2002.** Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(3):315-21.
- HENGARTNER, M.O.; HORVITZ, H.R. 1994.** Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4:581-586.
- HILL, D.; YANG, T.; WATCHEL, A. 1984.** Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. *Veterinary Pathology*, 21: 39-45.
- HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; SUSIN, S.A.; DALLAPORTA, B.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. 1997.** The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15:1573-1581.

- HOCKENBERY, D.M. 1994.** Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 18(Suppl):51-55.
- HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOLGESTEIN, B.; HARRIS, C.C. 1991.** p53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49-53.
- HORVITZ, H.R.; SHAHAM, S.; HENGARTNER, M.O. 1994.** The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. [*Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*](#), 59:377-385.
- HOU, Q.; CYMBALYUK, E.; HSU, S.C.; XU, M.; HSU, Y.T. 2003.** Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: Roles in cytochrome c release and Bax regulation. *Apoptosis*, 8(6):617-29.
- IDOWU, A.L. 1975.** The Chromosomes of an extragenitally located transmissible venereal tumor in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, 25:193-198.
- JACOBSON, M.D. 1997.** Apoptosis: Bcl-2 related proteins get connected. [*Current Biology*](#), 7:R277-R281.
- JÜRGENSMEIER, J.; XIE, Z.; DEVERAUX, Q.; ELLERBY, L.; BREDESEN, D.; REED, J. 1998.** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Cell Biology*, 95: 4997-5002.
- KERR, J.F.R.; HARMON, B.V. 1991.** Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. Apoptosis: molecular basis of cell death, chapt. 1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 5-29.
- KERR, J.; WINTERFOR, C.; HARMON, B. 1994.** Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026.
- KERR, J.H.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. [*British Journal of Cancer*](#); 26:239.
- KERR, J.F.R.; SEARLE, B.; HARMON, V.; BISHOP, J. 1987.** Apoptosis. In Perspectives on mammalian cell death. C.S. Potten, editor. *Oxford University Press*. Oxford 93-128.
- KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMYER, D.D. 1997.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275:1132-1136.
- KORSMEYER, S.; ZINKEL, S. 2001.** Molecular biology of cancer: apoptosis. *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 6^o Ed; 7: 111.
- KROEMER, G. 1997.** The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulating apoptosis. [*Nature Medicine*](#), 3:614-620.

KUDO, T.; KAIKE, T.; OTOMO, K.; SAKAI, T.1974. Transplantation of canine transmissible venereal sarcoma. Autoradiographic study with ³H Thymidine. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 22: 4-7.

LI, W.; JAMES, W. M.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWCZ, Z.; 1995. Application of biotin, digoxigenin or fluorescein conjugated deoxynucleotides to label DNA strands breaks for analysis of cell proliferation and apoptosis using flow cytometry. *Biotechnic & Histochemistry*, 70:234-242.

LI P, NIJHAWAN D, BUDIHardjo I, SRINIVASULA S, AHMAD M, ALNEMRI E, WANG X.1997 Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91:479-489.

LIAO, K.W.; LIN, Z.Y.; PAO, H.N.; KAM, S.Y.; WANG, F.I.; CHU, R.M. 2003. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(5):399-406.

LIU, X., KIM, C.N., YANG, J., JEMMERSON, R., AND WANG, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157.

LOMBARDI, C., 1995. Evaluación del tratamiento quimioterapéutico con vincristina en la regresión del tumor venéreo transmisible canino espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral. *Tesis Magister, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile*: 48- 50.

LOPEZ, M.; LEYGTHON, C.; GRAF, M.1982. Tecnicas de laboratorio para citología e histopatología .Dpto. *Biología celular y genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile*, 2ª edición, 104-111.

MANON, S.; CHAUDHURI, B.; GUÉRIN, M. 1997. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of bcl-xL. *FEBS letters*, 415:29-32.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, A.; MAGNOL, J.P. 1996. Immunophenotype of canine transmissible venereal tumor. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57:1-11.

MAXEY, L. 1996. Cytology and the diagnosis of neoplasia. Proceedings of the 20th Waltham/Osu Symposium.

MC GILL, G.; FISHER, D. 1997: apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy. *Frontiers in Bioscience*, 2: 353-379.

MIDDLETON, G.; COX, S.W.; KORSMEYER, S.; DAVIES, A.M. 2000. Differences in bcl-2- and bax-independent function in regulating apoptosis in sensory neuron populations. *European Journal of Neuroscience*, 12(3):819-827.

- MIGHELI, A.M.; BISSONETTE, R.; SCHIFFER, D. 1995.** Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end labeling techniques. *Journal of Pathology*, 176: 27-35.
- MOULTON, J .1993.** Tumor of genital system and tumor of the mammary gland. In : tumors in domestic animals 3° ed. *Edit university of California.Press Berckley USA*, 479-549.
- MOZOS, E.; MENDEZ, A.; GOMEZ- VILLAMANDOS, J. C.; MARTIN DE LASMULAS, J.; PEREZ, J. 1996.** Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Veterinary Pathology*, 33: 257- 263.
- OLTRA, O. 1999.** Respuesta inmune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fase progresiva y regresiva. *Memoria de titulo. Santiago- Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile*, 70.
- PEREZ, J.; DAY, M.; MOZOS, E. 1998.** Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 64: 133-147.
- PEREZ, L.; VERGARA, K.; VENTURA, J. 1978.** Tratamiento quirúrgico y quimioterápico del tumor venéreo transmisible de localización nasal en caninos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 10 (2): 149 –152.
- PERRY, S.W.; EPSTEIN, L.G.; GELBARD, H.A. 1997.** Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Bio Techniques*, 22:1102-1106.
- REED, J.C.; MIYASHITA, T.; TAKAMAYA, S.; WANG, H.G.; SATO, T.; KRAJEWSKI, S.; AIME-SEMPE, C.; BODRUG, S.; KITADA, S.; HANADA, M. 1996.** Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 60:23-32.
- REED, J.C. 1997** Cytochrome c: can't live with it; can't live without it. *Cell*, 91:559-562.
- REED, J. 2000** Mechanism of apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157:1415-1430.
- RICHARD, E.W.1994.** Urogenital Tumors en: *compendio del curso internacional de oncologia veterinaria. Universidad de Chile*. 86-87.
- ROGERS, K. 1997.** Transmissible Venereal Tumor. *Small Animal*, 19: 1036-1044.
- RUDIN, C. M.; THOMPSON, C. B. 1997** Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. [*Annual Review of Medicine*](#).: 267-281.
- SALVESEN, G.S.; DIXIT, V.M. 1997.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- SANDUSKY, G.E.; CARLTON, W.W.; WIGHTMAN, K.A. 1987.** Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Veterinary Pathology* 24: 495-499.

SAPP, W.J.; ADAMS, E.W. 1970. C- type viral particles in canine venereal tumor cell culture. *American Journal of Veterinary Research*, 31:1321-1223.

SCHMITZ, G.G.; WALTER, T.; SEIBL, R.; KESSLER, C. 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Analytical Biochemistry*.192: 222-231.

SEKI, K.; YOSHIKAWA, H.; SHIUKI, K.; HAMADA, Y.; AKAMATSU, N.; TASAKA, K. 2000. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 45(3):199-206.

SJÖSTRÖM, J.; BERGH, J. 2001. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *British Medical Journal*; 322: 1538-1539.

SOINI, Y.; PAAKKO, P.; LEHTO, V. 1998. Histopathological evaluation of apoptosis and cancer. *American Journal of Pathology*.153: 1041-1053.

SOINI, Y.; PAAKKO, P. 1999. Apoptosis and expression of caspases 3, 6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas. [*APMIS: Acta Patológica, Microbiológica, e Inmunológica Scandinavica*](#) 107(11):1043-50.

SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M. ET AL. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441-446.

TAUSSING. M. J. 1989. Neoplasia: Processes in Pathology and Microbiology. *Edit. Blackwell Scientific Publications. Second edition.* Pag. 689 – 809.

THIRY, M.1992. Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non-isotopic nucleotide analogs. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 40: 411-419.

THOMPSON, C.B. 1995 Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267:1456-1462.

TRAIL. P.; YANG, T. 1985. Canine transmissible venereal sarcoma: Quantitation of T-Lymphocyte subpopulations during progressive growth and spontaneous tumor regression. *Journal of the National Cancer Institute*, 74 (2): 461-467.

VAUX, D.L. 1997. CED-4: the third horseman of apoptosis. *Cell*, 90:389-390.

VERMOOTEN, M. 1987. Canine transmissible venereal tumour: A Review. *Journal Of the South African Veterinary Association*, 87(03): 147-150.

VOGT, C. 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Gerburtsheiferkroete (*Alytes obstetricians*) Solothurn, Switzerland: Jent and Gassman.

WANG, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 15: 2922-2933.

WANG, L.G.; LIU, X.M.; KREIS, W.; BUDMAN, D.R. 1999. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 44(5):355-61.

WEINBERG, R. A. 1997. How cancer arise *Scientific American*.,275:62-70.

WEINBERG, R.A. 1996 Así se produce el cáncer: las bases moleculares del cáncer salen a la luz y sugieren nuevas aproximaciones terapéuticas. *Investigación y Ciencia* 242:10-18.

WHITE, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development*, 10:1-15.

WIJSMAN, J.H.; JONKER, R.R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C.J.H.; CORNELISSE, C.J.,;VAN DIERENDONK, J.H. 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 41: 7-12.

WILLARD, M.D.; TUEDTEN, H.; TURNWOLD, G.H.1994. Citology of neoplastic and inflammatory Masses, en: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Edit W.B. Saunders company.2^a ed. 334-341

WYLLIE, A.H. 1987. Apoptosis, cell death in tissue regulation. *The Journal of Pathology*; 153:313.

WYLLIE, A.H.,; GOISTEIN, P. 2001. More than one way to go. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*.98: 11-13.

YANG, E.; KORSMEYER, S.J. 1996: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88:386-401.

YANG, T. 1987. Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. *Journal Small Animal Practice*, 21: 522-523.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. 1997. Prevention of apoptosis by bcl-2:release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275:1129-1132.

YANG, T.J.; JONES, J.B.1973. Canine transmissible venereal sarcoma: transplantation studies in neonatal and adult dogs. *Journal of National Cancer Institute*, 51: 1915-1918.

YUAN, J. 1997. Transducing signals of life and death. *Current Opinion in Cell Biology*, 9:247-251.

ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90:405-413.