



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL LECHO VASCULAR DEL
TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE, EN REGRESIÓN
INDUCIDA CON VINCRISTINA**

FRANCISCO CONTRERAS YELPI

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico

Veterinario

Departamento de Patología

Animal

PROFESOR GUIA: DR. CARLOS GONZÁLEZ RIVEROS

SANTIAGO, CHILE

2006

INDICE

1. Introducción	5
2. Revisión Bibliográfica	6
2.1. Tumor Venéreo Transmisible canino (TVT)	6
2.1.1. Etiología	7
2.1.2. Epidemiología	8
2.1.3. Manifestaciones clínicas	9
2.1.4. Biología e Inmunología Tumoral	9
2.1.5. Diagnóstico	12
2.1.6. Tratamiento	13
2.2. Mecanismo de acción de las drogas antitubulínicas	16
2.3. Vascularización y Neoplasias	18
2.4. Terapia antivascular y vaculatura tumoral	21
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos específicos	28
5. Materiales y Métodos	28
5.1. Materiales	28
5.1.1. Muestras biológicas	28
5.1.2. Tratamiento	28
5.1.3. Técnicas Histológicas	28
5.1.4. Equipo	29
5.2. Métodos	29
5.2.1. Obtención de muestra	29
5.2.2. Diagnóstico citológico	29
5.2.3. Biopsias tumorales	29
5.2.4. Evaluación de los resultados	30
5.2.5. Análisis estadístico	32
6. Resultados	32
6.1. Estudio descriptivo del TVT	32
6.1.1. Características citológicas e histopatológicas del TVT	32
6.1.2. Características histopatológicas del lecho vascular del TVT	33
6.2. Análisis morfométrico	37
6.2.1. Estimación del grado de vascularización a través de eritrocitos	37
6.2.2. Área vascular total y área promedio	39
7. Discusión	42
7.1. Características citológicas e histopatológicas de TVT	42
7.2. Características vasculares del lecho vascular del TVT	43
8. Conclusiones	47
9. Bibliografía	48
10. Anexos	74

RESUMEN

Actualmente, dentro de las opciones terapéuticas antineoplásicas más investigadas, se destaca la terapia anti-angiogénica, aparentemente sin efectos colaterales importantes para el paciente. Esta terapia se dirige hacia los factores implicados en el progreso de la cascada angiogénica, para impedir el soporte sanguíneo del tejido tumoral, aumentando la apoptosis de las células neoplásicas.

En este estudio se estudiaron los cambios del lecho vascular del TVT, tanto en su fase de crecimiento progresivo como durante la regresión inducida por el tratamiento con sulfato de vincristina (VCR), droga antineoplásica que, adicionalmente a su efecto citostático sobre la masa tumoral, ha demostrado presentar características antivascuales directas.

Se utilizaron biopsias de tumores de TVT de ubicación genital de 10 caninos adultos de entre 1 a 10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza. Los pacientes fueron sometidos a quimioterapia, utilizando VCR, en dosis única de 0,03 mg/kg, vía endovenosa, para inducir regresión tumoral.

Histopatológicamente a través de la tinción Papanicolau, se observó que luego del tratamiento, el número de vasos sanguíneos y eritrocitos presentes en el lecho vascular disminuían notoriamente. Por otra parte se determinó, mediante el estudio morfométrico de los cortes de TVT, que el área ocupada por los eritrocitos era significativamente mayor ($p < 0.05$) en los casos de TVT progresivo versus los de fase regresiva. Además, se comprobó que el área total y el área promedio ocupada por vasos sanguíneos intratumorales en fase progresiva, son significativamente mayores ($p < 0.05$) a las obtenida para la fase regresiva inducida con VCR.

Palabras clave: Tumor venéreo transmisible, Vascularización, Vincristina.

SUMMARY

The inhibition of the angiogenesis process is currently one of the most investigated antineoplastic therapies, with no important side effects for the patient. This therapy is directed against the factors implied in the progress of the angiogenic cascade, to impede a vascular supply to the tumoral mass, increasing apoptosis in neoplastic cells.

In this study changes of the vascular bed of canine TVT were studied after regression induced by treatment with vincristine sulfate (VCR). This antineoplastic drugs has shown both a cytostatic effect on tumor cells and an antivascular action.

Histopatologically through computerized assisted morphometry and Papanicolau stain, was observed that after the treatment with VCR, the number of blood vessels and area occupied by erythrocytes diminished significantly ($p < 0.05$). Also, the total area and the average area occupied by intratumoral blood vessels was significantly lower ($p < 0.05$) for the regressive phase of canine TVT growth induced with VCR.

Key Words: Transmissible venereal tumor, Vascularization, Vincristine sulphate.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la oncología ha enfocado gran parte de sus esfuerzos hacia el desarrollo de terapias antineoplásicas de menor impacto, para el organismo y su balance homeostático. Los modelos animales, históricamente, se han presentado como una de las principales alternativas para el diseño de ensayos oncológicos utilizando enfermedades neoplásicas de ocurrencia natural (ensayos clínicos), como el tumor venéreo transmisible (TVT).

El TVT se caracteriza, en su presentación clínica, por su aspecto hemorrágico, asociado a una extensa irrigación sanguínea, que le sirve de sostén para recibir los componentes que le permiten desarrollar su acelerado metabolismo. Esto sugiere, que este tumor sería un excelente modelo para el estudio de procesos biológicos, como la angiogénesis tumoral y de su comportamiento frente al tratamiento con drogas antineoplásicas, convencionales y antiangiogénicas.

Actualmente, dentro de las opciones terapéuticas antineoplásicas más investigadas, se destaca la terapia anti-angiogénica, aparentemente sin efectos colaterales importantes para el paciente. La angiogénesis es un proceso de tipo biológico multifactorial, caracterizado por la formación de neocapilares a partir de vasos preexistentes, que ocurre en algunos procesos fisiológicos y patológicos, como el cáncer. Esta terapia se dirige hacia los factores implicados en el progreso de la cascada angiogénica, para impedir el soporte sanguíneo del tejido tumoral, aumentando la apoptosis de las células neoplásicas.

En este estudio se caracterizarán los cambios que presenta el lecho vascular tumoral del TVT, tanto en su fase de crecimiento progresivo como durante la regresión inducida por el tratamiento con sulfato de vincristina (VCR), droga antineoplásica que, adicionalmente a su efecto citostático sobre la masa tumoral, ha demostrado presentar características antivasculares directas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. Sin embargo el progreso en la detección, diagnóstico y tratamiento han aumentado la tasa de supervivencia frente a muchas clases de cáncer. En la casuística veterinaria actual, este tipo de patologías son de alta prevalencia y también representan una de las principales causas de muerte (Wilthrow y MacEwen, 2001). Por esto la oncología veterinaria ha presentado un importante desarrollo en el último tiempo, asociado a un aumento en la publicación de textos y de trabajos científicos en revistas especializadas, además de la creación de la *Veterinary Cancer Society* y del reconocimiento de la especialidad en la década de los `80, por el *American College of Veterinary Internal Medicine* (Flores *et al.*, 2000).

2.1 TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE

Una de las neoplasias de mayor incidencia en el canino es el tumor venéreo transmisible (TVT) (Flores *et al.*, 1986; Flores *et al.*, 2000). Este tumor, descrito por primera vez en 1876 por el médico ruso Dr. M. A. Novinsky, es una neoplasia de células redondas, al igual que mastocitomas, histiocitomas y linfosarcomas (Meyer y Franks, 1986) y ha recibido numerosas denominaciones, como linfosarcoma venéreo, sarcoma de Sticker, granuloma venéreo (Booth, 1994), linfoma contagioso, condiloma canino, tumor venéreo contagioso e histiosarcoma (González *et al.*, 2002), entre otras.

El TVT afecta a la familia de los caninos, por medio del transplante espontáneo de las células tumorales, como resultado del desarrollo de interacciones sociales y sexuales entre individuos susceptibles (Torres, 1999). Fue el primer tumor que logró ser transmitido de un individuo a otro, en forma experimental (Rogers, 1997; Oltra, 1999), mientras que, en forma natural, se propaga mediante transplante alogénico (Feldman y Nelson, 1987), o sea entre individuos diferentes de una misma especie y no por la transformación de las células del huésped, como ocurre en la mayoría de las neoplasias (Cohen *et al.*, 1984). El transplante de tejido neoplásico entre individuos, en las especies mamíferas es un evento que se obtiene sólo en forma experimental, por el implante de células tumorales entre individuos isogénicos, o sea genéticamente idénticos, por lo que el TVT ha sido considerado como un modelo interesante para estudiar mecanismos de transplantabilidad y

respuesta inmune (Alberts *et al.*, 1994; González *et al.*, 2002). Experimentalmente, también se ha logrado transplantar el tumor en otros caninos emparentados al perro, como el lobo, el chacal, el zorro y el coyote (Yang, 1988; Rogers, 1997; Mukaratirwa y Gruys, 2004).

2.1.1 ETIOLOGÍA

Para explicar la etiología del TVT, se han discutido principalmente dos teorías: la teoría del trasplante celular neoplásico y la teoría viral (Mukaratirwa y Gruys, 2004). Se han publicado diversos trabajos para la caracterización de las células del TVT a través de la inmunobiología (Cohen, 1980; Cohen *et al.*, 1984; Yang, 1988; Yang *et al.*, 1991; González *et al.*, 2000), del análisis cromosómico (Weber *et al.*, 1965; Barski *et al.*, 1966; Idowu, 1984; Fujinaga *et al.*, 1989); del estudio del reordenamiento genético (Katzir *et al.*, 1985; Amariglio *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002) y del inmunofenotipo del tumor (Mozos *et al.*, 1996; Marchal *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000). Se ha establecido que estas características son comunes entre células de TVT de diversas latitudes (González *et al.*, 2002), por lo que estos tumores podrían compartir un antepasado celular común (Epstein y Bennett, 1974; Booth, 1994), que ha continuado siendo transmitido por medio el trasplante celular, a través del tiempo (Cohen, 1985; Rogers, 1997), teniendo en cuenta, además, que las características histológicas del tumor no son alteradas por transferencia pasiva (Adams *et al.*, 1968). Una de las principales pruebas, que apoya la naturaleza de la transmisión celular en lugar de un virus oncogénico, podría ser el número constante de cromosomas detectados en las células de TVT (Feldman y Nelson, 1987), de diversas latitudes geográficas (Torres, 1999), con características cariogenéticas que claramente difieren de las del perro doméstico (*Canis familiaris*) (Mukaratirwa y Gruys, 2004).

No obstante, no se ha podido establecer con certeza la célula que origina la neoplasia, pues la célula originaria y el inmunofenotipo que ésta exhibiría, permanecen siendo desconocidos (Mozos *et al.*, 1996; González *et al.*, 2002), aunque muchas de las características inmunofenotípicas estudiadas en el TVT (Mozos *et al.*, 1996; Marchal *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2000), además de evidencia reciente, que ha descrito la presencia de amastigotes de la Leishmaniasis, dentro del citoplasma de las células de TVT, de tumores primarios genitales y extragenitales, lo cual representaría una nueva evidencia que podría relacionar al TVT con la posibilidad de un origen histiocitario (Albanese *et al.*, 2002; Catone *et al.*, 2003).

También se investigó en relación a una probable etiología viral, y a pesar de que algunos trabajos han detectado características que son compatibles con un contagio viral (Saap *et al.*, 1970; Cockrill y Beasley, 1975; Amber *et al.*, 1985) permanece aún sin ser comprobada, a través de pruebas reproducibles y consistentes (Morris y Dobson, 2002). Además, las células tumorales infectadas con virus de naturaleza oncogénica, presentan cantidades variables de cromosomas, mientras que las células TVT se caracterizan por un número constante de 50 cromosomas, al igual que cantidades similares de ADN (Barski *et al.*, 1966; Feldman y Nelson, 1987) y se ha demostrado que un infiltrado tumoral libre de células es incapaz de generar, en forma constante, la transmisión del tumor (Feldman y Nelson, 1992; Torres, 1999; Wilthrow y MacEwen, 2001).

2.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Es un tumor de distribución mundial (Rogers, 1997), de mayor prevalencia en regiones urbanas de clima tropical y subtropical (Amber *et al.*, 1982; Scott *et al.*, 1998). La mayoría de los perros tienden a ser de razas grandes de vida libre (Booth, 1994; Rogers, 1997; Wilthrow y MacEwen, 2001), sexualmente activos (Feldman y Nelson, 1992; Rogers, 1997; Oltra, 1999) y jóvenes (Calvert *et al.*, 1982) y sin una clara predisposición sexual ni racial (Scott *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2002).

El TVT se considera como un tumor maligno debido a su capacidad para metastizar, que puede representar un riesgo de muerte para el paciente (Prier y Jhonson, 1964; Oltra, 1999). Debido a su forma de transmisión, el TVT se presenta, principalmente, en los genitales externos de perros de ambos sexos, ya sea en forma única o múltiple (Moulton, 1961; Richard, 1994; Oltra, 1999), ubicándose en membranas mucosas, lo que se ve facilitado por la presencia o la generación de soluciones de continuidad en el epitelio, pues esto favorece la propagación de las células tumorales (Calvert, 1982; Rogers, 1997). De esta manera, el lugar de mayor ocurrencia del TVT, en su forma natural, son las mucosas genitales y esto está asociado principalmente al desarrollo de la conducta reproductiva entre un canino enfermo y uno sano (Mizuno *et al.*, 1996). En la hembra canina, el TVT se presenta, generalmente, como una masa en la pared vaginal, sin embargo, también se ha documentado la implicancia de las zonas vestibular y vulvar, los labios vaginales, el cérvix y el útero (Feldman y Nelson, 1987). En machos, se ubica, de preferencia, en la mucosa del pene y zona parietal del prepucio (Moulton, 1961; Idowu, 1975; Oltra, 1999). En su

presentación extragenital, se ubica en nódulos linfáticos inguinales, mucosa nasal e intranasal (Papazoglou *et al.*, 2001), oral y anal, párpados, senos frontales, piel, subcutis, paladar blando, riñones y cerebro, entre otros (Feldman y Nelson, 1987; Vermooten, 1987; Booth, 1994; Oltra, 1999), lo que podría ser el resultado de una metástasis desde un tumor primario (Oduye *et al.*, 1973; Oltra, 1999) o del desarrollo de conductas sociales, como el lamido y el olfateo (Rogers, 1997). En estos casos se dificulta la diferenciación entre un sitio extragenital primario y una metástasis (Rogers, 1997), además de un diagnóstico diferencial que descarte la presencia de otros tumores caninos de células redondas como los linfomas, histiocitomas, melanomas amelanolíticos y los tumores de células cebadas o los carcinomas pobremente diferenciados (Mozos *et al.*, 1996).

2.1.3 MANIFESTACIONES CLINICAS

Los signos clínicos asociados al TVT pueden presentarse por semanas o meses, entre los cuales la presencia de la secreción serosanguinolenta genitalal, debido a la vascularización y fragilidad del tumor (Fedman y Nelson, 1987), se describe como la principal causa de consulta, entre los individuos afectados por el tumor (Wilthrow y MacEwen, 2001). También se describe presencia de inflamación o alteración de la forma genital, el lamido excesivo del área implicada, presencia de olor anormal asociado o una masa que protruye (Rogers, 1997). En tumores extragenitales según se describe la presencia de secreción nasal aumentada y estornudos, con o sin hemorragia asociada, linfadenopatía regional de la zona afectada, aumento de volumen cutáneo o subcutáneo, malformación facial y disfagia (Torres, 1999; Papazoglou *et al.*, 2001).

Macroscópicamente, las masas tumorales tienen forma semejante a una coliflor (Withrow y MacEwen, 2001), en nódulos solitarios o múltiples, irregulares, de color gris o rosagrisáceo (Feldman y Nelson, 1987), altamente vascularizadas, friables y hemorrágicas, y según la data de inicio, asociadas a úlceras, necrosis y contaminación superficial (Booth, 1994; Torres, 1999), con un tamaño que puede alcanzar desde 1 a 20 cm de diámetro (Scott *et al.*, 1998).

2.1.4 BIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA TUMORAL

Se describen dos fases biológicas para esta neoplasia, una progresiva y otra regresiva, que se diferencian por la actividad proliferativa observada en el tejido tumoral

(Chu *et al.*, 2001), y que ha sido cuantificada a través de diversos métodos, como la actividad mitótica presente, la relación entre células redondas y células fusiformes, y los grados de fibrosis y necrosis del estroma celular (Hill *et al.*, 1984; Yang, 1985; Oltra, 1999; González *et al.*, 2000), entre otros. También se ha descrito una fase estática (Baber *et al.*, 1999; Mukaratirwa y Gruys, 2004), que correspondería a un equilibrio dinámico entre las actividades proliferativa y regresiva, en forma simultánea, dentro de un mismo tumor (Trail y Yang, 1985; Pérez *et al.*, 1998).

El TVT es una neoplasia que posee la particularidad de ser transplantable mediante células viables, superando las barreras del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Mukaratirwa y Gruys, 2004). El curso natural de la enfermedad, estaría determinado por la respuesta inmune del animal frente al tumor, pudiendo tener un crecimiento local e indoloro, ser de tipo progresivo con desarrollo de metástasis (Rogers, 1997) o tender a la remisión espontánea (Bennet *et al.*, 1975; Pérez *et al.*, 1998), que es acompañada por un trasplante de inmunidad anti-exposición a TVT (Chandler y Yang, 1981). Si bien en la literatura no hay estudios que describan la regresión del TVT de ocurrencia natural (Scott *et al.*, 1998), el comportamiento de los tumores producidos experimentales ha demostrado ser bastante predecible (Hsiao *et al.*, 2004) y la mayoría de los animales adultos, sanos e inmunocompetentes, sufren regresión espontánea dentro de 4 a 6 meses del implante experimental (Pérez *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 2003). Por otra parte, en animales inmunodeprimidos y cachorros, se describe la ocurrencia de metástasis (Cohen, 1972; Vermooten, 1987; Yang, 1988). Estas se desarrollarían en menos del 5% de los casos (Booth, 1994), implicando los ganglios linfáticos inguinal superficial e ilíaco externo (Feldman y Nelson, 1987), piel, tejido subcutáneo, hígado, bazo, tonsilas, pulmones (Yang, 1987), paladar blando, riñones, cerebro (Vermooten, 1987; Ferreira *et al.*, 2000) y ojos (Boscos, 1998; Ferreira *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2000).

La fase regresiva del TVT estaría mediada por mecanismos inmunológicos (Trail y Yang, 1985) y los principales factores asociados serían la inmunidad humoral y celular, la expresión de antígenos de histocompatibilidad en células de TVT y las citoquinas liberadas por las células inflamatorias y leucocitarias (Chu *et al.*, 2001).

Se piensa que los animales que sufren regresión y cachorros nacidos de hembras inmunizadas contra el TVT (Fenton *et al.*, 1988) que no vuelven a presentar la enfermedad (Mizuno *et al.*, 1989), se debería principalmente al desarrollo de inmunidad humoral y

celular (Mozos *et al.*, 1996). La refractariedad a nuevos desafíos con células tumorales (Feldman y Nelson, 1987) estaría relacionada con la existencia de antígenos de membrana celular y de anticuerpos dirigidos contra estos (Palker *et al.*, 1981; Hill *et al.*, 1984). Se ha demostrado que el crecimiento tumoral puede ser inhibido por transferencia de suero hiperinmune (Cohen, 1980). También se han detectado antígenos asociados al tumor (AAT) (Palker *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 1991) y se ha postulado que podrían contribuir a bloquear parcialmente la respuesta inmune durante la fase progresiva de la neoplasia, como se ha demostrado en otros tumores (Black, 1980), pues se ha determinado que los niveles sanguíneos de estos antígenos se correlacionan positivamente con el volumen tumoral, y que la extracción del tumor produce su desaparición, luego de 48-72 horas (Yang *et al.*, 1991).

En otras investigaciones se ha demostrado el establecimiento de una respuesta leucocitaria frente al TVT (Oduye *et al.*, 1973; McEnyee *et al.*, 1976; Ivoghli, 1977; González *et al.*, 2000), describiéndose un incremento significativo de linfocitos infiltrativos del tumor (TIL) en TVT regresivos, con un predominio de linfocitos T (Chandler y Yang, 1981; Mizuno *et al.*, 1989; Trail y Yang, 1985; Mozos *et al.*, 1996) y de la subpoblación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Kipar *et al.*, 1998; Oltra, 1999). Además, se ha informado de un aumento en la actividad blastocística de los linfocitos de sangre periférica (PBL) en tumores regresivos, describiendo un notable aumento del nivel de linfocitos T, lo que desencadenaría la intensa infiltración tumoral descrita, en la que los LT serían fundamentales para la regresión tumoral (Mizuno *et al.*, 1989). En otro estudio se describió la presencia de una molécula citotóxica producida por las células TVT, con un peso molecular entre 30 a 100 kDa, que induciría apoptosis en la fracción de LB de los PBL (Liao *et al.*, 2003).

El mecanismo por el cual las células de TVT sortean las barreras de histocompatibilidad por un tiempo tan prolongado, siendo luego detectadas, no está claro. Al parecer el TVT podría haber sufrido un proceso de selección, desde el punto de vista inmunológico (Mukaratirwa y Gruys, 2004).

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de las moléculas de CMH clase I y II, que durante la fase progresiva, usualmente es baja, sufre un notable aumento durante la fase regresiva (Hsiao *et al.*, 2002), pero la falta de expresión de β_2 microglobulina, en aproximadamente el 80% del total de células tumorales, dificulta la formación del CMH-I

en la superficie celular (Cohen *et al.*, 1984). Hsiao *et al.*, en el 2002, obtuvieron resultados que indican que los mismos linfocitos infiltrativos del tumor (TIL), inducirían la expresión de CMH-I y II, pero sólo en un tercio de las células del TVT regresivo, mientras que un 60-70% se mantendrían sin expresar el CMH-I. Esto limitaría la eficiencia de la respuesta citotóxica antitumoral de CD8+, (Torres, 1999), que es la clase de LT que predomina entre los TIL de ambas fases tumorales (Kipar *et al.*, 1998).

En un intento por comprender mejor la función de las citoquinas en TVT, se comprobó que la IL-6 secretada en grandes concentraciones por los TIL, reestablece la actividad citotóxica de linfocitos con actividad “killer” (LAK), suprimida por el TGF-1 secretado por las mismas células tumorales (Hsiao *et al.*, 2004). Esto es de mucha importancia en relación al desarrollo de la respuesta inmune en TVT, debido a que la ausencia de CMH-I sobre la superficie de las células tumorales, obliga a que otras células como las LAK asuman gran parte de la respuesta citotóxica montada en el TVT (Hsiao *et al.*, 2004).

2.1.5 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de TVT se inicia con la anamnesis, un examen clínico del individuo y la signología clínica del caso (Rogers, 1997). Para confirmar la sospecha de TVT y hacer diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células redondas (Booth, 1994), es necesario recurrir a la evaluación citológica o histopatológica del tumor (Wellman, 1996).

La muestra citológica de TVT suele presentar gran cantidad de células inflamatorias, leucocitarias (Rogers, 1997) y células tumorales, las que tienen una apariencia típica (Rogers, 1997), de forma ovalada y gran tamaño (Booth, 1994), núcleo redondo u ovalado de tamaño variable, frecuentemente hipercromático, excéntrico y con un nucléolo de color azul característico (Weir *et al.*, 1978; Yang, 1987; Booth, 1994; Wellman, 1996). Es común encontrar muchas células en mitosis (Weir *et al.*, 1978; Booth, 1994). El citoplasma es poco definido, basófilo y con múltiples vacuolas (González *et al.*, 2000), con una relación entre citoplasma y núcleo de dos es a uno (2:1) (Booth, 1994).

Para diferenciar al TVT de otras neoplasias se requiere de una evaluación histopatológica mediante una biopsia del tumor (Wellman, 1996). Los cortes histológicos de TVT se han sometido a la tinción de Giemsa, la de azul de toluidina (Mozos *et al.*, 1996) y

principalmente a la Hemoatoxilina-eosina (Oltra, 1999), entre otras técnicas. Histológicamente se aprecia un tejido homogéneo (Torres, 1999), compuesto de células neoplásicas redondas o poliédricas, uniformes, ordenadas en masas compactas (Weir *et al.*, 1978; Scott *et al.*, 1997; González *et al.*, 2002), interconectadas con un delgado estroma fibrovascular (Moulton, 1961), el cual permite que las células se ordenen en racimos o cordones (Rogers, 1997). También se ha indicado que, en algunos tumores, es posible apreciar alteraciones asociadas a la ulceración e inflamación secundaria de la mucosa (Mozos *et al.*, 1996). Las células tumorales son de gran tamaño, redondas, ovoides o poliédricas (Mozos *et al.*, 1996; Rogers, 1997; Torres, 1999). El núcleo es grande, redondo, hipercromático, con bordes bien delimitados (Hill *et al.*, 1984; Vermooten, 1987; Booth, 1994) con numerosas figuras mitóticas en su interior (Mozos *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1998), además de un nucleolo de ubicación central o excéntrica (Rogers, 1997; Torres, 1999). El citoplasma tumoral es escaso, eosinofílico (Oduye *et al.*, 1973; Yang, 1987; Oltra, 1999), con abundantes gránulos intracitoplasmáticos (Moulton, 1961; Weir *et al.*, 1978; Oltra, 1999) y con bordes poco definidos (Mozos *et al.*, 1996). En el estroma tumoral se ha observado una baja infiltración leucocitaria (Hill *et al.*, 1984) y la presencia de abundantes vasos sanguíneos (Oduye *et al.*, 1973; Yang *et al.*, 1973; González *et al.*, 2002). Rodeando a los vasos tumorales se observan linfocitos y células plasmáticas diseminadas (Oduye *et al.*, 1973; McEnyee *et al.*, 1976; Ivoghli, 1977; González *et al.*, 2002) y, en menor medida, macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos (Hall *et al.*, 1976; Otomo *et al.*, 1981; Mozos *et al.*, 1996; González *et al.*, 2002). También se observan escasas fibras de colágeno, rodeado de células tumorales y una escasa cantidad de células fusiformes (Hill *et al.*, 1984). En tumores de gran tamaño se puede ver necrosis focal y fibrosis (Oduye *et al.*, 1973; Oltra, 1999).

No se describe el uso habitual de otros métodos diagnósticos para el TVT (Feldman y Nelson, 1987), pero entre las técnicas descritas que han sido empleadas destacan el trasplante de células a individuos susceptibles, las pruebas inmunohistoquímicas, las evaluaciones citogenéticas y la microscopía electrónica de transmisión (Moulton, 1961; Feldman y Nelson, 1987; Rogers, 1997).

2.1.6 TRATAMIENTO

El TVT es único en su capacidad de respuesta a una variedad de modalidades terapéuticas (Feldman y Nelson, 1987). La realización de tratamiento siempre está indicada,

debido a la existencia de numerosos informes que han demostrado el desarrollo de metástasis, y a que no hay evidencia de regresión espontánea en tumores de presentación natural, (Rogers, 1997; Scott *et al.*, 1997). La escisión quirúrgica del tumor no es considerada como una alternativa efectiva (Fossum *et al.*, 1997), porque presentaría como principales desventajas la aparición de metástasis y un alto porcentaje de recidiva (67.9%) (Rogers 1997), a diferencia de la criocirugía y el uso del electrobisturí que han permitido obtener mejores resultados (Idowu, 1984; Vermooten, 1987). Por otro lado, la radioterapia ha demostrado ser muy segura y efectiva (Rogers, 1997; Withrow y MacEwen, 2001; Morris *et al.*, 2002), pero poder llevarla a cabo, se requiere anestesiar al paciente en cada sesión, contar con personal especializado y tener un equipamiento de alto costo (Brown *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1982; Feldman y Nelson, 1987). También han sido usados modificadores de la respuesta biológica e inmunológica (Scott *et al.*, 1997; Withrow y MacEwen, 2001), aunque su uso debería ser considerado solo en forma experimental (Withrow y MacEwen, 2001).

La quimioterapia es altamente eficiente, incluyendo los tumores de presentación metastática y los tumores de ubicación extragenital (Calvert *et al.*, 1982; Feldman y Nelson, 1987). Se han empleado diferentes agentes y protocolos quimioterapéuticos (Feldman y Nelson, 1987), incluyendo a la ciclofosfamida, el metotrexano, la doxorubicina, la vinblastina (VBL) y el sulfato de vincristina (VCR) (Withrow y MacEwen, 2001).

La VCR, al igual que la VBL y la vinorelbina (Budman, 1997; Hadfield *et al.*, 2003), vindesina y vinflunina (Kruczynski y Hill, 2001; Hadfield *et al.*, 2003), son drogas antitubulínicas que forman parte del grupo de los alcaloides derivados de la planta *Catharanthus roseus* o Perivinca de Madagascar (Bhusana-Rao *et al.*, 1990; Hadfield *et al.*, 2003), siendo denominados como alcaloides de la vinca o “*vinca alkaloids*” (VA) (Jordan y Wilson, 2004). La VBL y la VCR son introducidas como terapia anticancerígena en la década de los '60, formando parte de protocolos quimioterápicos que han resultado ser curativos en enfermedades como el cáncer testicular, la enfermedad de Hodgkin y la leucemia linfoblástica aguda o ALL (Acute Lymphoblastic Leukaemia) (Barnett *et al.*, 1978; Hadfield *et al.*, 2003). También han sido utilizados en regímenes paliativos en algunos de los mayores tumores sólidos (Wood *et al.*, 2001), demostrando ser la droga más efectiva en el tratamiento del TVT (Calvert *et al.*, 1982; Torres, 1999).

Los resultados obtenidos con la monoterapia con VCR, indican que es una eficiente modalidad terapéutica en el tratamiento del TVT y que su rango de respuesta es comparativamente favorable a otros protocolos de quimioterapia, presentando una baja frecuencia de efectos colaterales (Brown *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1982; Booth, 1994; Weller, 1994; Jeglum, 1994; Rogers, 1997; Oltra, 1999; González *et al.*, 2002). La aplicación de la droga es en forma endovenosa, con dosis que van desde los 0,025 mg/kg (Calvert *et al.*, 1982; Feldman y Nelson, 1987), alcanzando los 0.05 a 0.07 mg/m² (Brown *et al.*, 1980) o los 0.03 mg/kg (Lombardi, 1995). No se sabe con certeza si el uso de dosis de VCR mayores a estas, podrían representar una eficacia sustancialmente mayor (Rogers, 1997) (Brown *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1982; Booth, 1994; Weller, 1994; González *et al.*, 2002).

Los efectos colaterales descritos incluyen la irritación perivascular en el sitio de inyección, constipación, anorexia leve, vómitos, neuropatías periféricas que cursan con debilitamiento y atrofia muscular, la aparición de signología neurológica, al administrar el fármaco en dosis altas (Amber *et al.*, 1990; Booth, 1994; Weller, 1994), leucopenias de tipo transitorio, principalmente asociadas a una disminución en el recuento de neutrófilos, pero sin variaciones significativas de los linfocitos (Calvert *et al.*, 1982; González *et al.*, 2002) ni alteraciones significativas en la serie roja sanguínea ni en el recuento plaquetario (Lombardi, 1995; Oltra, 1999). De todos modos, terapias prolongadas requieren de un monitoreo periódico, realizado a través de hemogramas y perfiles bioquímicos, semanalmente antes de cada tratamiento (Calvert *et al.*, 1982). No obstante, las dosis utilizadas de VCR parecerían no estar asociadas a un efecto deteriorante sobre la respuesta inmune celular local, por lo que la reducción de la masa tumoral del TVT obtenida a través de la quimioterapia con VCR, podría favorecer el establecimiento de la respuesta inmune celular local y como consecuencia, la remisión de la neoplasia (González *et al.*, 2002). Esto sería posible debido a que de alguna manera durante la fase progresiva del tumor, las células tumorales podrían bloquear la respuesta inmune que sería incapaz de detener la progresión neoplásica. Sin embargo, esta inmunidad se podría restaurar y volver más efectiva, como consecuencia de la citoreducción causada por la quimioterapia poco agresiva que no altera significativamente a las células leucocitarias periféricas (Torres, 1999).

2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS DROGAS ANTITUBULÍNICAS

Los alcaloides de la vinca o VA actúan como citostáticos, suprimiendo la dinámica de los microtúbulos (MT) (Jordan y Wilson, 2004), a través de la unión a la proteína microtubular tubulina en la fase M del ciclo celular, lo que impide la formación del huso mitótico, (Adams *et al.*, 1981; González *et al.*, 2002) y por consiguiente, inhibe la proliferación de las células tumorales debido al bloqueo de la mitosis (Brown *et al.*, 1980; Booth, 1994; Jeglum, 1994; González *et al.*, 2002). Por ésto, a estos agentes también se les ha denominado “antimitóticos” (Hadfield *et al.*, 2003). Las células neoplásicas son más sensibles que las células normales a estas drogas, porque se dividen con mayor frecuencia atravesando por una etapa de mayor vulnerabilidad a los venenos antimitóticos (Jordan y Wilson, 2004). Además, se han descrito otros compuestos naturales producidos por plantas y animales y se han encontrado docenas de clases de “venenos anti-huso mitótico” de diversas estructuras, entre los que se destacan los taxanos (derivados naturales de la planta *Taxus brevifolia*), la combrestatina, la dolostatina, entre otros (Wood *et al.*, 2001). Sin embargo, a pesar de que estas drogas tendrían este mecanismo común de acción, la mayoría de los compuestos antitubulínicos no han mostrado un efecto clínico antitumoral (Wood *et al.*, 2001) y los agentes antitubulínicos sintéticos han sido incapaces de producir un mayor éxito clínico (Hadfield *et al.*, 2003).

Las drogas antitubulínicas se han clasificado en dos grupos, según su acción. Un grupo está compuesto por los agentes que inhiben la polimerización de los MT desestabilizándolos e incluye a los VA, las criptoficinas, las halicondrinas, la estramustina, la colchicina y la combretastatina, la Noscapina (Zhou *et al.*, 2003), la maytansina, la rizoxina, las espongistatinas, la podofilotoxina, las esteganacinas, las curacinas (Hamel y Covell, 2002), varios herbicidas (Hoffman y Vaughn, 1994), agentes antifúngicos y antihelmínticos (Lacey y Gill, 1994) y drogas psicoactivas (Cann y Hincan, 1975; Boder, *et al.*, 1983; Lobert *et al.*, 1999). El segundo grupo está compuesto por drogas que estabilizan los MT (Jordan y Wilson, 2004), estimulando la polimerización microtubular, lo que provoca una alteración del equilibrio dinámico normal y la detención de la maquinaria mitótica (Hadfield *et al.*, 2003). Este grupo incluye drogas como el paclitaxel, el docetaxel o taxotere, las epotilonas, la discodermolida, las eleuterobinas, las sarcodictiínas, la laulimalida, el razinalam, además de ciertos esteroides y las poli-isoprenyl benzofenonas

(Jimenez-Barbero, *et al.*, 2002; Jordan, 2002). Actualmente, el uso clínico de agentes anti-tubulínicos está restringido exclusivamente a los VA (VCR, VBL, Vinorelbina) y los taxanos (paclitaxel, docetaxel), mientras que el resto se haya en ensayos clínicos (Hadfield *et al.*, 2003).

Se ha indicado que la VCR también induciría la apoptosis o “muerte programada” de las células de TVT (Torres, 1999), pues se ha observado que luego de la quimioterapia, se produce un incremento en el recuento de células con características apoptóticas en la fase regresiva tumoral (Booth, 1994; Reyes, 2003), como la marginación de la cromatina nuclear, la condensación del núcleo, el recogimiento de citoplasma y cuerpos apoptóticos en espacio extracelular y dentro de células fagocíticas (Reyes, 2004). Existen trabajos que relacionan el efecto pro-apoptótico de la VCR con el cáncer mamario (Aoudjit y Vuori, 2001), el osteosarcoma (Seki *et al.*, 2000) y otros tumores humanos o líneas de células tumorales (Belhoussine *et al.*, 1999) como la leucemia infantil, en la que se describió la activación de las caspasas 9 y 3 (Srivastava *et al.*, 1998; Groninger *et al.*, 2002), que sería regulada a través de la generación temprana de radicales libres (especies reactivas de oxígeno), por lo que estaría implicada la vía mitocondrial o intrínseca del ciclo apoptótico (Groninger *et al.*, 2002). También se ha demostrado que las drogas antitubulínicas inducen en forma alternada y coordinada, ciclos de fosforilación y desfosforilación de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2/Bcl-xL, por medio de una vía kinasa/fosfatasa desconocida (Du, L. *et al.*, 2005), lo que permitiría la expresión de la acción proapoptótica de Bax, que normalmente es inhibida por Bcl-2 (Srivastava *et al.*, 1998). Así, se induciría el cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo la salida de citocromo C y de otros factores proapoptóticos al citoplasma (Du, L. *et al.*, 2005). Otros reportes adicionales demuestran que Bim, de la familia de proteínas proapoptóticas con dominio BH3, también permitiría la actividad de Bax interactuando directamente con Bcl-2, en forma independiente a la actividad de las caspasas (Frisch y Sreaton, 2001). La liberación de Bim, desde los microtúbulos donde esta proteína permanece latente, podría ocurrir a través de la acción de drogas antitubulínicas (Huang y Strasser, 2000; Adams y Cory, 2001; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003; Scorrano y Korsmeyer, 2003; Tsujimoto, 2003).

Por otro lado, se ha sugerido que el proceso apoptótico y el daño del citoesqueleto de tubulina provocada por la VCR (Weinberg, 1996; Torres, 1999) y otros agentes antitubulínicos (Wang *et al.*, 1999) estarían relacionados a través de la anoikis o apoptosis gatillada por la alteración de las relaciones entre célula y matriz extracelular (MEC) (Díaz-

Montero y McIntyre, 2005), porque el daño producido por las drogas antitubulínicas sobre el citoesqueleto alteraría el contorno celular induciendo el inicio del proceso (Wang *et al.*, 1993). También se ha señalado que el citoesqueleto regularía varias señales de sobrevivencia celular, impidiendo la anoikis en células en suspensión, como ocurre en las células neoplásicas durante la metástasis (Frisch y Sreaton, 2001). Sin embargo en un trabajo reciente con células de osteosarcoma humano resistentes a la anoikis, se pudo observar que la apoptosis se desarrollaba normalmente en respuesta a diferentes drogas proapoptóticas, entre las que se incluyeron los VA (Díaz-Montero y McIntyre, 2005). Esto podría indicar que la vía implicada en la apoptosis que se produce por drogas antitubulínicas, no estaría relacionada con la vía por la cual se produce la anoikis, aunque se debe tener en cuenta de que al alterar los MT, se expresan múltiples vías de kinasas que permitirían el progreso de la apoptosis (Du, L. *et al.*, 2005) y muchas de estas vías se expresan durante la anoikis (Frisch y Sreaton, 2001).

Recientemente, se ha descrito otra acción antitumoral de los agentes antitubulínicos, demostrando una actividad antivascular ejercida directamente sobre el endotelio tumoral en proliferación, ocluyendo o destruyendo vasos sanguíneos pre-existentes (Natsume *et al.*, 2003).

2.3 VASCULARIZACION Y NEOPLASIAS

El correcto funcionamiento de los tejidos del organismo requiere un adecuado aporte vascular, organizado a través de un sistema de arterias, capilares y venas. La vascularización o formación de vasos sanguíneos es un proceso complejo que implica la interacción coordinada de múltiples tipos de células y factores moleculares (Sledge y Miller 2002), y que juega un papel decisivo en el desarrollo embrionario y el período postnatal temprano, además del crecimiento longitudinal óseo en niños y adolescentes (Beck y D'Amore 1997; Ferrara 2003). La vascularización, a su vez, comprende dos procesos distintos: por un lado la angiogénesis, que es el desarrollo de nuevos vasos a partir de vasos existentes (Carmeliet 2000) y por otro la vasculogénesis, o formación de vasos sanguíneos en tejidos previamente avasculares (Carmeliet 2000; Nguyen y D'Amore 2001). Estos procesos complejos son sensibles a cualquier tipo de alteración, como durante la embriogénesis, en donde las aberraciones de estos procesos dan lugar a malformaciones vasculares congénitas (Hanahan, 1997), mientras que en los adultos contribuye a muchos

trastornos como la retinopatía diabética, la psoriasis, la artritis reumatoide, la endometriosis, el síndrome del ovario poliquístico y el cáncer (Carmeliet 2003).

La vasculogénesis se produce principalmente en el embrión, pero también está involucrada en la vascularización de algunos tumores sólidos (Jain 2003). La vasculogénesis es iniciada por células madre, conocidas como hemangioblastos, que se diferencian para formar células hematopoyéticas (precursoras de las células sanguíneas) y angioblastos (Risau 1997; Yancopoulos et al., 2000). Los angioblastos son células endoteliales primitivas que experimentan proliferación y diferenciación para formar una red primitiva de vasos sanguíneos, el plexo vascular primario. Esta red se modifica luego mediante recortes y ensanchamiento de los vasos para formar la vasculatura madura con su modelo característico de ramificaciones y vasos interconectados. Este proceso se conoce como remodelación angiogénica y es esencialmente el mismo que el de la angiogénesis (Risau 1997).

La angiogénesis puede ocurrir en ciertos eventos fisiológicos como la formación del lecho vascular que nutre al endometrio, durante el ciclo reproductivo, o en patologías, como la artritis reumatoídea, y el cáncer (Folkman y Shin, 1992). Este proceso se divide principalmente en cuatro fases, que van ocurriendo sucesivamente (Denekamp, 1990), y que incluyen:

1. La digestión de la membrana basal que rodea el vaso por proteasas segregadas por células endoteliales.
2. La migración de células endoteliales circulantes hacia el punto de formación del vaso, en donde proliferan para formar un brote.
3. La posterior proliferación y diferenciación de células endoteliales para alargar el brote y formar el lumen del nuevo vaso.
4. La formación de la membrana basal y la llegada de pericitos y células de músculo liso, células que actúan de soporte. En este paso final, los vasos desarrollan también las características especializadas apropiadas para el tejido o el órgano del que forman parte (Denekamp, 1990).

Este es un proceso multifactorial, debido a la influencia de una serie de moléculas que lo regulan, promoviendo o inhibiendo la respuesta angiogénica (pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, respectivamente). En un tejido normal existe un equilibrio entre estos

factores moleculares, que se pierde frente a ciertas condiciones locales críticas (Hanahan y Weinberg, 2000), como la hipoxia, la hipoglicemia o el bajo pH, el estrés mecánico (por ejemplo, la presión generada por las células en proliferación neoplásica) y las mutaciones genéticas (Carmeliet y Jain, 2000), estableciéndose así un fenotipo de características proangiogénicas, como sucede en las neoplasias (Folkman, 1992; Dameron *et al.*, 1994). Aumenta así la producción de una serie de potentes factores proangiogénicos, entre los que destacan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un fuerte inductor de mitosis específico de las células endoteliales, es sobreexpresado en la mayoría de los tumores (Hanahan y Weinberg, 2000) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Shing *et al.*, 1984). La mayor parte de la investigación en el campo de la angiogénesis tumoral ha sido dirigida hacia el entendimiento de la función de estas moléculas, para el diseño de nuevos tratamientos para el control del cáncer (Brem, 1999).

El trastorno más estudiado en relación a la formación de nueva vasculatura probablemente corresponde al cáncer (Folkman *et al.*, 1990; Sledge y Miller 2002). Las células endoteliales en los tumores están expuestas a un ambiente particular (baja tensión de oxígeno, bajo pH, presencia de citoquinas, y de factores de crecimiento) y se requieren una red sanguínea funcional, que le suministre a las células tumorales oxígeno, nutrientes y que remueva los desechos tóxicos asociados al metabolismo celular. Esta vasculatura puede ser adquirida en parte, a través de los vasos sanguíneos del huésped, pero se ha determinado que los tumores no pueden crecer más allá de un tamaño crítico de aproximadamente 1 mm³, sin desarrollar una red sanguínea que los apoye (Ausprunk *et al.*, 1977; Folkman, 1986; Folkman y Shin, 1992; Hahnfeldt *et al.*, 1999). Es así como, para poder continuar su crecimiento, proliferación y la diseminación mediante metástasis, los tumores generan su propia red de microvasculatura (Vaupel *et al.*, 1989; Denekamp, 1993; Siemann *et al.*, 2004). La neovasculatura va creciendo en forma paralela al desarrollo tumoral y el incremento de la densidad vascular en un tumor ha demostrado ser un factor pronóstico de malignidad importante para neoplasias tales como en cáncer de próstata humano y los tumores mamarios (Rosen, 2000).

2.4 TERAPIA ANTIVASCULAR Y VASCULATURA TUMORAL

Desde hace 150 años que se describen observaciones segun las cuales los tumores sólidos podrían ser afectados y ocasionalmente erradicados dañando la red vascular que los nutre (Siemann *et al.*, 2004). El rol fundamental de la vasculatura tumoral y los efectos de su destrucción selectiva fueron remarcados ya en 1923, cuando Woglom (Woglom, 1923), sugirió que el daño del sistema capilar podría ser la manera mas efectiva de inhibir el crecimiento tumoral (Woglom, 1923).

En años recientes, la posibilidad de controlar el cáncer a través del uso de la red de vasos sanguíneos que dan soporte a los tumores, como blanco terapéutico, ha recibido una gran atención (Jordan y Wilson, 2004). La destrucción de la vasculatura representa un objetivo interesante, ya que es esencial para la supervivencia y el crecimiento del tumor y juega un rol crítico en la sobrevivencia y el continuo desarrollo de las masas tumorales sólidas (Siemann *et al.*, 2004). Este concepto fue introducido por Judah Folkman en 1972, quien identificó la vasculatura como un blanco para la terapia de tumores sólidos, cuando sugirió que los mismos tumores eran los que estimulaban la producción de nuevos vasos sanguíneos para poder subsistir (Folkman, 1972; Hadfield *et al.*, 2003).

Existen dos enfoques de bloqueo de la función vascular (Denekamp, 1993; Folkman, 1995), el más estudiado es la inhibición de la neoformación de vasos sanguíneos dentro del tumor, por lo que la mayor parte de la investigación ha sido dirigida hacia el descubrimiento de agentes que supriman el proceso de angiogénesis o agentes antiangiogénicos (Fan *et al.*, 1995; Hadfield *et al.*, 2003; Jordan y Wilson, 2004). Varias estrategias que han sido probadas incluyen el uso de compuestos que interfieren con la entrega o el envío de estímulos proangiogénicos, anticuerpos que obstaculizan los factores angiogénicos ya liberados e inhibidores de la actividad de los receptores de los factores liberados, consiguiendo de esta manera interrumpir la proliferación de las células endoteliales o la invasión tumoral (Denekamp, 1993; Folkman, 1995).

Por otro lado, a inicios de los `80, Juliana Denekamp comenzó a buscar estrategias terapéuticas que pudieran comprometer selectivamente la función de la vasculatura tumoral

(Denekamp, 1986; Denekamp, 1990; Denekamp, 1993; Siemann *et al.*, 2004), ocluyendo o destruyendo directamente los vasos sanguíneos preexistentes en tumores sólidos, a diferencia de los efectos antiproliferativos de la terapia antiangiogénica (Chaplin y Dougherty, 1999; Denekamp, 1990; Siemann y Rojiani, 2002; Micheletti *et al.*, 2003), causando una rápida detención en la expansión de la vasculatura y estableciendo la detención del flujo sanguíneo y una extensa destrucción tumoral (Parking *et al.*, 2000). Por esta forma de acción directa sobre el endotelio tumoral se diferencian de los agentes antiangiogénicos, y se les ha denominado *Vascular Targeting Agents* (VTA) o agentes dirigidos en contra de la vasculatura tumoral (Siemann *et al.*, 2004). Estos agentes prácticamente no afectan los tejidos normales (Prise *et al.*, 2002) y tampoco presentan los efectos secundarios asociados a la quimioterapia antiproliferativa (Thorpe *et al.*, 2003).

Como el tumor está en constante crecimiento, para poder suplementar las necesidades de la población de células malignas en expansión (Hirst *et al.*, 1982; Denekamp y Hobson, 1984), las células endoteliales de la vasculatura tumoral se vuelven altamente proliferativas (Denekamp y Hobson, 1982) y en algún momento una parte de esta red vascular debería ser muy inmadura, a diferencia de la estabilidad de la vasculatura de los tejidos normales en individuos adultos saludables (Bicknell y Harris, 1992; Eberhard *et al.*, 2000). Esta característica es altamente explotable, desde el punto de vista terapéutico, por una gran parte de los VTA que se han descrito (Siemann *et al.*, 2004). La selectividad se debería a la naturaleza débil y desorganizada del endotelio tumoral, relacionada a la falta de pericitos y de células musculares lisas que habitualmente se presentan en los vasos sanguíneos normales (Tozer *et al.*, 2001), además de diferencias en la arquitectura y composición celular y bioquímica los vasos inmaduros (Grosios *et al.*, 1999). La superficie de las células endoteliales es irregular y altamente reactiva. La capacidad de estas células sanguíneas de suplementar oxígeno, glucosa y otros nutrientes a las células tumorales es menos eficiente que la de los vasos sanguíneos de un tejido normal. Además, los vasos tumorales son delgados o sinusoidales, apenas un poco más que un recubrimiento endotelial apoyado por una membrana basal, propensos a la hemorragia y al desarrollo de trombosis (Bujaski *et al.*, 1989). También contiene vasos sanguíneos que son permeables a macromoléculas (Dvorak *et al.*, 1988), lo cual combinado con un pobre drenaje linfático, puede llevar a un incremento de la presión intersticial causando un empeoramiento adicional de la perfusión tumoral (Vaupel *et al.*, 1989). También se ha sugerido que las células endoteliales inmaduras de los vasos tumorales no tienen un citoesqueleto de actina bien desarrollado, que podría hacerlas más susceptibles al colapso (Davis *et al.*, 2002).

Estudios preclínicos han demostrado que los VTA pueden producir efectos vasculares rápidos y significativos, que una vez iniciados, se extienden produciendo la necrosis dosis dependiente del tumor, en cosa de horas o días. A través de métodos fisiológicos, histológicos/morfológicos e inmunohistoquímicos se ha demostrado la interrupción de la red vascular tumoral, que ha podido ser observada minutos u horas después de realizado el tratamiento (Siemann *et al.*, 2004). Los VTA producen un patrón característico de necrosis después de la administración a ratas y ratones que presentan tumores, causando una extensa necrosis central que puede llegar a extenderse al 95 % del tumor (Huang *et al.*, 1997; Ching *et al.*, 1999).

Se han considerado una serie de ventajas de los VTA sobre otros tipos de terapia anticancerígena (Thorpe *et al.*, 2003):

- Un solo vaso sanguíneo provee nutrición y remueve productos de desecho metabólico de cientos a miles de células tumorales y basta con dañarlo en solo un punto para bloquear el flujo sanguíneo que entra y sale del tumor.
- La muerte de la célula endotelial no es requerida. Un cambio en la forma de la célula endotelial o el inicio de la cascada de la coagulación sanguínea en forma local podría bastar.
- La célula sanguínea esta ubicada en forma adyacente al flujo sanguíneo asegurando una entrega efectiva de la droga (Jordan y Wilson, 2004).
- Como las células endoteliales hacia las cuales se dirige el ataque no son células tumorales sino una célula diploide normal, deberían ser menos susceptibles de desarrollar mutaciones genéticas que la vuelvan resistente a estas drogas que las células tumorales que son genéticamente inestables (Jordan y Wilson, 2004).
- Un marcador alternativo de la actividad biológica, como es el flujo sanguíneo por ejemplo, puede ser sencillamente cuantificado en la clínica.
- Efectos temporales en el cese de la función vascular pueden ser suficientes, pues existen estudios que indican que más del 99% de las células tumorales *in vivo* pueden ser destruídas, durante una isquemia de dos horas de duración (Chaplin y Horsman, 1994).
- Finalmente, a diferencia de los agentes antiangiogénicos, los VTA podrían requerir ser administrados sólo en forma intermitente, para causar un sinergismo con los tratamientos convencionales, en vez de ser administrados en forma crónica, durante meses o años (Siemann *et al.*, 2004).

Un problema observado invariablemente en esos estudios, ha resultado ser una línea de células tumorales viables que permanece en la periferia tumoral (Dark *et al.*, 1997; Lash *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Grosios *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Rojiani *et al.*, 2002; Siemann y Rojiani, 2002). La explicación más aceptada para este hallazgo es que estas células son alimentadas por vasos sanguíneos del tejido normal que rodea al tumor, y no se ven afectadas por la destrucción de los vasos sanguíneos intratumorales (Chaplin *et al.*, 1999; Siemann, 2002), por lo que podrían formar núcleos de rebrote disminuyendo la efectividad de estos agentes a menos que se administren junto a otras terapias, de modo que toda la población de células tumorales sea erradicada completamente (Pedley *et al.*, 2001).

Principalmente se han estudiado dos tipos de VTA para el tratamiento del cáncer: los VTA denominados “biológicos”, que se ligan directamente al endotelio tumoral (Siemann *et al.*, 2004), a través de proteínas como anticuerpos y factores de crecimiento, para entregar toxinas, procoagulantes y efectores proapoptóticos y los VTA tipo “moléculas pequeñas”, entre los que se cuenta el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) y el FAA (*Flavone Acetic Acid*) (Thorpe *et al.*, 2003) y los agentes que se unen a la tubulina (Chaplin y Dougherty, 1999; Halin *et al.*, 2001; Kolonin *et al.*, 2001; Taraboletti y Margosio, 2001), que aprovechan selectivamente las diferencias fisiopatológicas existentes con el endotelio normal para causar una detención aguda del flujo sanguíneo en los tumores (Thorpe *et al.*, 2003), provocando una isquemia artificial que se traduce en la muerte de las células tumorales en forma extensa y que si es prolongada, podría ocasionar la remisión tumoral (Denekamp y Hobson, 1983; Chaplin y Horsman, 1994).

Los VTA “biológicos” se unen a través de moléculas blanco que son expresadas en vasos tumorales al compararlos con vasos de tejido normal, incluyen moléculas asociadas con la angiogénesis y la remodelación vascular (ej.: receptores de VEGF, el dominio ED-B de la fibronectina, la integrina $\alpha_v\beta_3$), moléculas de adhesión celular inducidas por mediadores inflamatorios que son secretadas por las células tumorales y del huésped que infiltran el tumor (ej.: VCAM-1, selectina E) y moléculas asociadas con cambios protrombóticos que ocurren en el endotelio vascular de los tumores (ej.: Fosfatidilserina o PS) (Thorpe *et al.*, 2003; Siemann *et al.*, 2004).

Los VTA “moléculas pequeñas” incluyen principalmente a los flavonoides y a los agentes que depolimerizan la tubulina (Siemann *et al.*, 2004). El Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) interrumpe en la red vascular tumoral, pero su toxicidad en tejidos

normales, impide su uso como agente anticancerígeno en humanos. Una forma de incrementar su selectividad sobre el tejido tumoral, es inducir su producción *in situ* en los tumores. La FAA (*Flavone Acetic Acid*) fue el primer agente en que se reportó esta actividad, causando la interrupción de la vasculatura en dosis cercanas a su dosis máxima tolerada o MTD, pero sólo en células murinas (Thorpe *et al.*, 2003), mientras que el DMXAA (*5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid*) es un análogo que actúa en células humanas (Ching *et al.*, 1999).

Existe mucho interés por los agentes que se unen a la tubulina, como drogas dirigidas selectivamente en contra de la vasculatura tumoral (Baguley *et al.*, 1991), debido a la aparición de estudios que implicaban a colchicinas y VA (VCR y VBL) en la irrupción de la vasculatura en modelos tumorales preclínicos (Ludford, 1945; Hill *et al.*, 1995; Baguley *et al.*, 1991; Chaplin *et al.*, 1999; Thorpe *et al.*, 2003).

Se ha señalado que cuando los agentes VTA son agregados a cultivos de células endoteliales, los MT se depolimerizan rápidamente, y las células se vuelven redondeadas en cosa de minutos, formándose ampollas y soltándose del sustrato, con formación de fibras de stress de actina (presumiblemente como resultado de señales de la depolimerización de los MT del citoesqueleto) y la célula muere sin señales de haber sufrido apoptosis (Kanthou y Tozer, 2002). La cooperación entre los MT y el citoesqueleto de actina es crucial para el control de la forma celular, la adhesión, la contracción y la motilidad celular (Ingber, 2000), por lo que, a través de los VTA, se afectan funciones cruciales para el desarrollo del proceso angiogénico (motilidad, invasión, anclaje, alineamiento, y proliferación) (Belotti *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2001; Taraboletti *et al.*, 2002). Dosis mayores son capaces de dañar otras funciones asociadas con la funcionalidad del citoesqueleto, como la internalización activa de la E-selectina, ELAM-1, en HUVEC (Kuijpers *et al.*, 1994) y la secreción de endotelina-1, en células endoteliales de aorta porcina (Kitazumi *et al.*, 1991; Vacca *et al.*, 1999). Además el cambio de forma de la célula endotelial altera la capa de células endoteliales que rodean los vasos sanguíneos, exponiendo la membrana basal subyacente, lo que estimula la coagulación y la formación de trombos (Micheletti *et al.*, 2003).

Como consecuencia de estas alteraciones se produce a una congestión de los vasos sanguíneos y a una pérdida del flujo sanguíneo (Thorpe *et al.*, 2003). La alteración del flujo sanguíneo, lleva al cese de la suplementación de nutrientes y de la eliminación de desechos, puede haber presencia de hemorragia en los vasos tumorales periféricos, la permeabilidad

vascular aumenta y al interior del tumor, las células mueren por necrosis (Tozer *et al.*, 2002). La caída del flujo sanguíneo ocurre selectivamente en el tumor, con efectos mínimos o inexistentes en tejidos normales (Chaplin *et al.*, 1999; Tozer *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2001; Horsman y Murata, 2003).

Lamentablemente, los VA actúan como VTA en dosis cercanas a la máxima tolerada (*Maximum Tolerated Dose* o MTD) (Ludford, 1945; Baguley *et al.*, 1991; Hill *et al.*, 1995; Chaplin *et al.*, 1999), con excepción de algunos derivados sintéticos de la Vinca, como la Vinflunina (VFL), que han demostrado efectos antivascuales, con dosis muy por debajo de la dosis efectiva (Holwell *et al.*, 2001).

Esta limitación fue superada con el desarrollo de una segunda generación de agentes antitubulínicos que inducen los efectos antivascuales y antitumorales con dosis que están hasta diez veces por debajo del MTD (Dark *et al.*, 1997; Horsman *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Hori *et al.*, 1999; Tozer *et al.*, 1999; Blakey *et al.*, 2002; Siemann y Rojiani 2002; Thorpe *et al.*, 2003; Siemann *et al.*, 2004). El mayor interés se ha centrado en la familia de las Combrestatinas, que también son agentes desestabilizadores de los microtúbulos (Griggs *et al.*, 2001), las que afectan la vasculatura tumoral (Dark *et al.*, 1997; Mooberry *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Griggs *et al.*, 2001) a un 10% de su MTD, a diferencia de la mayoría del resto de los agentes antimetabólicos. La forma soluble, una sal de fosfato disódico (CA-4P), es la más usada en ensayos clínicos y actualmente se haya en ensayos de fase II (Hadfield *et al.*, 2003). La pro-droga ha demostrado producir dichos efectos aproximadamente diez veces por debajo de su MTD, siendo ampliamente mas citotóxica sobre células endoteliales en proliferación que en células endoteliales quiescentes, en estudios *in vitro* (Wilson *et al.*, 1982; Zhao *et al.*, 1999).

Debido a su efecto como VTA, la administración de VCR en TVT, debería producir una diferencia, en relación al grado de vascularidad del estroma tumoral, en las fases progresiva y regresiva del tumor, asociado a un efecto anti-vascular directo de la droga.

La medición de la disminución del flujo sanguíneo intratumoral, a través de la resonancia electromagnética o *Magnetic Resonance Imaging* (MRI), la tomografía de emisión de positrones o *Positron Emission Tomography* (PET) (DelProposto *et al.*, 2002; Galbraith *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2003), la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica (Blakey *et al.*, 2002), se ha usado como un marcador del efecto biológico de

drogas VTA en modelos tumorales preclínicos (Thorpe *et al.*, 2003). El análisis de imagen asistido por un computador ha permitido obtener registros más precisos y rápidos que los recuentos manuales en campos microscópicos, demostrando que es una metodología útil y fácilmente reproducible (Torres, 1999). Este método ha sido aplicado en estudios de cuantificaciones de vascularización neoplásica en tumores mamarios en caninos (Griffey *et al.*, 1998).

En este trabajo se intentará caracterizar de la cinética vascular en el TVT, con la asistencia de un “software” morfométrico, buscando proyectarlo como un modelo neoplásico animal o *in vivo*, para estudios de la angiogénesis o neoformación de vasos sanguíneos.

Así, se estudiará la red vascular del Tumor Venéreo Transmisible (TVT), cuantificada indirectamente a través de la presencia de eritrocitos, y en forma directa a través de los vasos sanguíneos presentes, en las fases progresiva y regresiva inducida por el tratamiento con sulfato de vincristina (VCR).

3. HIPÓTESIS

Existe una disminución del lecho vascular del tumor venéreo transmisible (TVT) en la fase regresiva, asociada al efecto de quimioterapia con vincristina (VCR) sobre las células endoteliales de la red vascular de éste tumor.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Estudiar la cinética de la angiogénesis asociada a las fases de crecimiento tumoral en un modelo oncológico clínico de presentación espontánea en el perro.

4.2 Objetivos Específicos

- Describir las características histológicas del lecho vascular en biopsias de TVT, sometidas a técnicas rutinarias de tinción histológica.
- Medir y comparar el lecho vascular, presente en el estroma del TVT, durante las fases de crecimiento progresivo y regresivo, a través de análisis morfométrico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS:

Se utilizaron biopsias de TVT, procedentes de otra memoria de título (Duarte, 2002). Estas muestras fueron extraídas de tumores de ubicación genital de 10 caninos adultos de entre 1 a 10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, los que fueron diagnosticados clínicamente, biopsiados y tratados mediante quimioterapia en el Servicio de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 1).

5.1.2 TRATAMIENTO:

Los pacientes fueron sometidos a quimioterapia, utilizando VCR (Vincristina Sulfato^R Pharmachemie B.D. Holland), en dosis única de 0,03 mg/kg, diluida en agua bidestilada, administrada vía endovenosa, para inducir regresión tumoral (Lombardi, 1995).

5.1.3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS:

Se realizaron las tinciones de Hematoxilina/Eosina, Papanicolau, ácido periódico de Schiff y van Gieson (López *et al.*, 1985).

5.1.4 EQUIPO:

Micrótomo de rotación, videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetics, USA), microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600) y computador, con “software” morfométrico integrado (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRA:

Se obtuvieron biopsias tumorales de todos los pacientes, antes y siete días después del tratamiento quimioterápico con VCR, fijándolas en formalina, para luego ser procesadas para el estudio histológico descriptivo y morfométrico en T.V.T progresivo y regresivo.

5.2.2 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO:

El diagnóstico de T.V.T se confirmó mediante extendidos celulares sobre portaobjetos, 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 (Duarte, 2002).

5.2.3 BIOPSIAS TUMORALES:

Se obtuvieron muestras de tejido neoplásico, mediante biopsias de todos los individuos, antes y siete días después de la quimioterapia, las que se fijaron en formalina al 10% por 24 hrs (Duarte, 2002). Éstas se procesaron de acuerdo a las técnicas convencionales para tejidos incluidos en parafina (Lopez *et al*, 1985), obteniendo cinco cortes seriados de 5 µm de grosor, con micrótomo de rotación. Los cortes seriados obtenidos, fueron sometidos a tinciones con Hematoxilina/Eosina, Papanicolau, PAS y van Gieson.

5.2.4 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Una vez teñidas los frotis y las biopsias se estudiaron las características citológicas, histopatológicas y vasculares del TVT, en fase progresiva y regresiva, y se compararon las características obtenidas con las diferentes tinciones realizadas en las muestras. Se obtuvo la sumatoria del número de todos los vasos presentes y se midió el diámetro que éstos presentaban en μm , tanto para fase progresiva como regresiva inducida por tratamiento con VCR, comparándolas por medio de análisis estadístico. Por otra parte, se seleccionó la técnica Papanicolau (Pap) como el método más adecuado para el estudio morfométrico, debido a la clara diferenciación obtenida de la tinción de los glóbulos rojos con un color anaranjado brillante (Figuras 1a y 1b).

Para comparar el lecho vascular de las muestras en estudio, se realizó el análisis morfométrico de eritrocitos y de vasos sanguíneos presentes, en biopsias de fases progresiva y regresiva del TVT. Se digitalizaron las imágenes de 5 campos de 200X elegidos al azar dentro de cada caso, con una resolución de 512 X 480 pixeles, mediante una videocámara digital, montada en un microscopio óptico científico, y conectada a un computador al que se le había incorporado el “software” morfométrico. De este modo, se marcó y midió, en micrómetros cuadrados (μm^2), el área total abarcada por los eritrocitos y por los vasos sanguíneos, ubicados en el interior de cada uno de los cinco campos para cada caso, en fase tumoral progresiva y regresiva.

Así, como una forma indirecta de estimación del grado de vascularización del tejido tumoral, una vez determinada el área ocupada por los eritrocitos, se obtuvo la sumatoria de los cinco campos para cada uno de los casos y luego, la sumatoria de todos los casos para cada fase tumoral, para estimar, mediante análisis estadístico, la variación que presentaba el área total ocupada por eritrocitos en cada caso, antes y después de instaurada la fase regresiva tumoral. Los valores de área en cada campo fueron determinados mediante el reconocimiento morfométrico computacional de los eritrocitos presentes, a través del programa ImageProPlus y con ayuda de tinción de Papanicoloau, en que los eritrocitos se tiñen específicamente de un color anaranjado característico (Figuras 1a y 1b), logrando así ser registrados por el software morfométrico.

Figura 1a

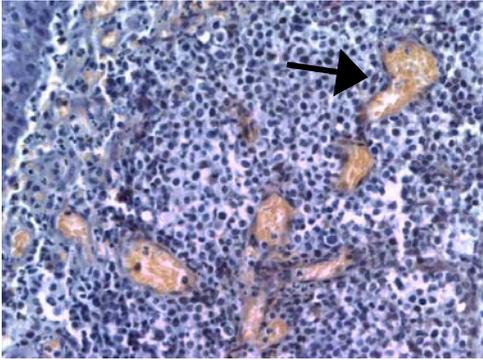


Figura 1b

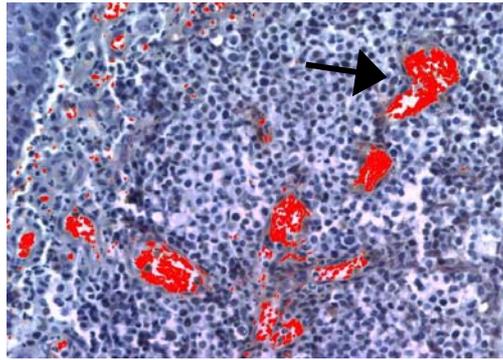


Figura 1a y 1b, TVT progresivo, tinción Papanicolau, 200X. Demostración del reconocimiento de los eritrocitos en un campo.

Por otro lado, como una de estimación más directa del grado de vascularización del tejido tumoral, se estudió el área ocupada directamente por vasos sanguíneos visibles en los campos de TVT, de fase progresiva y regresiva. Se obtuvo la sumatoria de los cinco campos para cada uno de los casos y luego, la sumatoria de todos los casos, para cada fase tumoral, con el fin de compararlos mediante análisis estadístico y estimar la variación que presentaba el área total ocupada por los vasos sanguíneos en cada caso, antes y después de instaurada la fase regresiva tumoral mediante la aplicación de tratamiento quimioterápico con VCR. Los valores se determinaron mediante medición en μm^2 del área ocupada por los vasos sanguíneos intratumorales presentes, con ayuda del programa morfométrico computacional ImageProPlus®. Los vasos sanguíneos fueron previamente marcados, en forma manual, con ayuda del programa AdobePhotoShop® (Figuras 2a y 2b).

Figura 2a

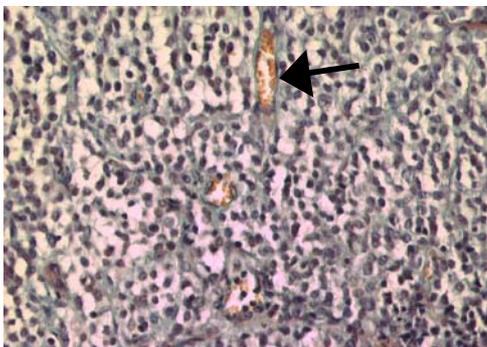


Figura 2b

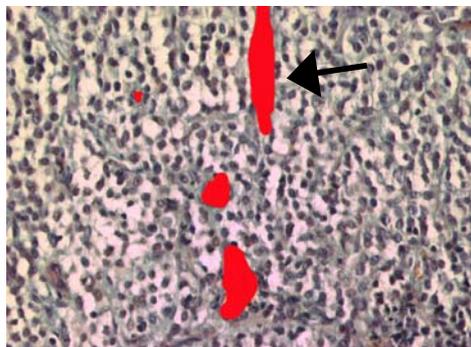


Figura 2a y 2b, TVT progresivo, tinción Papanicolau, 200X. Vasos sanguíneos marcados manualmente con ayuda del programa AdobePhotoShop®.

Finalmente, se dividió el área vascular total de cada uno de los casos por el número de vasos sanguíneos presentes en los cinco campos correspondientes, con el fin de estimar si existían diferencias en el área ocupada en promedio por los vasos sanguíneos presentes en cada fase de crecimiento tumoral.

5.2.5 ANALISIS ESTADÍSTICO:

La variación que presentaba el diámetro de los vasos sanguíneos, en fase progresiva y regresiva tumoral, fue estimada a través de la prueba de χ^2 (Snedecor y Cochran, 1980). Los valores del número total de vasos sanguíneos presentes, de las sumatorias de las áreas ocupadas por eritrocitos y por vasos sanguíneos, y de los productos de las áreas vasculares por el número de vasos presentes, fueron comparados en relación a las fases tumorales (progresiva y regresiva), mediante el empleo de pruebas de t para muestras asociadas, suponiendo varianzas iguales (Snedecor y Cochran, 1980), para determinar si las diferencias en la estimación del lecho vascular eran estadísticamente significativas.

6. RESULTADOS

6.1 ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL TVT.

6.1.1 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DEL TVT.

Al examen citológico, todos los casos estudiados mostraron un fondo hemorrágico con presencia de numerosas células neoplásicas exfoliadas individualmente, de forma redondeada u ovalada, con grandes núcleos redondos de tamaño diferente, nucleolos centrales prominentes, escaso citoplasma y presencia de figuras mitóticas. Además, se observó la existencia de infiltración leucocitaria, donde predominaban linfocitos y neutrófilos.

A través del examen microscópico de cortes histológicos de TVT se observó, en preparaciones de tumores sin tratamiento, un tejido homogéneo, compuesto de células neoplásicas similares a las observadas al examen citológico, de gran tamaño, redondas o poliédricas, uniformes, ordenadas en masas compactas, interconectadas con un delgado

estroma fibrovascular, que permitía que las células se dispusieran en racimos o cordones, confiriéndole un aspecto lobulillado al tejido tumoral.

El núcleo de las células tumorales se observó grande, redondo, hipercromático, con bordes bien delimitados; también se observó la presencia de numerosas figuras mitóticas y de nucleolos, únicos, prominentes, de ubicación central o excéntrica. El citoplasma tumoral era escaso, eosinofílico, con abundantes gránulos intracitoplasmáticos y con márgenes poco definidos.

En el estroma tumoral se presentó una escasa infiltración leucocitaria, destacándose la presencia de polimorfonucleares neutrófilos, células plasmáticas y, en menor medida, macrófagos y linfocitos, además de la presencia de fibras de colágeno, rodeando masas de células tumorales, y una baja cantidad de fibroblastos. También fue posible apreciar alteraciones asociadas a la ulceración e inflamación secundarias en la mucosa.

Luego del tratamiento quimioterápico, en los cortes histológicos de las muestras de TVT en fase de remisión, las células tumorales viables eran escasas, de menor volumen, con núcleos más intensamente teñidos con H-E y dispuestas en grupos pequeños, muchas de ellas con cambios degenerativos. En algunas células neoplásicas se observaron cambios apoptóticos, presentando la cromatina nuclear marginada, con núcleos condensados, junto a un encogimiento citoplasmático, indicado por un claro espacio rodeando a la célula. Se observó una disminución en la frecuencia de figuras mitóticas y en el diámetro de núcleos y nucleolos. La matriz extracelular era más abundante y el tejido neoplásico fue reemplazado por tejido conectivo grueso (fibrosis) en la periferia del tumor. También se apreció una densa infiltración de células leucocitarias, asociadas a grupos de células tumorales en degeneración o apoptosis, entre los que se hallaban una gran cantidad de linfocitos con PMN neutrófilos, eosinófilos, macrófagos en escasa cantidad, y células plasmáticas.

6.1.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL LECHO VASCULAR DEL TVT.

Previo al tratamiento con VCR, en cortes teñidos con Pap, H-E, PAS y van Gieson, se observó la presencia de abundantes vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos

correspondían, principalmente a vasos de pequeño y de mediano calibre, ubicados entre las células tumorales, en el estroma, correspondiendo principalmente a arteriolas, metarteriolas, vénulas, venas de pequeño calibre y capilares, sin un claro predominio de uno sobre otro. En algunos casos, se observó amplias zonas de hemorragia en el tejido tumoral.

La pared de las arteriolas presentaba una a dos capas de tejido muscular liso, que por medio de la tinción Pap, se observaron de diferentes tonalidades, desde un color verde azulado claro o rosado. En general, estos vasos se observaron dilatados, conteniendo una gran cantidad de glóbulos rojos en su interior, que teñían de un color anaranjado con Pap (Figura 3).

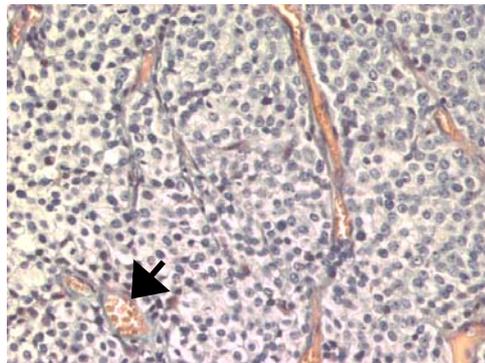


Figura 3, TVT progresivo, tinción Papanicolau, 200X.
Demostración de vaso sanguíneo conteniendo eritrocitos de color anaranjado.

La cantidad de vasos sanguíneos y de eritrocitos presentes en el lecho vascular, en las muestras, luego del tratamiento con una dosis de VCR, fueron notoriamente menores que en las muestras tomadas previamente (la mayoría de estos vasos no se encontraron distendidos y la presencia de glóbulos rojos en su interior era escasa (Figura 4). Figura 4).

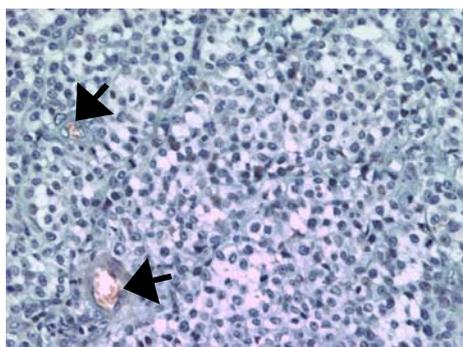


Figura 4, TVT regresivo, tinción Papanicolau, 200X.

Escasos vasos sanguíneos conteniendo eritrocitos.

Se obtuvo la sumatoria total del número de vasos presentes en los campos de estudio de cada uno de los casos, tanto para fase progresiva como regresiva, encontrando que en la mayoría de los casos disminuía el número de vasos presentes, luego de instaurada la fase regresiva después del tratamiento con VCR. En la tabla 1 se resume los datos del número de vasos sanguíneos, para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral, en donde se aprecia una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de los casos en fase progresiva es mayor, con un valor de $21,30 \pm 9,30 \mu\text{m}^2$ en comparación con un $8,90 \pm 4,84 \mu\text{m}^2$, obtenido para la fase regresiva.

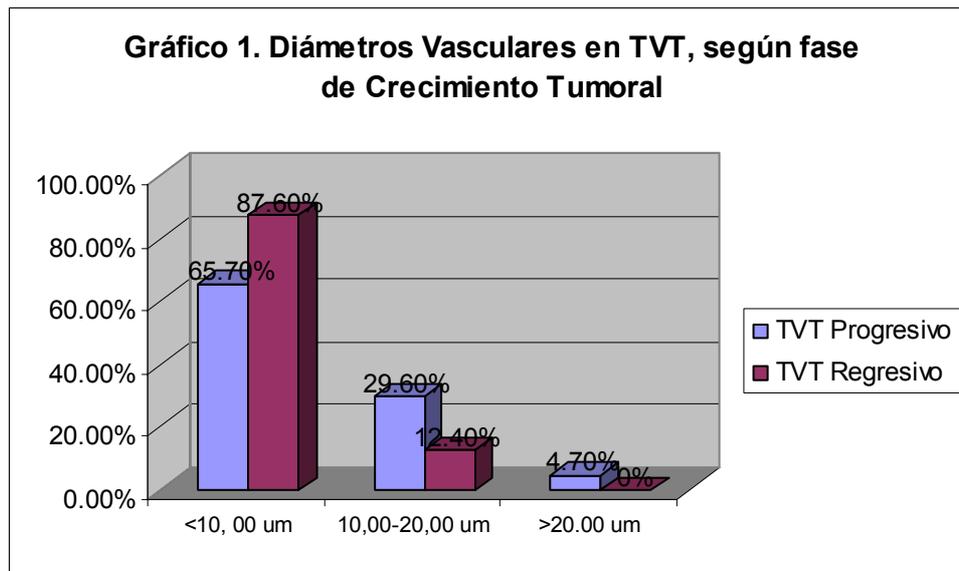
Tabla 1. Número total de vasos sanguíneos presentes en cinco campos de 200X de TVT canino, para cada caso según fase de crecimiento tumoral.		
CASO	FASE CRECIMIENTO TUMORAL	
	PROGRESIVO	REGRESIVO
1	24	8
2	8	2
3	23	12
4	20	14
5	36	8
6	8	13
7	30	7
8	30	12
9	19	13
10	15	0
PROMEDIO	21,30^a	8,90^b
SD	9,30	4,84

a y b representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Paralelamente, se obtuvo el diámetro de todos los vasos presentes en ambas fases, en μm . Los valores obtenidos están representados en el Anexo 2. Éstos se distribuyeron entre los 1,67 μm y los 36,62 μm . Basándose en estos valores, los diámetros se agruparon en tres clases: los diámetros menores a 10,00 μm , los ubicados entre 10,00 y 20,00 μm y los mayores a 20,00 μm . La distribución de los diámetros en estas clases esta resumida en la tabla 2. En ésta se observa que los vasos sanguíneos predominantes, en ambas fases tumorales, correspondieron principalmente a los de calibre menor a 10,00 μm . La mayor variación entre las fases tumorales del TVT, se aprecia en los vasos con calibres menores a 10,00 μm y entre 10,00 a 20,00 μm , aumentando y disminuyendo, respectivamente su proporción en fase regresiva, con respecto a la fase progresiva. La variación del diámetro de los vasos sanguíneos entre ambas fases tumorales, fue analizada por medio de la prueba de χ^2 (Anexo 3), encontrando la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para cada rango. En el gráfico 1 se representa la proporción (%) de los vasos en cada fase tumoral, según el calibre.

Tabla 2. Distribución de vasos sanguíneos, según diámetro, presentes en fase progresiva y regresiva de TVT.					
FASE TUMORAL	Rangos	DIÁMETRO			TOTAL
		<10,00μm	10,00-20,00μm	20,00>	
PROGRESIVA	Nº Total de vasos	140*	63*	10*	213
	Porcentaje (%)	65,7%	29,6%	4,7%	100%
REGRESIVA	Nº Total de vasos	78*	11*	0*	89
	Porcentaje (%)	87,60%	12,40%	0%	100%

** Representa diferencias significativas con respecto a la fase progresiva ($p < 0.05$).*



6.2 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

6.2.1 ESTIMACIÓN DEL GRADO DE VASCULARIZACIÓN DEL TVT A TRAVÉS DE LA DETECCIÓN DE ERITROCITOS.

Como una estimación indirecta del grado de vascularización del tejido tumoral, se determinó el área ocupada por los eritrocitos presentes en cinco campos de 200X de TVT, en cada uno de los casos estudiados, tanto para la fase progresiva de crecimiento tumoral, como luego de iniciada la regresión mediante la aplicación de tratamiento quimioterápico con VCR. Posteriormente, se obtuvo la sumatoria de los cinco campos para cada uno de los casos y la sumatoria total de todos los casos para cada fase tumoral, con el fin de compararlos y estimar la variación que presentaba el área total ocupada por eritrocitos en cada caso, antes y después de instaurada la fase regresiva tumoral, mediante el análisis estadístico con prueba de *t*, suponiendo varianzas iguales.

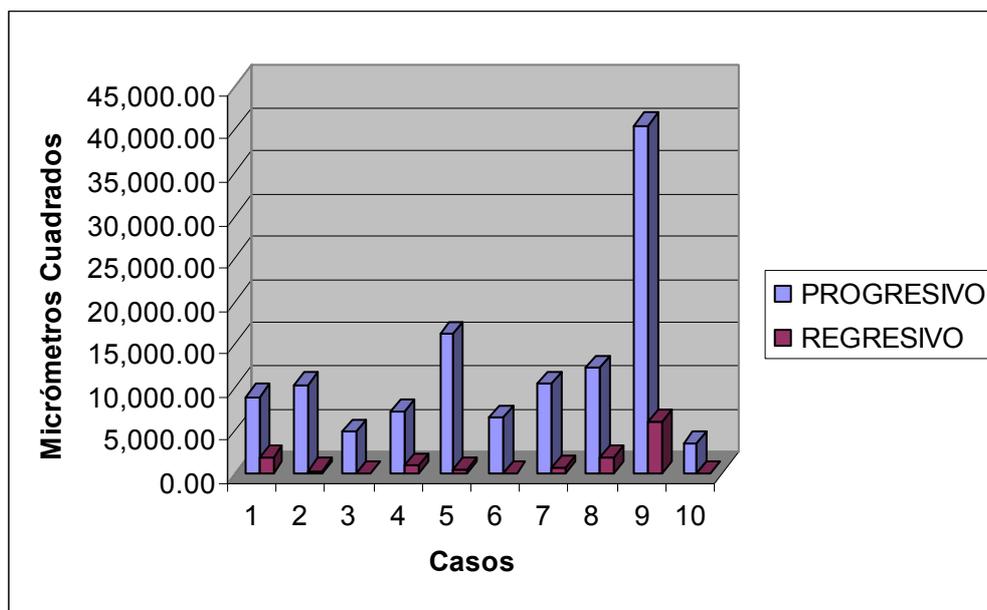
En la tabla 3 se resumen los datos de las sumatorias de las áreas ocupadas por eritrocitos (μm^2) de cinco campos de 200X, para cada caso de TVT canino, donde se observa que el promedio total de los casos en fase progresiva es significativamente mayor ($p < 0.05$), con un valor de $12.062,11 \pm 10.671,13 \mu\text{m}^2$ en comparación con $1.199,87 \pm 1.850,09 \mu\text{m}^2$, obtenido para la fase regresiva.

Tabla 3. Distribución de los sumatorias de las áreas ocupadas por eritrocitos (μm^2) en cinco campos de 200X, para para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral.		
CASO	FASE CRECIMIENTO TUMORAL	
	PROGRESIVO	REGRESIVO
1	8.903,23	1.868,35
2	10.317,44	315,70
3	4.831,75	34,40
4	7.109,08	918,10
5	16.304,22	398,16
6	6.485,44	0,00
7	10.393,72	576,18
8	12.226,21	1.802,82
9	40.526,35	6.085,01
10	3.523,65	0,00
PROMEDIO	12.062,11^a	1.199,87^b
DS	10.671,13	1.850,09

a y b representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el gráfico 2 se observa que en cada uno de los diez casos estudiados, las sumatorias de área ocupada por eritrocitos en los cinco campos (200X) son mayores en los casos de TVT progresivo, previo al tratamiento, en comparación con las de fase regresiva inducida con VCR. En la fase regresiva de los casos 6 y 10, no se observó la presencia de eritrocitos.

Gráfico 2. Sumatorias de las áreas ocupadas por eritrocitos (μm^2) en 5 campos de 200X, para cada caso de TVT según fase de crecimiento tumoral.



6.2.2 ESTIMACIÓN DEL GRADO DE VASCULARIZACIÓN DEL TVT A TRAVÉS DEL ÁREA VASCULAR TOTAL Y EL ÁREA PROMEDIO OCUPADA POR LOS VASOS INTRATUMORALES.

Por otro lado, como una forma más directa de estimación del grado de vascularización del tejido tumoral, se determinó el área total ocupada por vasos sanguíneos de diferente tipo presentes en cinco campos de 200X de TVT, para cada uno de los casos estudiados, tanto en fase progresiva de crecimiento como luego de iniciada la regresión mediante la aplicación de tratamiento quimioterápico con VCR. Posteriormente se obtuvo la sumatoria de los cinco campos para cada uno de los casos y la sumatoria total de todos los casos en cada fase tumoral, con el fin de compararlos y estimar la variación que presentaba el área total ocupada por vasos sanguíneos en cada caso, antes y después de instaurada la fase regresiva tumoral mediante el análisis estadístico con prueba de *t*, suponiendo varianzas iguales.

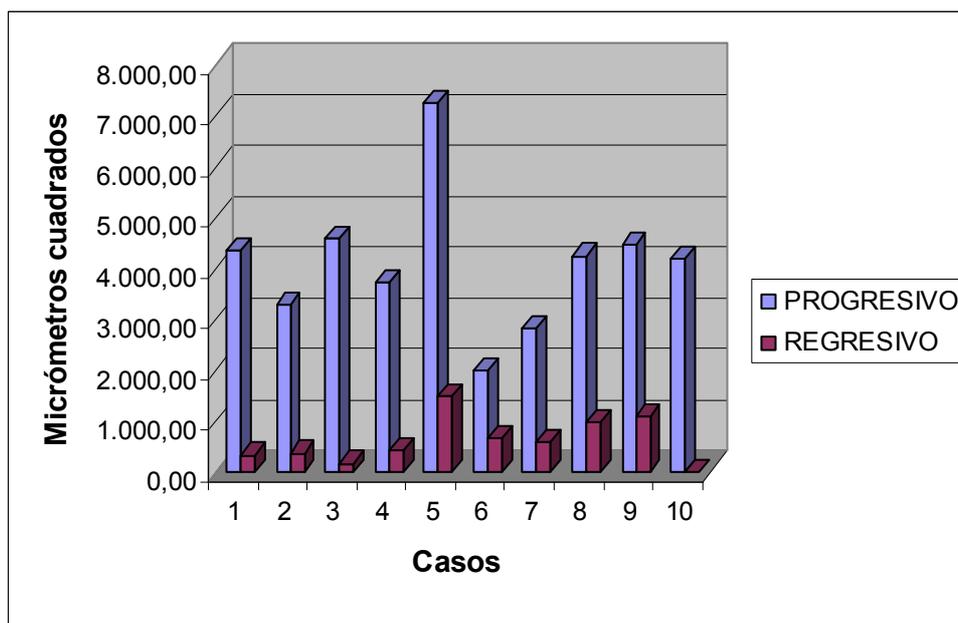
En la tabla 4 se resumen los datos de las sumatorias de las áreas ocupadas por los vasos sanguíneos intratumorales (μm^2) en cinco campos (200X) de para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral. El promedio total de los casos en fase progresiva es significativamente mayor ($p < 0.05$), con un valor de $4.096,55 \pm 1.391,80 \mu\text{m}^2$ en comparación con un $616,42 \pm 459,71 \mu\text{m}^2$, obtenido para la fase regresiva.

Tabla 4. Distribución de la sumatoria de las áreas de cinco campos de 200X ocupadas por los vasos sanguíneos intratumorales (μm^2), para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral.		
CASO	FASE CRECIMIENTO TUMORAL	
	PROGRESIVO	REGRESIVO
1	4.355,90	332,59
2	3.297,32	372,01
3	4.593,75	178,66
4	3.712,78	448,38
5	7.269,35	1.504,83
6	1.993,00	671,01
7	2.808,23	574,17
8	4.254,05	982,67
9	4.478,69	1.099,86
10	4.202,40	0,00
PROMEDIO	4.096,55^a	616,42^b
DS	1.391,80	459,71

a y b representan e diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el gráfico 3 se observa que en cada uno de los diez casos estudiados, las sumatorias de los cinco campos (200X) de área ocupada por los vasos sanguíneos intratumorales son mayores en los casos de TVT progresivo, previo al tratamiento con VCR, en comparación con los casos correspondientes en fase regresiva inducida con VCR. En el caso 10 no se observó la presencia de vasos sanguíneos en el parénquima tumoral.

Gráfico 3. Sumatorias de las áreas ocupados por vasos sanguíneos intratumorales (μm^2) en 5 campos de 200X para cada caso de TVT, según fase de crecimiento tumoral.



En seguida, para poder estimar si existían diferencias asociadas al área promedio ocupada por los vasos sanguíneos presentes en cada fase de crecimiento tumoral, se calculó el área vascular promedio, producto de la división del área vascular total de cada uno de los casos por el número de vasos sanguíneos correspondientes, como se demuestra en la tabla 5. En esta tabla se resume la distribución de los productos obtenidos. En la mayoría de los casos la división obtenida en ambas fases es significativamente diferente, con excepción de los individuos 5 y 7, en que la diferencia tiende a ser menor. Además se observa que, en relación al promedio de estos productos, los vasos de la fase progresiva ocupan, en promedio, un área mayor, con un valor de $218.14 \pm 86.35 \mu\text{m}^2$ en comparación con un $76.27 \pm 65.01 \mu\text{m}^2$, obtenido para los de fase regresiva, confirmando estadísticamente la existencia de una diferencia significativa ($p < 0.05$).

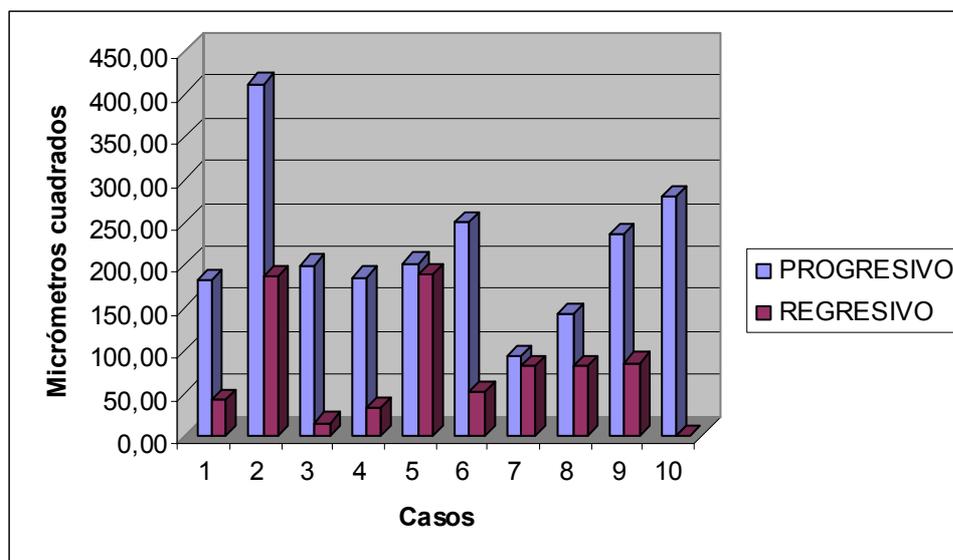
Tabla 5. Distribución de las áreas vasculares promedio, correspondientes al producto de las áreas vasculares totales (μm^2) por el número de vasos sanguíneos intratumorales, para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral.

CASO	Fase Progresiva			Fase Regresiva		
	Área Total	Nº Vasos	Area Vascular Promedio	Área Total	Nº Vasos	Area Vascular Promedio
1	4.355,90	24	181,50	332,59	8	41,57
2	3.297,32	8	412,17	372,01	2	186,01
3	4.593,75	23	199,73	178,66	12	14,88
4	3.712,78	20	185,64	448,38	14	32,03
5	7.269,35	36	201,93	1.504,83	8	188,1
6	1.993,00	8	249,13	671,01	13	51,62
7	2.808,23	30	93,61	574,17	7	82,02
8	4.254,05	30	141,8	982,67	12	81,89
9	4.478,69	19	235,72	1.099,86	13	84,61
10	4.202,40	15	280,16	0,00	0	0,00
PROMEDIO			218,14^a			76,27^b
DS			86,35			65,01

a y b representan e diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

En el gráfico 4 se observa que, en la mayoría de los casos estudiados, el producto de las áreas vasculares totales (μm^2) por el número de vasos sanguíneos intratumorales, es mayor en los casos de TVT progresivo, previo al tratamiento con VCR, en comparación con los casos correspondientes en fase regresiva inducida con VCR.

Gráfico 4. Productos de las áreas vasculares totales (μm^2) por el número de vasos sanguíneos intratumorales, para cada caso de TVT canino, según fase de crecimiento tumoral.



7. DISCUSIÓN

7.1 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE T.V.T. EN FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA

Las muestras citológicas de los frotis de Tumor Venéreo Transmisible de la etapa progresiva, anterior al tratamiento quimioterapéutico, eran bastante homogéneas y con gran cantidad de células tumorales. La tinción realizada con Giemsa en general diferenció bien las células de TVT, confirmando lo descrito por Booth (1994), Rogers (1997) y Torres (2000) respecto a que el examen citológico es una buena técnica para la identificación de este tumor, siendo un método no invasivo, rápido, de bajo costo y eficaz. La morfología de las células tumorales observada en este estudio, se caracterizó por la presencia de células tumorales de gran tamaño, forma redondeada u ovalada, exfoliadas, con grandes núcleos redondos excéntricos, citoplasma escaso con múltiples vacuolas y presencia de muchas de células en mitosis. Se observaron además, células leucocitarias como polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Esto es compatible con la descrita en diversos estudios realizados en las últimas décadas (Weir 1978; Yang 1987; Booth 1994; Wellman, 1996; Torres, 2000).

En los frotis estudiados de la etapa regresiva, se observó una marcada disminución de las células tumorales, las que generalmente presentaban tamaño y morfología irregular, y muchas de ellas con signos degenerativos producidos probablemente, por la toxicidad a la VCR, lo que coincide con lo descrito por Lombardi (1995).

Las características histopatológicas observadas para la fase progresiva del TVT, corresponden a un tejido tumoral, formado por masas de células neoplásicas rodeadas de finas bandas de tejido conectivo y abundante vascularización, con una escasa infiltración de células leucocitarias, entre las cuales predominan los linfocitos. Estos hallazgos son coincidentes con lo descrito por diferentes autores, como Lombardi (1995), Mozos *et al.*, (1996), Rogers (1997), González *et al.*, (2000), Duarte (2002), Reyes (2004) y Nuñez (2005). La presencia de otras células leucocitarias como neutrófilos, eosinófilos y monocitos, podría ser atribuida a una respuesta inespecífica ante la neoplasia o a una contaminación bacteriana posterior a la formación de úlceras del tumor. En cambio, la

presencia de los linfocitos se debería a una respuesta inmune específica, que concuerda con lo descrito en los estudios de inmunología anti neoplásica (Taussing, 1989; Perussia, 1992).

En cortes histológicos de TVT en fase regresiva obtenida por VCR, los resultados histopatológicos descritos son similares a lo observado por Duarte (2002), quien describió que las células tumorales estaban dispuestas en pequeños grupos, muchas de las cuales estaban en distintos grados de procesos degenerativos o apoptóticos.

En esta etapa también se observó un aumento de todas las células leucocitarias, con un mayor aumento de los linfocitos. Esto concuerda con lo descrito por Yang *et al.* (1976), Chandler y Yang (1981), Harding y Yang (1980), Hill *et al.* (1984), quienes relacionaron la etapa regresiva, de tumores experimentales, con una fuerte infiltración de células leucocitarias, especialmente de linfocitos.

Además de las células tumorales y leucocitarias, se apreció una gran cantidad de fibroblastos asociados a fibras de colágeno, rodeando a las células tumorales. Esta proliferación de colágeno, es comparable a la descrita por Hill *et al.* (1984) en tumores experimentales y por Lombardi (1995), y Duarte (2002) en TVT regresivos tratados con VCR.

7.2 CARACTERÍSTICAS VASCULARES Y CUANTIFICACIÓN DEL LECHO VASCULAR DEL TVT, EN FASE PROGRESIVA Y REGRESIVA.

El estroma tumoral del TVT en etapa progresiva se observó muy vascularizado, coincidiendo con lo descrito por Rogers (1997), González *et al.* (2000) y Tella *et al.* (2004). Histológicamente, los vasos observados correspondían a vasos de calibre pequeño, coincidiendo con lo observado por Ramos (2004), quién analizó el área endotelial del TVT mediante técnica inmunohistoquímica, utilizando como marcador de células endoteliales anticuerpos contra el factor de von Willebrand.

Luego del tratamiento con una dosis de VCR, el número de vasos presentes, detectables mediante las técnicas de tinción histológicas ocupadas (Pap, H-E, vG y PAS), mostraron una estadísticamente significativa ($p < 0.05$), lo que coincidió con lo observado por Ramos (2004) y Jana (2005), que registraron, mediante técnicas inmunohistoquímicas,

una disminución del endotelio presente en muestras de TVT canino en fase regresiva inducida por tratamiento con Dexametasona.

Luego, se midió, mediante análisis morfométrico, el área ocupada por los eritrocitos y los vasos sanguíneos presentes, confirmando así que existía una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$), para ambos análisis, durante la fase regresiva inducida por tratamiento con VCR. Esto concuerda, además, con el aspecto macroscópico que presentaron los tumores terminado el tratamiento, los que se observaron más pálidos y menos hemorrágicos que al inicio del tratamiento.

Por otra parte, la morfología histológica de vasos sanguíneos presentes fue similar a la observada previo al tratamiento, aunque la mayoría de los vasos no se encontraban distendidos y la presencia de glóbulos rojos en su interior era escasa, coincidiendo con lo observado en el estudio morfométrico de los eritrocitos presentes en ambas fases tumorales. Esto podría explicar por qué la presencia de vasos de calibre mayor a 20 μm experimentó una reducción, estadísticamente significativa ($p < 0.05$), durante la fase regresiva inducida con VCR. Esto se comprobó al comparar los tipos de vasos presentes en ambas fases, a través del promedio del área obtenida en el estudio morfométrico por el número de vasos presentes, observando un predominio significativo ($p < 0.05$) de los vasos de menor área, durante la fase regresiva.

La falta de dilatación demostrada por los vasos sanguíneos podría estar asociada al colapso del parénquima tumoral descrito por Mukaratirwa y Gruys (2004), en donde se describe el reemplazo del tejido tumoral por estroma fibroso. Este tejido ejercería un efecto mecánico, aumentando la presión sobre el lumen de los vasos presentes, colapsándolos; esto, además, podría explicar en parte la disminución de glóbulos rojos presentes en los cortes regresivos, pues el colapso de los vasos dificultaría la irrigación sanguínea de la masa tumoral.

El tratamiento con VCR también podría estar relacionado con la disminución de células eritrocitarias en el tumor, debido a que la presencia de eritrocitos está directamente relacionada con la existencia de vasos sanguíneos funcionales que sean capaces de transportarlos hacia los tejidos tumorales, con el fin de suplementar los altos requerimientos metabólicos que exhiben las células neoplásicas (Folkman y Shin, 1992). Así, en los estudios realizados por Ramos (2004) y Jana (2005) con Dexametasona, ésta se describe

como un agente antiangiogénico que afecta directamente la formación de nueva vasculatura tumoral, a través de la inhibición de la angiogénesis tumoral (Folkman e Ingber, 1987) y del efecto pro-apoptótico de la dexametasona sobre las células endoteliales (Lansink *et al.*, 1998), lo que habría impedido la llegada de eritrocitos al estroma tumoral.

Del mismo modo, se ha descrito en la literatura un efecto antivascular relacionado a la VCR y a los agentes antitubulínicos, mediante el cual estas drogas se unirían a los microtúbulos de las células endoteliales tumorales en proliferación, en forma selectiva, deteniendo el ciclo celular, impidiendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos (Hayot *et al.*, 2002; Thorpe *et al.*, 2003; Bayless y Davis, 2004). Esta selectividad se debería a que generalmente las células que conforman los vasos sanguíneos del resto del organismo permanecen quiescentes (detenidos en fase G0) y por lo tanto, no se dividen y así no son sensibles al efecto de la VCR (Friedlander, 1995; Strauss, 2001). Además, los vasos de la vasculatura normal son maduros y no presentan las características que hacen susceptibles a los vasos tumorales, como la falta de pericitos (Tozer *et al.*, 2001), diferencias en la arquitectura y composición celular y bioquímica los vasos inmaduros (Grosios *et al.*, 1999) entre otras (Dvorak *et al.*, 1988; Bujaski *et al.*, 1989; Vaupel *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 2002).

Además, el efecto pro-apoptótico de la VCR sobre las células tumorales, descrito por Reyes (2003), también podría impedir la producción de importantes factores pro-angiogénicos tumorales, como el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) (Wang *et al.*, 1995; Strauss, 2001) y el VEGF (Dong *et al.*, 2004), impidiendo su liberación, lo que induciría una detención del desarrollo de la angiogénesis y de la vascularización tumoral, como ha sido expuesto por Hanahan y Folkman (1996) y Jung *et al.* (2002).

Por otra parte, los resultados obtenidos no coincidirían con lo que se esperaría para el efecto antivascular descrito para la VCR, debido a que la acción de las drogas antitubulínicas se produciría, precisamente, sobre los vasos de menor calibre, como capilares y vasos angiogénicos (Bayless y Davis, 2004), y no sobre los de mayor tamaño, que corresponderían a la población de vasos sanguíneos más maduros, que son menos susceptibles al efecto antimitótico de las drogas antimicrotubulares (Halfield *et al.*, 2003). Además, a través del bloqueo indirecto de la angiogénesis, promovido por la destrucción de las células tumorales (Hanahan y Folkman, 1996), también se fomentaría una disminución del recuento de vasos de pequeño calibre, contrario a lo detectado en el estudio morfométrico.

Esta discrepancia tal vez podría ser atribuída al hecho que, al no existir capilares ni neovasculatura para transportar el lecho vascular hacia el tumor, el colapso de los vasos de mayor tamaño, no habría permitido su evaluación mediante las técnicas empleadas. Además, los vasos observados en los cortes histopatológicos de TVT regresivo podrían corresponder, en parte, a vasos extratumorales provenientes de tejidos del huésped, debido a que el colapso del parénquima tumoral descrito por Mukaratirwa y Gruys (2004) para la fase regresiva, produciría una retracción de la masa tumoral, lo que podría promover la combinación de tejidos tumorales y del hospedero, generando la aparición de vasos sanguíneos extratumorales en las muestras regresivas. Así mismo, en las muestras de tejido tumoral en fase regresiva solo se apreciaban escasos remanentes de tejido neoplásico con abundante tejido colagenoso e infiltración leucocitaria.

El análisis morfométrico se basó en la detección de vasos de lumen expandido y la presencia de eritrocitos dentro de ellos, por lo tanto no era posible detectar los brotes endoteliales que están asociados al proceso angiogénico tumoral. Las técnicas ocupadas en este trabajo, si bien permiten la descripción de algunas características asociadas a los vasos tumorales, no son específicas para la detección de endotelio vascular. Ésto es posible a través del empleo de otros métodos, como las técnicas de detección inmunohistoquímicas, que permiten evidenciar moléculas de expresión endotelial, como el factor de vonWillebrand o CD31 (Weidner *et al.*, 1991; Obermair *et al.*, 1996). Para evaluar el efecto antiangiogénico del sulfato de Vincristina en el Tumor Venéreo Transmisibile canino (TVT), en el futuro se deberán diseñar experiencias que incluyan éstas u otras técnicas que sean específicas para la detección de vasos sanguíneos tumorales.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Existe una reducción del lecho vascular en el estroma de Tumor Venéreo Transmisible (TVT) en fase regresiva inducida con sulfato de Vincristina (VCR), que se refleja en una disminución significativa ($p < 0.05$) tanto del contenido eritrocitario como del área vascular total y promedio, en asociación con fibrosis y colapso de los vasos sanguíneos.
- ❖ Los resultados observados en el lecho vascular del TVT en este estudio concuerdan con las propiedades antivascuales descritas para este agente quimioterapéutico.
- ❖ Las tinciones histológicas corrientes, asistidas con métodos de evaluación morfométrica, permiten determinar cambios en el lecho vascular, en forma indirecta, a través de la detección de eritrocitos o directa a través del área vascular total y promedio.

9. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, E.W.; CARTER, L.P., SAPP, W.J. 1968. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture. *Cancer Res* 28:753–757.

ADAMS, E.W.; CARTER, L.P., SAPP, W.J. 1981. Cytogenetic observations on the canine venereal tumor in long-term culture. *Cornell Vet* 71(3): 336-346.

ADAMS, J. M; CORY, S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26(1):61-66. Review.

ALBANESE, F.; POLI, A.; MILLANTA, F.; ABRAMO, F. 2002. Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin? *Vet Dermatol* 13(5): 243-246.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. 1994. Division cycle; *Molecular Biology of the cell* En: The Cell. 3 ed. Editorial Garland Publishing ICC. Cap 17. pp. 863-871.

AMARIGLIO E. N.; HAKIM I.; BROK-SIMONI F.; GROSSMAN Z.; KATZIR N.; HARMELIN A.; RAMOT B.; REHAVI G. 1991. Identity of rearranged LINE/*c-myc* junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor. *Proc Nat Aca Sci* 88(18): 8136-8139.

AMBER, E.; HENDERSON, R. 1982. Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. *J Am Anim Hosp Assoc* 18(2): 350-352.

AMBER, E.; ISITOR, G. N.; ADEYANJU, J. B. 1985. Viral-like particles associated with natural occurring transmissible venereal tumor in two dogs: preliminary report. *Am J of Vet Res* 46: 2613-2615.

AMBER, E. I.; HENDERSON, R. A.; ADEYANJU, J. B.; GYANG, E. O. 1990. Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, methotrexate, or vincristine. *J Vet Intern Med* 4(3):144-147.

ANDERSON, H.L.; YAP, J.T.; MILLER, M.P.; ROBBINS, A.; JONES, T.; PRICE, P.M. 2003. Assessment of pharmacodynamic vascular response in a Phase I trial of combretastatin A4 phosphate. *J Clin Oncol* 21: 2823–2830.

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

AUSPRUNK, D.; FOLKMAN, J. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53–65.

BARBER, M.R.; YANG, T.J. 1999. Tumor infiltrating lymphocytes: CD8+ lymphocytes in canine transmissible venereal sarcomas at different stages of tumor growth. *Anticancer Res* 19(2A):1137-1142.

BAGULEY, B.C.; HOLDAWAY K.H. ; THOMSEN, L.L.; ZHUANG, L.; ZWI, L.J. 1991. Inhibition of growth of colon 38 adenocarcinoma by vinblastine and colchicine. Evidence for a vascular mechanism. *Eur J Cancer* 27:482–487.

BARNETT, C.J.; CULLINAN, G.J.; GERZON, K.; HOYING, R.C.; JONES, W.E.; NEWLON, W.M.; POORE. G.A.; ROBISON, R.L.; SWEENEY, M.J.; TODD, G.C.; DYKE, R.W.; NELSON, R.L. 1978. Structure activity relationships of dimeric catharantus alkaloids.1.Deacetylvinblastine (vindesine) sulfate. *J Med Chem* 21: 88-96.

BARSKI, G.; CORNEFERT-JENSEN, F. 1966. Cytogenetic study of Sticker venereal sarcoma in European dogs. *J Nat Cancer Inst* 37: 787–797.

BAYLESS, K. J.; DAVIS, G. E. 2004. Microtubule Depolymerization Rapidly Collapses Capillary Tube Networks *in Vitro* and Angiogenic Vessels *in Vivo* through the Small GTPase Rho. *J Biol Chem* 279(12): 11686–11695.

BECK, L.; D'AMORE, P.A. 1997. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 11: 365-373.

BELHOUSSINE, 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. *Adv Exp Med Biol* 457: 365-81.

BELOTTI, D.; VERGANI, V.; DRUDIS, T.; BORSOTTI, P.; PITELLI, M. R.; VIALE, G.; GIAVAZZI, R.; TARABOLETTI, G. 1996. The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin. Cancer Res* 2: 1843–1849.

BENNETT, B.; PEBELAK-FEHIR, K.; EPSTEIN, R. 1972. Tumor-blocking and Inhibitory Serum Factor in the Clinical Course of Canine Venereal Tumor. *Cancer Res* 35: 2942- 2947.

BHUSANA-RAO, K.S.P.; COLLARD, M-P.; DEJONGHE, J.P.; TROUET, A. 1990. The chemistry and the structure activity relationships of some new prodrugs of vinca alkaloids. En: *Chemistry of Antitumour Agents*. Editorial Wilman, D.E.V. Blackie, Glasgow and London, pp. 370-378.

BICKNELL, R.; HARRIS, A.L. 1992. Anticancer strategies involving the vasculature: vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 3: 399–407.

BLACK, P.H. 1980. Shedding from the surface of normal and cancer cells. *Adv Cancer Res* 32: 75-199.

BLAKEY, D.C.; WESTWOOD, F.R.; WALKER, M. 2002. Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. *Clin Cancer Res* 8: 1974–1983.

BODER, G. B., PAUL, D. C.; WILLIAMS, D. C. 1983. Chlorpromazine inhibits mitosis of mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 31: 349–353.

BOOTH, M. J. 1994. Canine Transmissible Venereal and Ovarian Papillary Cystoadeno-carcinoma in a Bitch. *J Small Anim Pract* 16: 393-398.

BOSCOS, C. M.; VERVERIDIS, H. N.; TONDIS, D. K.; STAMOU, A. I.; SAMARTZI, F. C. 1998. Ocular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. *Vet Ophthalmol* 1(23): 167-170.

BREM, S. 1999. Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control* 6(5): 436-458.

BROWN, N.O.; CALVERT C.; MACEWEN, E.G. 1980. Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumor in 30 dogs. *JAVMA* 176: 983–986.

BUDMAN, D.R. 1997. Vinorelbine (Navelbine): a third-generation vinca alkaloid. *Cancer Invest* 15: 475-490.

BUJASKI, A.; NOWOGRODZKA, Z.M.; LENKO, J.; MIODONSKI, A.J. 1989. Angiomorphology of the human renal clear cell carcinoma. A light and electron microscopic study. *Anat* 415: 103-113.

CALVERT, C.A.; LEIFER, C.E.; MACEWEN; E.G. 1982. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *JAVMA* 181: 163–164.

CANN, J. R.; HINMAN, N. D. 1975. Interaction of chlorpromazine with brain microtubule subunit protein. *Molec Pharmacol* 11: 256–267.

CARMELIET, P. 2000. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(3): 389-395.

CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

CARMELIET, P.; JAINT, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and in other diseases. *Nat* 407: 249-257.

CATONE, G.; MARINO, G.; POGLAYEN, G.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; ZANGHI, A. 2003. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. *Vet Res Commun* 27(7): 549-553.

CHANDLER, J. P.; YANG T.J. 1981. Distribution of T and B Lymphocytes in Blood, Drainig Lymph Nodes and Tumors al Different Stages of Growth. *Br J Cancer* 44: 514-520.

CHAPLIN, D. J.; HORSMAN, M. R. 1994. The influence of tumour temperature on ischemia-induced cell death: potential implications for the evaluation of vascular mediated therapies. *Radiother Oncol* 30: 59–65.

CHAPLIN, D.J.; DOUGHERTY, G.J. 1999. Tumour vasculature as a target for cancer therapy. *Br J Cancer* 80(1): 57–64.

CHAPLIN, D.J.; PETTIT, G.R.; HILL, S.A. 1999. Anti-vascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Res* 19: 189–195.

CHING, L. M.; GOLDSMITH, D.; JOSEPH, W. R.; KORNER, H.; SEDGWICK, J. D.; BAGULEY, B. C. 1999. Induction of intratumoral tumor necrosis factor (TNF) synthesis and hemorrhagic necrosis by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) in TNF knockout mice. *Cancer Res* 59: 3304–3307.

CHOI, Y.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M.; KIM, C. J.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; OGIHARA, K. 1999. Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor. *Anim Genet* 30(1): 51-53.

CHOI, Y. K.; KIM, C. J. 2002. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. *J Vet Sci* 3(4): 285-292.

CHU, R. M.; LIN, C. Y.; LIU, C. C.; YANG, S. Y.; HSIAO, Y. W.; HUNG, S. W.; PAO, H. N.; LIAO, K. W. 2001. Proliferation characteristics of canine transmissible venereal tumor. *Anticancer Res* 21(6A): 4017-4024.

CHU, R. M.; SUN, T. J.; YANG, H. Y.; WANG, D. G.; LIAO, K. W.; CHUANG, T. F.; LIN, C. H.; LEE, W. C. 2001. Heat shock proteins in canine transmissible venereal tumor. *Vet Immunol Immunopathol* 82(1-2): 9-21

COCKRILL, J. N.; BEASLEY, J. N. 1975. Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages of growth and regression. *Am J Vet Res* 36: 677-681.

COHEN, D. 1972. Detection of Humoral Antibody to the Transmissible Venereal Tumor of the Dog. *Int J Cancer* 10: 207-212.

COHEN, D. 1980. In vitro cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cellular toxicity to the transmissible venereal tumor of the dog. *J Natl Cancer Inst* 64(2): 317-321.

COHEN, D. 1985. The canine transmissible venereal tumor: A unique result of tumor progression. *Adv Cancer Res* 43: 75-112.

COHEN, D.; SHALEV, A.; KRUP, M. 1984. Lack of α_2 -Microglobulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 72: 395-401.

DAMERON, K. M.; VOLPERT, O. V.; TAINSKY, M. A.; BOUCK, N. 1994. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 483-489.

DARK, G.G.; HILL, S.A.; PRISE, V.E.; TOZER, G.M.; PETTIT, G.R.; CHAPLIN, D.J. 1997. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res* 57: 1829–1834.

DAVIS, P. D.; DOUGHERTY, G.J.; BLAKEY, D.C.; GALBRAITH, S.M.; TOZER, G.M.; HOLDER, A.L.; NAYLOR, M.A.; NOLAN, J.; STRATFORD M.R.; CHAPLIN, D.J.; HILL, S.A. 2002. ZD6126: a novel vascular-targeting agent that causes selective destruction of tumor vasculature. *Cancer Res* 62: 7247–7253.

DELPROPOSTO, Z.; LORUSSO, P.; LATIF, Z.; MORTON, P.; WHEELER, C.; BARGE, A.; EVELHOCH, J. MRI evaluation of the effects of the vascular targeting agent ZD6126 on tumor vasculature. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21: 111a.

DENEKAMP J. 1986. Endothelial cell attack as a novel approach to cancer therapy. *Cancer Top* 6: 6–8.

DENEKAMP, J. 1990. Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 9: 267–282.

DENEKAMP, J. 1993. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 66: 181–196.

DENEKAMP, J.; HOBSON, B. 1982. Endothelial cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer* 46: 711-720.

DENEKAMP, J; HOBSON, B. 1983. Vascular occlusion and tumour cell death. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19: 271–275.

DENEKAMP, J.; HOBSON, B. 1984. Endothelial proliferation in tumors and normal tissue: continuous labeling studies. *Br J Cancer.* 49: 405–413.

DÍAZ-MONTERO, C. M.; MCINTYRE, B. W.; 2005. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells does not alter sensitivity to chemotherapeutic agents. *BMC Cancer* 5: 39

DONG, J.; GRUNSTEIN, J.; TEJADA, M.; PEALE, F.; FRANTZ, G.; LIANG, W.; BAI, W.; YU, L.; KOWALSKI, J.; LIANG, X.; FUH, G.; GERBER, H. P.; FERRARA, N. 2004. VEGF-null cells require PDGFR α signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J* 23(14): 2800–2810.

DU, L.; LYLE, C.S.; CHAMBERS, T.C. 2005. Characterization of vinblastine-induced Bcl-2 and Bcl-xl phosphorylation: evidence for a novel protein kinase and a coordinated phosphorylation/desphosphorylation cycle associated with apoptosis induction *Oncogene* 24(1): 107-117.

DUARTE, M. 2002. Indicadores de Proliferación celular en Tumor Venéreo Transmisible Canino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 27-29.

DVORAK, H.H.; NAGY, J.A.; DVORAK, J.T.; DVORAK, A.M. 1988. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 133: 95-109.

EBERHARD, A.; KAHLERT, S.; GOEDE, V.; HEMMERLEIN, B.; PLATE, K.H.; AGUSTINE, H.G. 2000 Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 60: 1388–1393.

EPSTEIN, R.; BENNETT, B 1974. Histocompatibility Typing and Course of Canine Venereal Tumors Transplanted into Unmodified Random Dogs. *Cancer Res* 34: 788-793.

FAN, T.P.; JAGGER, R; BICKNELL, R. 1995. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular target gene therapy. *Trends Pharmacol Sci* 16: 57-66.

FELDMAN, E.; NELSON, R. 1987. Canine female reproduction. En: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Editorial W.B. Saunders. 475-477.

FENTON, M.A.; YANG, T.J. 1988. Role of humoral immunity in progressive and regressive and metastatic growth of the canine transmissible venereal sarcoma. *Oncology* 45(3): 210-213.

FERRARA, N.; WINER, J.; BURTON, T.; ROWLAND, A.; SIEGEL, M.; PHILLIPS, H.S.; TERRELL, T.; KELLER, G.A.; LEVINSON, A.D. 1993. Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. *J Clin Invest* 91(1): 160–170.

FERREIRA, A. J.; JAGGY, A.; VAREJAO, A. P.; FERREIRA, M. L.; CORREIA, J. M.; MULAS, J. M.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, P.; PRADA, J. 2000. Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. *J Small Anim Pract* 41(4): 165-168.

FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZALEZ, C. Tumor Venéreo Transmisibile Canino. En: *Registro de Neoplasias 1986-1991*. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZALEZ, C.; CEPEDA, R. 2000. Tumor Venéreo Transmisibile. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. *Monografías Med Vet* 20(1): 82-93.

FOLKMAN, J. 1972. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg* 175: 409-416.

FOLKMAN, J. 1986. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 46: 467–473.

FOLKMAN, J. 1992. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 3: 65-71.

FOLKMAN, J. 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757–1763.

FOLKMAN, J. 2000. Tumor Angiogenesis. En: *Cancer Medicine*, 5th ed. Eds Holland, J. F. *et al.* B. C. Decker, Inc., Ontario, Canada. pp: 132–152.

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

FOLKMAN, J.; SHIN, Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16): 10931-10934.

FRIEDLANDER, M.A.; BROOKS, P.C.; SHAFFER, R.W. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alfa v integrins. *Sci* 270: 1500-1502.

FRISCH, S. M.; SCREATON, R. A. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Op Cell Biol* 13: 555–562.

FUJINAGA, T.; YAMASHITA, M.; YOSHIDA, M.C.; MIZUNO, S.; OKAMOTO, Y.; TAJIMA, M.; OTOMO, K. 1989. Chromosome analysis of canine transmissible sarcoma cells. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A* 36: 481-489.

GALBRAITH, S.M.; MAXWELL, R.J.; LODGE, M.A.; TOZER, G.M.; WILSON, J.; TAYLOR, N.J.; STIRLING, J.J.; SENA, L; PADHANI, A.R.; RUSTIN, G.J.S. 2003. Combretastatin A4 phosphate has tumor antivascular activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol* 21: 2831–2842.

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

GONZÁLEZ, C. M.; CEPEDA, R.; FLORES, E.; CATTANEO, G.; COLARTE, K. 2002. Separación y purificación de células de tumor venéreo transmisible canino espontáneo, en gradiente de densidad de polisucrosa y diatrizoato de sodio. *Av Cs Vet* 17: 18-23.

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

GRIGGS, J.; METCALFE, J. C.; HESKETH, R. 2001. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. *Lancet Oncol* 2: 82–87.

GRONINGER, E.; MEEUWSEN-DE BOER, G.J.; DE GRAAF, S.S.N.; KAMPS W.A.; DE BONT, E.S.J.M. 2002. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic eukaemia cells: A mitochondrial controlled pathway egulated by reactive oxygen species? *Inter J Oncol* 21: 1339-1345.

GROSIOS, K.; HOLWELL, S.E.; MCGOWN, A.T., PETTIT, G.R.; BIBBY, M.C. 1999. In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug. *Br J Cancer* 81: 1318–1327.

HADFIELD, J. A.; DUCKI, S.; HIRST, N.; MCGOWN, A. T. 2003. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res* 32 (5): 309-325.

HAHNFELDT, P.; PANIGRAHY, D.; FOLKMAN, J.; HLATKY, L. 1999. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res* 59: 4770–4775.

HALIN, C.; ZARDI, L.; NERI, D. 2001. Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci* 16: 191–194.

HALL, W.; NIELSEN, S.; MCENTEE, K. 1976. Tumours of the prostata and penis. *Bull WHO* 53(2/3): 217-226.

HAMEL, E.; COVELL, D. G. 2002. Antimitotic peptides and depsipeptides. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2: 19–53.

HANAHAH, D.; FOLKMAN, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353–364.

HANAHAH, D. 1997. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48–50

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57

HARDIG, M.; YANG, T.J. 1980. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Leucocyte Adherence Inhibition (LAI), Reactivity of Various Lymphoid Tissues of Dogs with Tumors at Differnt Stages of Growth. *Int J Cancer* 27: 349-355.

HAYOT, C.; FARINELLE, S.; DE DECKER, R.; DECAESTECKER, C.; DARRO, F.; KISS, R.; VAN DAMME, M. 2002. In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton. *Internat J Oncol* 21: 417-425.

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

HILL, S.A. ; SAMPSON, L.E. ; CHAPLIN, D.J. 1995. Anti-vascular approaches to solid tumor therapy: evaluation of vinblastine and .avone acetic acid. *Int J Cancer* 63:119–123.

HIRST, D.G.; DENEKAMP, J.; HOBSON, B. 1982. Proliferation kinetics of endothelial and tumour cells in three mouse mammary carcinomas. *Cell Tissue Kinet* 15: 251–261.

HOFFMAN, J. C.; VAUGHN, K. C. 1994. Mitotic disrupter herbicides act by a single mechanism but vary in efficacy. *Protoplasma* 179: 16–25.

HOLWELL, S.E.; HILL, B.T.; BIBBY, M.C. 2001. Antivascular effects of vinflunine in the MAC 15A transplantable adenocarcinoma model. *Br J Cancer* 84: 290–295.

HORI, K.; SAITO, S.; NIHEI, Y.; SUZUKI, M.; SATO, Y. 1999. Antitumor effects due to irreversible stoppage of tumor tissue blood flow: evaluation of a novel combretastatin A-4 derivative, AC7700. *Jpn J Cancer Res* 90: 1026–1038.

HORSMAN M.R.; EHRNROOTH, E.; LADEKARL, M.; OVERGAARD, J. 1998. The effect of combretastatin A-4 disodium phosphate in a C3H mouse mammary carcinoma and a variety of murine spontaneous tumours. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 895– 898.

HORSMAN, M.R.; MURATA, R. 2003. Vascular targeting effects of ZD6126 in a C3H mouse mammary carcinoma and the enhancement of radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 1047–1055.

HSIAO, Y.W.; LIAO K. W.; HUNG S. W.; CHU R. M. 2002. Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol* 87(1-2): 19-27.

HSIAO, Y.; LIAO, K.; HUNG, S.; CHU, R. 2004. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Secretion of IL-6 Antagonizes Tumor-Derived TGF- β 1 and Restores the Lymphokine-Activated Killing Activity. *J Immunol* 172: 1508–1514.

HUANG, D.C.S.; STRASSER, A. 2000. BH3-only proteins essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103: 839–842.

HUANG, X.; MOLEMA, G.; KING, S.; WATKINS, L.; EDGINGTON, T. S.; THORPE, P. E. 1997. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Sci (Wash. DC)* 275: 547–550.

IDOWU A. L. 1975. The Chromosomes of an Extragenitally Located Transmissible Venereal Tumor in a Dog. *J Small Anim Pract* 16: 393-398.

IDOWU A. L. 1984. A Retrospective Evaluation of Four Surgical Method of Treating Canine Trasmissible Venereal Tumor. *J Small Anim Pract* 25: 193-198.

INGBER, D. E. 2000. Opposing views on tensegrity as a structural framework for understanding cell mechanics. *J Appl Physiol* 89: 1663–1670.

IVOGHLI, B. 1977. Canine transmissible venereal tumor in Iran. *Vet Pathol* 14(3): 289-290.

JAIN, R. K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. Review. *Nat* 9(6): 685-693.

JANA, K. 2005. Proliferacion celular en tumor venéreo transmisibile canino tratado con dexametasona. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Cs. Veterinaria y Pecuarias. 58 pp.

JEGLUM, K. 1994. Principios de la Terapia Anticancerosa. En: 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.

JIMENEZ-BARBERO, J.; AMAT-GUERRI, F.; SNYDER, J. P. 2002. The solid state, solution and tubulin-bound conformations of agents that promote microtubule stabilization. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2: 91–122.

JORDAN, M. A. 2002. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2: 1–17.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer* 4: 253-266

JUNG, Y.D.; AHMAD, S.A.; LIU, W.; REINMUTH, N.; PARIKH, A.; STOELTZING, O.; FAN, F.; ELLIS, L.M. 2002. The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 12: 105–112.

KANTHOU, C.; TOZER, G. M. 2002. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* 99: 2060–2069.

KATZIR, N.; REHAVIN, S.; COHEN, J. B.; UNGER, T.; SIMONI, F.; SEGAL, S.; COHEN, D.; GIVOL, D. 1985. “Retroposon” insertion into the cellular oncogen c-myc in canine transmissible venereal tumor. *Proc Nat Acad Sci* 82: 1054-1058.

KIPAR, A.; BAUMGARTNER, W.; KREMER, E.; FRESE, K.; WEISS, E. 1998. Expression of the major histocompatibility complex class II antigen in neoplastic cells of canine cutaneous histiocytoma. *Vet Immunol Immunopath* 62: 1-13.

KITAZUMI, K.; MIO, M.; TASAKA, K. 1991. Involvement of the microtubular system in the endothelin-1 secretion from porcine aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 42: 1079.

KOLONIN, M.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. 2001. Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr Opin Chem Biol* 5: 308–313.

KRUCZYNSKI, A.; HILL, B.T. 2001. Characterization of cell death induced by vinflunine, the most recent vina alkaloid in clinical development. *Crit Rev Oncol Hematol* 40: 59-73.

KUIJPERS, T.W.; RALEIGH, M.; KAVANAGH, T.; JANSSEN, H.; CALAFAT, J.; ROOS, D.; HARLAN, J.M. 1994. Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process. *J Immunol* 152: 50-60.

LACEY, E.; GILL, J. H. 1994. Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop* 56: 245–262.

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.

LASH, C.J.; LI, A.E.; RUTLAND, M.; BAGULEY, B.C.; ZWI, L.J.; WILSON, W.R. 1998. Enhancement of the anti-tumour effects of the antivasular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) by combination with 5-hydroxytryptamine and bioreductive drugs. *Br J Cancer* 78: 439–445.

LI, L.; ROJANI, A.; SIEMANN, D.W. 1998. Targeting the tumor vasculature with combretastatin A-4 disodium phosphate: effects on radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 899–903.

LIAO, K. W.; HUNG, S. W.; HSIAO, Y. W.; BENNETT, M.; CHU, R. M. 2003. Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet Immunol Immunopathol* 12; 92(3-4):149-62.

LOBERT, S.; INGRAM, J.; CORREIA, J. 1999. Additivity of dilantin and vinblastine inhibitory effects on microtubule assembly. *Cancer Res* 59: 4816–4822.

LOMBARDI C. 1995. Respuesta Inmonológica de TVT canino en Relación al Tratamiento Quimioterapeutico. Tesis Magister, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuaria U. de Chile. pág: 130-136.

LÓPEZ, M.; LEYGTHON, C.; GRAF, M. 1985. Técnicas de Laboratorio para Citología e Histopatología. 2ª edición. U. de Chile, Fac. de Medicina, Dpto. de Biología celular y Genética. Pp: 104-111.

LUDFORD, R.J. 1945. Colchine in the experimental chemotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 6: 89 –101.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLASKIC, C.; REGAL, D.; MAGVOL, J. 1997. Immunophenotype of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Vet Imm and Immunopathol* 57: 1-11.

McENTEE, K.; NIELSEN, S. 1976. Tumors of the female genital tract. *Bull WHO* 53(2/3): 217-226.

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

MICHELETTI, G.; POLI, M.; BORSOTTI, P.; MARTINELLI, M.; IMBERTI, B.; TARABOLETTI, G.; GIAVAZZI, R. 2003. Vascular-targeting Activity of ZD6126, a Novel Tubulin-binding Agent. *Cancer Res* 63: 1534–1537.

MILLER, K. D.; SWEENEY, C. J.; SLEDGE, G. W. 2001. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 19: 1195–1206.

MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; TAJIMA, M.; TAJIMA, M.; OTOMO, K.; KOIKE, T. 1989. Role of Lymphocytes in Dogs Experimentally Re-challenged with Canine Transmissible Sarcoma. *Jpn J Vet Sci* 51(1): 86-95.

MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; KUROSAWA, T. 1996. Changes in Lymphokine-activated Killer Activity in Peripheral Blood Lymphocytes from Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *Models Exp Anim* 45(3): 289-292.

MOOBERRY, S.L.; TIEN, G.; HERNANDEZ, A.H.; PLUBRUKARN, A., DAVIDSON, B.S. 1999. Laumalide and isolaumalide, new Paclitaxel-like agents. *Cancer Res* 59(3): 653-660.

MORRIS, J.; DOBSON, J. 2002. Oncología en pequeños animales. Cap: 11. Editorial Inter-Médica SA (Blackwell Science), Bs As, República Argentina. Pp: 149-164.

MOULTON, J. 1961. Urogenital System and Mammary Gland, en *Tumors in Domestic Animals*. University of California. Press Berckey, pp: 164-166.

MOZOS, E.; MENDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; PÉREZ, J. 1996. Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Vet Pathol* 33: 257-263.

MUKARATIRWA, S.; GRUYS, E. 2004. Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. *Vet Q* 25: 101-111.

MURATA, R.; OVERGAARD, J.; HORSMAN, M.R. 2001. Comparative effects of combretastatin A-4 disodium phosphate and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid on blood perfusion in a murine tumour and normal tissues. *Int J Radiat Biol* 77: 195–204.

NATSUME, T.; WATANABE, J.; KOH, Y.; FUJIO, N.; OHE, Y.; HORIUCHI T.; SAIJO, N.; NISHIO, K.; KOBAYASHI M. 2003. Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin) against vascular endothelial growth factor-secreting human lung cancer in vivo. *Cancer Sci* 94: 826-833.

NEWMAYER, D.D.; FERGUSON-MILLER, S. 2003. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481–490.

NGUYEN, L.L.; D'AMORE, P.A. 2001. Cellular interactions in vascular growth and differentiation. *Internat Rev Cytol* 204: 1-48.

NUÑEZ, G. 2005. Apoptosis en Tumor Venéreo Transmisible canino tratado con Dexametasona. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias.

OBERMAIR, A.; WANNER, C.; BILGI, S.; SPEISER, P.; KAIDER, A.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; GITSCH, G. 1996. Tumor Angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density With Survival. *Am J Obstet Gynecol* 1996: 126-131.

ODUYE, C.; IKEDE, G. 1973. Metastatic Transmissible Venereal Tumor in Dogs. *J Am Pract* 14: 625-637.

OLTRA, O. 1999. Respuesta immune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fases progresiva y regresiva. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 60 pp.

OTOMO, K.; KOIKE, T.; KUDO, T.; SAKAI, T. 1981. Histological and ultrastructural findings of regressing canine transmissible venereal tumor after repeated transplantation. *J Jpn Vet Sci* 43(6): 823-832.

PALKER T.; YANG TJ. 1981. Identification and Phisicochemical Characterization of a Tumoráassociated Antigen from Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *J Nath C L* 66: 779-787.

PAPAZOGLU, L. G.; KOUTINAS, A. F.; PLEVRAKI, A. G.; TONTIS, D. 2001. Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: a retrospective study of six spontaneous cases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48(7): 391-400.

PARKINS, C.S.; HOLDER, A.L.; HILL, S.A.; CHAPLIN, D.J.; TOZER, G.M. 2000. Determinants of anti-vascular action by Combrestatine A-4 phosphate: role of nitric oxide. *Br J Cancer* 83: 811-816.

PEDLEY, R. B., HILL, S. A.; BOXER, G. M., FLYNN, A. A., BODEN, R.; WATSON, R., DEARLING, J.; CHAPLIN, D. J., BEGENT, R. H. 2001. Eradication of colorectal xenografts by combined radioimmunotherapy and combretastatin A-4 3-O-phosphate. *Cancer Res* 61: 4716–4722.

PEREIRA, J. S.; SILVA, A. B.; MARTINS, A. L.; FERREIRA, A. M.; BROOKS, D. E. 2000. Immunohistochemical characterization of intraocular metastasis of a canine transmissible venereal tumor. *Vet Ophthalmol* 3(1): 43-47.

PÉREZ, J.; DAY, M. J.; MOZOS, E. 1998. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Vet Imm and Immunopathol* 64: 133-147.

PERUSSIA E. 1992. Tumor Infiltrating Cells. *Laboratory Investigation* 67(2): 155-157.

PRIER, J. E.; JOHNSON, J. H. 1964. Malignancy in Canine Transmissible Venereal Tumour. *J Am Vet Med Assoc* 145: 1092-1094.

PRISE, V. E.; HONESS, D. J.; STRATFORD, M. R.; WILSON, J.; TOZER, G. M. 2002. The vascular response of tumor and normal tissues in the rat to the vascular targeting agent, combretastatin A-4-phosphate, at clinically relevant doses. *Int J Oncol* 21: 717–726.

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

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

RICHARD, E. W. 1994. Urogenital Tumors. en Compendio del Curso internacional de Oncología Veterinaria. Villouta y Gonzalez Editores. Universidad de Chile. Pp: 86-87.

RISAU, W. 1997. Mechanism of angiogenesis. Nature 386: 671-674.

ROGERS, K. S. 1997. Transmisible venereal tumor. The Compendium of Continuing Education 19: 1036-1045.

ROJANI, A.M.; LI, L.; RISE, L.; SIEMANN, D.W. 2002. Activity of the vascular targeting agent combretastatin A-4 disodium phosphate in a xenograft model of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Acta Oncol 41: 98 –105.

ROSEN, L. 2000. Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials. The Oncologist 5(1): 20-27

SAPP, W. J.; ADAMS, E. W. 1970. C-Type viral particles in canine venereal tumor cell cultures. Am J Vet Res 31: 1321-1323.

SCORRANO, L.; KORSMEYER, S.J. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. Biochem Biophys Res Commun. 304: 437-344.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. 1998. Tumor venéreo transmisible. En: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 5ta Ed., 1997. Editorial Inter-Médica. Cap.19. Pp: 1219-1223.

SEKI, K.; YOSHIKAWA, H.; SHIIKI, K.; HAMADA, Y.; AKAMATSU, N.; TASAKA, K. 2000. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via secuencial

activation of caspasa-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemoter Pharmacol* 45(3): 199-206.

SHING, Y.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; BUTTERFIELD, C.; MURRAY, J.; KLAGSBRUN, M. 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Sci* 223: 1296-1299.

SIEMANN, D. W.; ROJIANI, A. M. 2002. Enhancement of radiation therapy by the novel vascular targeting agent ZD6126. *Int. J Radiat Oncol Biol Phys* 53: 164–171.

SIEMANN, D. W.; CHAPLIN, D. J., HORSMAN, M. R. 2004. Vascular-Targeting Therapies for Treatment of Malignant Disease. *Cancer* 100(12): 2491- 2499

SLEDGE, G.W.; MILLER, K.D. 2002. Angiogenesis and antiangiogenic cancer. *Current Prob Cancer* 26: 1–60.

SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. 1980. *Statistical Method*. Edit. Iowa State University Press. P: 290.

SRIVASTAVA, R. K.; SRIVASTAVA, A. R.; KORSMEYER, S. J.; NESTEROVA M.; CHO-CHUNG, Y. S.; LONGO, D. L. 1998. Involvement of Microtubules in the Regulation of Bcl2 Phosphorylation and Apoptosis through Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Molec Cell Biol*: 3509–3517.

STRAUSS L. 2001 Estudio de la actividad angiogénica y antimetastásica de la betametasona sola asociada a beta ciclodextrina sulfatada sobre tumores malignos. Proyecto para optar al grado de licenciado en medicina veterinaria y al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. de Cs Silvoagropec. Escuela de Med. Vet. Universidad Mayor. 158 Pp.

TARABOLETTI, G.; MARGOSIO, B. 2001. Antiangiogenic and antivascolar therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol* 1: 378–384.

TARABOLETTI, G.; MICHELETTI, G.; RIEPPI, M.; POLI, M.; TURATTO, M.; ROSSI, C.; BORSOTTI, P.; ROCCABIANCA, P.; SCANZIANI, E.; NICOLETTI, M. I.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; GIAVAZZI, R. 2002. Antiangiogenic and antitumor activity of IDN 5390, a new taxane derivative. *Clin Cancer Res* 8: 1182–1188.

TAUSSIG, M. J. 1989. The Immune Response Against Neoplastic Cells, En: Processes in Pathology and Microbiology. Edit. Blackwell Scientific Publications. Second edition. Pp: 738-750.

TELLA, M.; AJALA, O.; TAIWO, V. 2004. Complete regression of Transmissible Venereal Tumour (TVT) in Nigerian mongrel dogs with Vincristine sulphate chemotherapy. *African J Biomed Res* 7 (3): 133 – 138.

THORPE, P. E.; CHAPLIN, D. J.; BLAKEY, D. C. 2003. The First International Conference on Vascular Targeting: Meeting Overview. *Cancer Res* 63: 1144–1147.

TSUJIMOTO, Y. 2003. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195: 158-167.

TORRES, C. 1999. Aspectos histopatológicos e Inmunohistoquímicos del Tumor Venéreo Transmisibile 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 Pp.

TOZER, G.M.; PRISE, V.E.; WILSON, J. 1999. Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res* 59: 1626–1634.

TOZER, G. M. 2001. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res.* 61: 6413–6422.

TOZER, G. M.; KANTHOU, C.; PARKINS, C. S.; HILL, S. A. 2002. The biology of the combretastatins as tumour vascular targeting agents. *Int J Exp Pathol* 83: 21–38.

TRAIL, P.; YANG, T. 1985. Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Quantitation of T-lymphocyte Subpopulation During Progressive Growth and Spontaneous Regression. *J Natl Cancer Inst* 74(2): 461-467.

VACCA, A.; IURLARO, M.; RIBATTI, D.; MINISCHETTI, M., NICO, B.; RIA, R.; PELLEGRINO, A.; DAMMACCO, F. 1999. Antiangiogenesis Is Produced by Nontoxic Doses of Vinblastine. *Blood* 94(12): 4143-4155.

VAUPEL, P.; KALLINOWSKI, F.; OKUNIEFF, P. 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49: 6449–6465.

VERMOOTEN, M. I. 1987. Canine Transmissible Venereal Tumor: A Review. *J. South African Vet Assoc* 3: 147-150.

WANG, N.; BUTLER, J.P.; INGBER, D.E. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124–1127.

WANG, G.L.; JIANG, B.H.; RUE, E.A., SEMENAZA, G.L. 1995. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor receptor inactivates its tumour suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5510-5514.

WANG, H.; BEDFORD, F.K.; BRANDON, N.J.; MOSS, S.J.; OLSEN, R.W. 1999. GABA-A-receptor-associated protein links GABA-A receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397: 69-72.

WEBER, W.T.; NOWELL, P.C.; HARE, W.C. 1965. Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. *J Natl Cancer Inst* 35: 537–541.

WEIDNER, N.; FOLKMAN, J.; POZZA, F.; BEVILACQUA, P.; ALFRED, E.N.; MOORE, D.H.; MELI, S.; GASPARINI, G. 1992. Tumor angiogenesis : a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Nat Can Inst* 84: 1875-1887.

WEINBERG, R. 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.

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

WELLER, R.E. 1994. Complications of anticancer chemotherapy. En: Compendio del Curso Internacional de Oncología Veterinaria. Villouta, G. y Gonzáles, C. editores, Universidad de Chile. pp 31-38, 86- 87.

WELLMAN, M. 1996. Cytology and Diagnosis of Neoplasia. *Oncol and Hematol*: 14-17.

WILSON, L.; JORDAN, M.A.; MORSE, A.; MARGOLIS, R.L. 1982. Interaction of vinblastine with steady-state microtubules in vitro. *J Mol Biol* 159: 129-149

WILTHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. 2001. *Small Animal Oncology*, Third Edition. Editorial W. B. Saunders Company.

WOGLOM, W.H. 1923. A critique of tumour resistance. *J Cancer Res* 7: 283-311.

WOOD, K.W.; CORNWELL, W.D.; JACKSON, J.R. 2001. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target *Curr Opin Pharmacol* 1: 370-377.

YANCOPOULOS, G. D. et al. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 249-257.

YANG, T. J.; WANG, N. S.; JONES J. B. 1973. A study of the cytology and cell culture of the canine transmissible venereal sarcoma. *Specialia* 29(9): 1133-1134.

YANG, T.J.; ROBERTS R., JONES J. 1976. Qunatitative Estudy of Lymphoreticular Infiltration into Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *Cell Path* 20: 197-204.

YANG, T.J. 1987. Metastatic Transmissible Venereal Sarcoma in a Dog. *J Small Anim Pract* 21: 522-523.

YANG, T. J. 1988. Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma (review). *Anticancer Res* 8: 93-96.

YANG, T. J.; PALKER, T. J.; HARDING, M. W. 1991. Tumor size, leukocyte adherence inhibition and serum levels of tumor antigen in dogs with the canine transmissible venereal sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* 33(4): 255-262.

ZHAO. S.; MOORE, J.V.; WALLER, M.L.; MCGOWN, A.T.; HADFIELD, J.A.; PETTIT, G.R.; HASTINGS, D.L. 1999. Positron emission tomography of murine liver metastases and the effects of treatment by combretastatin A-4. *Eur J Nucl Med* 26: 231–238.

ZHOU, J.; GRUPTA, K.; AGGARWAL, S.; ANEJA, R.; CHANDRA, R.; PANDA, P.; JOSHI, H. C. 2003. Brominated derivatives of noscapine are potent microtubule-interfering agents that perturb mitosis and inhibit cell proliferation. *Mol Pharmacol* 63: 799–807.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1

Datos de los tumores de TVT utilizados, procedentes de otra memoria de título (Duarte, 2002). Estas muestras fueron extraídas de tumores de ubicación genital de 10 caninos adultos de entre 1-10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, los que fueron diagnosticados clínicamente, biopsiados y tratados con quimioterapia en el Servicio de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Nº del Caso	Sexo	Edad	Raza	Curso de la Enfermedad	Ubicación
Caso 1	H	+ de 2 ^a	Mestizo	+/- 3m	Vulva
Caso 2	H	1 a 2m	Mestizo	+/- 20 días	Vulva
Caso 3	M	3 A	Mestizo	+/-1 m	Pene
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
Caso9	M	6 A	Siberiano	+/-4 m	Pene y Prepucio
Caso 10	H	5 A	Mestizo	5 días**	Vaginal y Vulvar

10.2 ANEXO 2

Diámetros obtenidos de los vasos sanguíneos presentes en fases progresiva y regresiva de TVT, inducida por tratamiento quimioterápico con VCR.

Caso 1 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	3,85	3,83	5,13	20,71	9,65
2	6,87	7,60	4,08	-	21,87
3	18,22	18,71	4,95	-	-
4	8,07	9,04	4,39	-	-
5	8,35	6,29	5,91	-	-
6	13,18	-	11,46	-	-
7	7,41	-	-	-	-
8	4,99	-	-	-	-
9	6,41	-	-	-	-
10	9,20	-	-	-	-
Caso 2 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	25,01	10,90	11,81	12,43	16,89
2	-	-	-	11,77	18,67
3	-	-	-	-	20,86
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

Caso 1 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	-	8,26	6,70	7,36	-
2	-	2,38	6,52	11,11	-
3	-	2,54	5,17	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 2 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	-	-	10,96	-	12,96
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

(-) Campo sin vasos sanguíneos detectables

Caso 3 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	3,41	7,07	8,55	4,86	7,06
2	15,51	4,62	18,97	7,25	12,26
3	16,13	10,67	4,13	14,19	8,49
4	4,39	9,62	-	-	10,38
5	-	-	-	-	12,82
6	-	-	-	-	5,99
7	-	-	-	-	9,57
8	-	-	-	-	14,51
9	-	-	-	-	2,79
10	-	-	-	-	
Caso 4 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	12,72	5,41	5,57	-	11,99
2	3,73	5,08	6,01	-	5,57
3	-	25,8	20,63	-	4,76
4	-	5,36	3,94	-	5,79
5	-	-	-	-	5,28
6	-	-	-	-	6,93
7	-	-	-	-	3,87
8	-	-	-	-	15,94
9	-	-	-	-	3,94
10	-	-	-	-	2,61

Caso 3 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	5,19	3,28	2,64	6,1	6,07
2	-	1,86	2,61	4,42	-
3	-	2,31	1,96	5,44	-
4	-		3,47		-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 4 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	-	6,48	5,78	5,74	4,09
2	-	-	2,29	2,64	5,78
3	-	-	2,77	5,32	5,55
4	-	-	-	2,61	2,13
5	-	-	-	3,33	-
6	-	-	-	5,51	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

(-) Campo sin vasos sanguíneos detectables

Caso 5 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	10,83	16,23	9,48	9,36	10,46
2	5,74	14,51	9,17	10,26	5,82
3	9,5	5,85	29,62	5,59	4,25
4	5,28	7,31	14,68	9,1	8,49
5	14,48	12,13	7,77	4,44	9,58
6	8,91	6,1	2,64	-	5,34
7	11,04	8,48	9,65	-	7,98
8	18,92	-	10,15	-	-
9	7,12	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 6 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	4,71	14,27	6,71	12,12	13,03
2	4,87	6,99	-	-	-
3	17,47	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

Caso 5 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	9,35	4,17	16,52	-	8,89
2	3,14	3,59	5,07	-	-
3	-	5,32	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 6 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	9,94	3,79	5,96	2,55	4,17
2	1,67	3,76	6,48	-	-
3	-	6,62	2,78	-	-
4	-	3,28	-	-	-
5	-	12,85	-	-	-
6	-	10,63	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

(-) Campo sin vasos sanguíneos detectables

Caso 7 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	8,37	9,93	6,35	4,88	5,27
2	6,14	10,45	5,38	4,24	12,67
3	3,73	5,28	2,94	8,21	6,72
4	-	6,7	7,44	2,82	6,41
5	-	-	7,36	5,41	9,2
6	-	-	7,36	9,36	-
7	-	-	3	9,03	-
8	-	-	-	4,76	-
9	-	-	-	3,93	-
10	-	-	-	5,49	-
Caso 8 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	8,49	11,98	13,21	10,67	11,33
2	6,75	6,47	6,07	4,98	13,64
3	6,8	12,53	3,94	4,39	7,49
4	8,65	-	11,09	4,17	2,96
5	5,17	-	5,28	10,61	2,69
6	10,67	-	2,89	3,93	-
7	5,91	-	5,91	15,07	-
8	3,47	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

Caso 7 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	4,95	7,06	2,64	5,51	9,92
2	10,98	-	-	-	-
3	5,32	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 8 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
N ^a Vasos					
1	5,64	19,02	3,94	5,63	14,57
2	7,12	7,19	3,61	5,27	-
3	3,73	-	3,53	6,52	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

(-) Campo sin vasos sanguíneos detectables

Caso 9 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	7,58	25,52	16,91	7,02	9,78
2	7,07	7,86	5,71	16,84	4,62
3	7,34	13,64	-	16,09	4,07
4	11,59	7,37	-	-	25,81
5	9,75	-	-	-	-
6	7,04	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 10 Progresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	10,85	25,72	2,46	15,55	12,31
2	16,2	10,52	8,48	8,09	6,7
3	-	18,27	10,54	-	7,66
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

Caso 9 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	6,75	5,99	3,41	7,84	6,62
2	4,76	13,08	6,57	6,1	5,27
3	-	9,75	14,91	2,64	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
Caso 10 Regresivo: Diámetro de Vasos (μm)					
Campo	1	2	3	4	5
Nº Vasos					
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

(-) Campo sin vasos sanguíneos detectables

10.3 ANEXO 3: Diámetros vasos sanguíneos TVT: Prueba χ^2

1. Valores Observados:

Diámetros (μm)	TVT Progresivo	TVT Regresivo	Valor marginal 2
<10,00	140	78	218
10,00-20,00	63	11	74
>20.00	10	0	10
Valor marginal 1	213	89	320(*)

2. Valores Esperados:

- Valor Esperado = $\frac{\text{Valor Marginal 1} \times \text{Valor Marginal 2}}{\text{Gran Total (*)}}$

Diámetros (μm)	TVT Progresivo	TVT Regresivo	Valor marginal 2
<10,00	153,75	64,25	218
10,00-20,00	52,20	21,80	74
>20.00	7,05	2,95	10
Valor marginal 1	213	89	320(*)

3. Cálculo de χ^2 :

$$\chi^2_{(n-2)} = \sum \frac{(\text{Observado (O)} - \text{Esperado (E)})^2}{\text{Esperado(E)}} = 15,93 \quad (\text{Valor Crítico } \chi^2_{(n-2)} : 5,99)$$

O	E	(O - E)	(O - E) ²	(O - E) ² /E
140	153,75	-13,75	189,06	1,23
63	52,20	10,80	116,64	2,23
10	7,05	2,95	8,7	1,23
78	64,25	13,75	189,06	2,94
11	21,80	-10,80	116,64	5,35
0	2,95	-2,95	8,7	2,95
			χ^2	15,93