

75450

MAFFRAND, CARMEN ISABEL

Miembros asociados como socios pasivos de sociedades y no de actividades de C. I. P.

2016

75450

REF

Classif:

T-1052



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Agronomía y Veterinaria

**“MARCADORES TUMORALES COMO VALORES PREDICTIVOS DE
MALIGNIDAD Y USO DE VINCRISTINA EN EL TUMOR VENEREO
TRANSMISIBLE CANINO”**

M.V./ Esp. Carmen Isabel Maffrand

**Doctorado Binacional en Ciencia, Tecnología e Innovación
Agropecuaria.**

2016

DIRECTORA

Dra. Cecilia Inés Merkis

Universidad Nacional de Río Cuarto


.....

CODIRECTORA

Dra. Griselda María González

Universidad Nacional de Río Cuarto

.....

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dr. Juan Tomás Wheeler

Universidad Nacional de Río Cuarto


.....

Dr. Rodolfo Esteban Avila

Universidad Nacional de Córdoba


.....

Dra. Mirta Ana Valentich

Universidad Nacional de Córdoba


.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto.

07.08.18

Lugar y fecha:

Calificación:

A mis amores.....

AGRADECIMIENTOS

A esta casa de altos estudios, la Universidad Nacional de Río Cuarto y a la Secretaría de Posgrado de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por el apoyo institucional.

A los miembros del Jurado Dr. Juan T. Wheeler, Dr. Rodolfo E. Ávila y Dra. Mirta A. Valentich porque con sus sugerencias enriquecieron el trabajo.

A mis maestros y alumnos. Muy especialmente a Oscar Forchetti, porque supo formarme sin egoísmos.

A Cecilia Merkis, amiga, dignísima maestra y guía, quien dirigió este estudio y siempre demostró su apoyo aún en momentos difíciles.

A Sandra Babini, Anabela Benzoni, Gricelda Morilla y Gabriela Cabral, porque con su ayuda incondicional, me permitieron cumplir con este sueño.

A Adrian Alcoba, Griselda Gonzales, Gabriela Sachis, Andrea Cristofolini, Mariana Fiorimanti, Nelcy Schleef, por la asesoría y la contribución en la elaboración del presente estudio.

A todos los colegas que aportaron datos.

Y muy especialmente:

A mis hijos, Francisco, Gastón, Mercedes y a mis hijos políticos, Lucía, Sofía, Fernando, porque me alentaron siempre, aún cuando creía que no iba a poder.

A mi madre, Matilde, porque soy lo que soy, gracias a ella.

A mis nietos, Juan Francisco, Salvador y Pedro, por robarles momentos de ensueño.

A mi amado esposo, Francisco, porque me alentó, me acompañó, me protegió, me cuidó y por sobre todas las cosas, porque creyó en mí.

Tesis de Posgrado: Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria.

Título: “Marcadores tumorales como valores predictivos de malignidad y uso de vincristina en el tumor venéreo transmisible canino”

Autora: Esp. M.V. Carmen Isabel Maffrand cmaffrand@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia Merkis

Lugar de trabajo: Departamento de Clínica Animal, Área de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto

RESUMEN

El Tumor Venéreo Transmisible (TVT) es frecuente en los caninos, con una alta presentación mundial. Al no tener un origen infeccioso, rompe con el paradigma del cáncer ya que infecta otros individuos a través de la transferencia directa de células cancerígenas. En este trabajo se evaluó el comportamiento biológico del tumor y el uso de marcadores tumorales como indicadores de malignidad y del manejo terapéutico con sulfato de vincristina en el TVT canino. Se realizó un análisis retrospectivo de 90 animales para el estudio epidemiológico y un ensayo observacional en 20 caninos con TVT de presentación espontánea, que fueron tratados con sulfato de vincristina (0,025 mg/Kg). Se obtuvieron muestras de sangre previo a cada quimioterapia para efectuar estudios hematológicos y bioquímicos. Se tomaron muestras tumorales para citología y biopsias destinadas a tinciones de hematoxilina/eosina, tinciones argénticas para Regiones Organizadoras de Nucléolos (AgNOR) y técnicas inmunohistoquímicas con kits comerciales para la determinación de Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y Ki67. Se realizaron estudios estructurales y ultraestructurales mediante microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de transmisión. El TVT se presenta mayormente en animales entre los 2 y 5 años de edad, en hembras (57,8%), en caninos mestizos (66,7%) y callejeros (61,9 %), con localización genital en un 73,3 %. La presentación extragenital fue significativamente mayor en machos ($p \leq 0.05$). Previo al tratamiento se observó anemia (35%), leucocitosis (40%), neutrofilia (40%), linfopenia (20%), monocitosis (35%) y eosinofilia (55%). La vincristina produjo una disminución de leucocitos y neutrófilos en todos los casos ($p \leq 0.0001$) con neutropenias en el 45%. Se observó un incremento de las β_2 globulinas que fue normalizándose con el avance del tratamiento. El 85% de los animales tratados presentó remisión del tumor. El promedio de AgNOR en los animales que respondieron a la vincristina fue de $3,1 \pm 1,3$ (previo al tratamiento) y de $1,4 \pm 0,8$ (post tratamiento) ($p: \leq 0.0002$). Los animales resistentes tuvieron un promedio de $4,1 \pm 1,6$ pre tratamiento y $5,3 \pm 2,3$ post tratamiento. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inmunomarcación para PCNA entre la etapa progresiva del tumor ($50,5\% \pm 15,8\%$) y la regresiva inducida por la vincristina ($55,2\% \pm 25,4\%$). En el 66,7% de los animales tratados, la inmunolocalización de Ki67 fue menor. La microscopía electrónica permitió observar cambios ultraestructurales durante el tratamiento con vincristina. En el TVT los marcadores tumorales estarían más asociados a una mayor velocidad de proliferación celular que a un comportamiento maligno. Su determinación luego de iniciada la quimioprofilaxis, es de utilidad pronóstica para seguir el tratamiento y evolución del TVT. Las herramientas metodológicas empleadas en este estudio permiten presentar resultados epidemiológicos y las técnicas inmunohistoquímicas aportan datos cuantitativos para el diagnóstico de TVT y el pronóstico de la terapéutica utilizada.

Tesis de Posgrado: Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria.

Título: “Marcadores tumorales como valores predictivos de malignidad y uso de vincristina en el tumor venéreo transmisible canino”

Autora: Esp. M.V. Carmen Isabel Maffrand cmaffrand@ayv.unrc.edu.ar

Directora: Dra. Cecilia Merkis

Lugar de trabajo: Departamento de Clínica Animal, Área de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

ABSTRACT

Transmissible Venereal Tumor (TVT) is common in dogs, with world high incidence. Not having an infectious origin, breaks the paradigm of cancer and infecting other individuals through the direct transfer of cancer cells. In this work were evaluated the biological behavior of the tumor and the use of tumor markers as indicators of malignancy and therapeutic management with vincristine sulfate in the canine TVT. A retrospective analysis of 90 animals for epidemiological studies and observational assay in 20 dogs with TVT spontaneous presentation, who were treated with vincristine sulfate (0.025 mg/Kg). The blood samples were obtained prior to each chemotherapy for hematological and biochemical studies. Tumor samples were taken for cytology and biopsies for hematoxylin / eosin staining, for Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) staining and immunohistochemistry with commercial kits for determining Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Ki67. Structural and ultrastructural studies were performed using microscopy optical high resolution (MOAR) and transmission electron microscopy. The TVT occurs mostly in animals between two and five years old, females (57.8%), in mixed breed dogs (66.7%), stray dogs (61.9%), with genital location (73,3 %). The extragenital presentation was significantly higher in males ($p \leq 0.05$). Pretreatment was observed anemia (35%), leukocytosis (40%), neutrophilia (40%), lymphopenia (20%), monocytosis (35%) and eosinophilia (55%). Vincristine produced a decrease of leukocytes and neutrophils in all cases ($p \leq 0.0001$) with neutropenia in 45%. It observed an increase in globulins β_2 that was normalized with the progress of treatment. The 85% of the treated animals showed tumor remission. The average AgNOR in animals that responded to vincristine was 3.1 ± 1.3 (before treatment) and 1.4 ± 0.8 (post treatment) ($p: \leq 0.0002$). Resistant animals had an average of 4.1 ± 1.6 pretreatment, and 5.3 ± 2.3 post treatment. No significant differences were observed in the percentage of PCNA between progressive tumor stage ($50.5\% \pm 15.8\%$) and vincristine-induced regressive ($25.4 \pm 55.2\%$). In 66.7% of treated animals, the immunolocalization of Ki67 was lower. Electron microscopy allowed to observe ultrastructural changes during treatment with vincristine. In the TVT, tumor markers would be more associated with increased cell proliferation rate more than malignant behavior. Determination of the tumors markers after initiation of chemoprophylaxis is of prognostic value for further treatment and evolution of TVT. The methodological tools used in this study allow us to present epidemiological findings and immunohistochemical techniques provide quantitative data for the diagnosis of TVT and prognosis of therapeutic.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Indice	iii
Índice de tablas	v
Indice de figuras	vii
Índice de abreviaturas	xii
1-INTRODUCCIÓN	1
Tumor venéreo transmisible	2
1.1 –Antecedentes generales	2
1.2 –Antecedentes epidemiológicos	5
1.3 –Transmisión y presentación clínica	6
1.4 –Anatomopatología	10
1.5 –Diagnóstico y pronóstico	10
1.6 –Inmunidad	24
1.7 –Tratamiento	27
2-HIPÓTESIS	32
3-OBJETIVOS	32
3.1 –Objetivo general	32
3.2 –Objetivos específicos	32
4-MATERIALES Y MÉTODOS	34
A-Animales	34
B-Obtención y análisis de las muestras	34
B.1-Muestra y estado del paciente	34
B.2-Muestras de sangre	35
B.2.1-Hemogramas	35
B.2.2-Determinaciones bioquímicas	35

	Página
B.2.3-Electroforesis de proteínas	36
B.3-Estadificación del tumor	36
B.4-Obtención de muestras del tumor	37
B.4.1-Obtención de muestras citológicas del tumor	37
B.4.1.1- Tinción de May Grünwald-Giemsa	41
B.4.1.2-Determinación de AgNor	41
B.4.2-Biopsias insicionales	42
B.4.2.1-Biopsia 1	42
B.4.2.1.1-Análisis histopatológico	43
B.4.2.1.2-Índice mitótico (IM)	44
B.4.2.1.3-Determinación de AgNOR	44
B.4.2.1.4-Técnicas de Inmunohistoquímica	44
B.4.2.1.4.1-Inmunohistoquímica para PCNA	45
B.4.2.1.4.2-Inmunohistoquímica para Ki 67	45
B.4.2.2-Biopsia 2	46
B.4.2.2.1- Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR).	46
B.4.2.2.2-Técnica convencional de microscopía electrónica de transmisión.	47
C-Tratamiento	47
C.1-Remisión del tumor	48
D-Análisis Estadístico	48
5-RESULTADOS	49
6-DISCUSIÓN	105
7-CONCLUSIÓN	118
8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Distribución de los animales con TVT en base a la edad.	50
II	Distribución de casos de TVT según la raza de los animales.	52
III	Valores de VGA, eritrocitos, hemoglobina y leucocitos de los caninos con TVT al momento de realizar el diagnóstico y previo a iniciar un tratamiento.	59
IV	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase progresiva del tumor (previo al tratamiento).	62
V	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (7 días después de iniciarse el tratamiento).	63
VI	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (14 días después de iniciarse el tratamiento).	63
VII	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (21 días después de iniciarse el tratamiento).	63
VIII	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (28 días después de iniciarse el tratamiento).	64
IX	Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (35 días después de iniciarse el tratamiento).	64
X	Valores promedios de plaquetas en animales previo al tratamiento (0 días) y en fase regresiva del tumor (a los 7, 14 y 21 días post tratamiento).	68
XI	Porcentaje de animales que cursan con trombocitopenias y trombocitosis en la etapa progresiva y regresiva inducida por el tratamiento.	68
XII	Valores promedio de proteínas totales, albumina, globulinas totales y diferenciales antes y durante el tratamiento con vincristina.	72
XIII	Variación del IM (%) en 5 de los casos que respondieron al tratamiento con Vincristina.	80
XIV	Valores promedio de AgNOR/ célula de TVT en los pacientes que tuvieron una mala respuesta al tratamiento con vincristina y sus correspondientes estadísticos.	84
XV	Valores promedio de AgNOR/ célula de TVT en tumores previo al tratamiento con vincristina y sus correspondientes estadísticos.	86

Tabla		Página
XVI	Valores promedio de AgNOR/ célula de TVT y sus correspondientes estadísticos en pacientes que respondieron al tratamiento con vincristina, a los 7 días de iniciado el tratamiento.	87
XVII	Número de puntos AgNOR en muestras citológicas e histológicas.	90
XVIII	Porcentaje de inmunomarcación para Ki67 en muestras histológicas de caninos con TVT, obtenidas previo y posterior al tratamiento con Vincristina.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1-A	Distribución y prevalencia mundial, por país, de casos de TVT.	6
1-B	Promedio de prevalencia reportado por continente Distribución de casos de TVT según la raza de los animales.	6
2	Paciente con crecimiento tumoral en piel de prepucio.	8
3	Crecimiento tumoral intranasal.	9
4	Células redondas correspondientes a un histiocitoma. Tinción de MGG. (1000x).	13
5	Células redondas correspondientes a un linfoma maligno. Tinción de MGG. (400x).	14
6	Células redondas correspondientes a un linfoma maligno. Tinción de MGG. (1000x).	15
7	Fases del ciclo celular	17
8	Esquema de distribución de los puntos de AgNOR.	20
9	Estructura de la proteína PCNA.	21
10	Interacción entre PCNA y los caminos de regulación del ciclo celular.	22
11	Estructura de la proteína MKi67.	23
12	Planta de <i>Catharanthus roseus</i> .	28
13	Fórmula estructural de la vincristina.	29
14	Elución de las distintas fracciones de proteínas.	37
15	PAAF de una masa tumoral localiza en piel y subcutáneo.	38
16	PAAF de una masa tumoral localizada en cavidad abdominal, guiada por ecografía.	38
17	Depósito de la muestra obtenida por PAAF, en un extremo del portaobjeto.	39

Figura		Página
18	Toma de muestra con hisopo en una hembra.	40
19	Toma de muestra con hisopo en un macho.	40
20	Rotación del hisopo sobre el portaobjeto de una muestra de tumor obtenida por hisopado.	41
21	Biopsia insicional de un TVT localizado en el glande.	42
22	Cortes de tejido conservados en formol tamponado.	43
23	Porcentaje de caninos hembras y machos que presentaron TVT.	49
24	Distribución por categoría de animales con TVT según la edad de los mismos.	51
25	Distribución de casos de TVT según la raza.	51
26	Porcentaje de animales con TVT según su hábitat de vida.	53
27	Distribución de casos de TVT según la localización anatómica de la masa tumoral.	54
28	Presentación clínica del TVT. Tumor genital, localizado en el vestíbulo vaginal.	55
29	Radiografía latero-lateral de abdomen, imagen radiolúcida a ventral del recto.	55
30	Imagen ecográfica. Masa hipoecogénica, a craneal de la vejiga.	56
31	Presentación clínica del TVT. Tumor localizado en la base del pene.	56
32	Presentación clínica del TVT. Tumor localizado en el glande y extremo anterior del pene.	57
33	Presentación clínica del TVT. Tumor localizado en mucosa bucal.	57
34	Representación gráfica de animales que presentaron anemia, policitemia y sin alteraciones eritrocitarias.	58

Figura		Página
35	Porcentaje de animales que cursó con anemia previo y durante el tratamiento.	60
36	Magnitud de la hemorragia que puede producirse en relación al TVT.	61
37	Representación gráfica en base al total de leucocitos.	62
38	Concentración de leucocitos en sangre, antes y durante el tratamiento con vincristina.	65
39	Concentración de neutrófilos en la etapa previa y durante el tratamiento con vincristina.	66
40	Concentración de eosinófilos en la etapa previa y durante el tratamiento con vincristina.	67
41	Variación leucocitaria total y diferencial previa y durante el tratamiento con vincristina.	67
42	Variación en la actividad de ALT previo y durante el tratamiento con vincristina.	69
43	Variación en la concentración de urea y creatinina sérica previo y durante el tratamiento con vincristina.	70
44	Concentraciones de urea, previo y durante el tratamiento con vincristina.	70
45	Electroforesis de proteínas sobre acetato de celulosa.	71
46	Representación gráfica de PT, Alb y Glob previo y durante el tratamiento con vincristina.	72
47	Representación gráfica de las diferentes globulinas previo y durante el tratamiento con vincristina.	73
48	Microfotografía de una muestra citológica de TVT. Células neoplásicas. Tinción de MGG. (1000x).	74
49	Microfotografía de una muestra citológica de TVT. Células neoplásicas, linfocitos y células plasmáticas. Tinción de MGG. (1000x).	75
50	Fotografía de una muestra citológica de TVT obtenida por hisopado de superficie. Tinción de MGG. (1000x).	76

Figura		Página
51	Microfotografía de TVT, teñida con H/E. Células tumorales. Tinción de H/E. (1000x).	77
52	Microfotografía de TVT. Células tumorales e infiltrado linfoplasmocitario. Tinción de H/E. (400x).	77
53	Microfotografía de TVT . Infiltrado linfoplasmocitario en la periferia del tumor. Tinción de H/E. (400x).	78
54	Microfotografía de TVT, en etapa regresiva. Tinción de H/E. (1000x).	79
55	Indice mitótico en cortes histológicos de TVT, previo y 7 días posterior a la aplicación de vincristina.	80
56	Indice mitótico en cortes histológicos de TVT, previo, 7 y 14 días posteriores al tratamiento con vincristina.	81
57	Microfotografía óptica utilizando la tinción de AgNOR (promedio: 3,1 puntos/célula de TVT. Tinción de plata (1000x).	83
58	Microfotografía óptica utilizando la tinción de AgNOR, (promedio: 2,3 puntos/célula de TVT. Tinción de plata (1000x).	83
59	Promedios de AgNOR en cortes histológicos del caso 20.	85
60	Promedios de AgNOR en cortes histológicos de 2 casos resistentes al tratamiento con vincristina.	88
61	Promedios de AgNOR en pacientes con buena respuesta al tratamiento, en fase progresiva y regresiva.	88
62	Variación de los puntos AgNOR en tumores en fase progresiva y regresiva.	89
63	Microfotografía de muestra citológica. AgNORs, eritrocitos y neutrófilos. Tinción de plata, (1000x).	89
64	Microfotografía de muestra citológica. AgNOR. Extendido hiper celular. Tinción de plata, (1000x).	90
65	Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para PCNA en muestras histológicas en etapa progresiva. (1000x).	91
66	Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para PCNA en muestras histológicas en etapa regresiva. (1000x).	92

Figura		Página
67	Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en 12 casos de TVT que respondieron al tratamiento con sulfato de vincristina.	93
68	Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en el caso 20.	94
69	Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en el caso 21.	94
70	Variación de los porcentajes de marcación para PCNA.	95
71	Inmunomarcación para Ki67 en muestras histológicas en etapa progresiva del tumor. (1000x).	96
72	Inmunomarcación para Ki67 en muestra histológica en etapa regresiva del tumor . (1000 x).	96
73	Porcentaje de inmunomarcación para Ki67 en 6 casos de TVT previo y posterior al tratamiento.	97
74	Microfotografía óptica de corte semifino correspondiente a una biopsia en etapa de crecimiento progresivo. (MOAR). (1000x).	99
75	Microfotografía óptica de corte semifino de una biopsia durante el tratamiento con vincristina, (MOAR). (1000x).	100
76	Microfotografía electrónica de células de TVT previo al tratamiento. (5000x).	101
77	Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT, previo al tratamiento. (6000x).	102
78	Microfotografía electrónica de células de TVT, previo al tratamiento. (10000x).	103
79	Microfotografía electrónica de células de TVT, en fase regresiva. (5000x).	103
80	Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT en fase regresiva. (12000x).	104
81	Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT, en fase regresiva. (6000x).	104

INDICE DE ABREVIATURAS

Ag:	plata
AgNOR:	regiones organizadoras nucleolares argirófilas
ADN:	ácido desoxirribonucleico
Alb:	albúmina
ARN:	ácido ribonucleico
ARNr:	ácido ribonucleico ribosómico
B:	basófilos
cm:	centímetros
CDK:	quinasas dependiente de ciclinas
CHCM:	concentración de hemoglobina corpuscular media
CoEdI:	comité de ética de la investigación
CV:	coeficiente de variación
DE:	desvío estándar
E:	eosinófilos
EV:	endovenosa
Fig:	figura
FN:	falsos negativos
FP:	falsos positivos
Glob:	globulina
gr:	gramos
Graf.:	gráfico
h:	hora
H/E:	hematoxilina y eosina
IgG:	inmunoglobulina G
IL2:	interleuquina 2
IL6:	interleuquina 6
IM:	índice mitótico
kDa:	Kilodalton
Kg:	Kilogramo
L:	Linfocitos
LAK:	las células “killer” activadas por citoquinas.
Lt:	Litro
LT:	leucocitos totales
M:	Molar

Mo:	Monocitos
m ² :	metro cuadrado
mg:	Miligramo
MGG:	May Grünwald Giemsa
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
Min:	Minutos
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
mm ³ :	milímetro cúbico
MOAR:	microscopía óptica de alta resolución
n:	número de muestras
N:	Neutrófilos
NB:	neutrófilos baciliformes
NK:	natural killer
Nm:	Nanómetros
NORs:	regiones organizadoras nucleolares
OMS:	organización mundial de la salud
PAAF:	punción aspiración con aguja fina
PBS:	solución tampón fosfato salina
PCNA:	antígeno nuclear de proliferación celular
PP1 γ :	fosfoproteína fosfatasa 1
PT:	proteína total
TGF- β 1:	factor de crecimiento transformante beta 1
TILs	linfocitos que infiltran el tumor
TNM:	tumor, nódulo, metástasis
TVT:	tumor venéreo transmisible
UBF	factor de transcripción nucleolar
UICC	Union for International Cancer Control
UNRC:	Universidad Nacional de Río Cuarto
V:	Volts
VCM:	volumen corpuscular medio
VGA:	volumen globular aglomerado
VP:	verdaderos positivos
α 1	alfa-1 globulinas
α 2	alfa-2 globulinas
β 1	beta-1 globulinas
β 2	beta-2 globulinas

γ gama globulinas
μl: Microlitro
μm: micra, micrón o micrómetro

INTRODUCCIÓN

1-INTRODUCCIÓN:

Una neoplasia es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento está descoordinado y excede al del tejido normal y que, además, su crecimiento persiste luego de haber cesado el estímulo que provocó el cambio (Willis, 1952). En relación a su comportamiento clínico-biológico, se clasifican en benignas y malignas. Una neoplasia benigna tiene un crecimiento limitado de células que parecen estar bajo cierto control y aunque no hay un propósito aparente de este crecimiento, las células son más maduras y se semejan morfológicamente a aquellas del tejido que derivan, son masas bien delimitadas que permanecen localizadas, sin diseminarse a otros tejidos (Stephens y Aigner, 2009). Un crecimiento maligno está caracterizado por ser continuo, indeseado, descontrolado y perjudicial y las células difieren estructural y funcionalmente de las células normales. El término comúnmente usado para este tipo de crecimiento es: cáncer, término que deriva del latín y significa “cangrejo”, ya que antiguamente se pensaba que el cáncer se semejaba al cangrejo, con sus “garras” invadiendo tejidos circundantes (Stephens y Aigner, 2009). El proceso de proliferación celular, normalmente se encuentra bajo un control estrictamente equilibrado y el cáncer se desarrolla cuando este control genético se pierde o se daña en una o más células, que luego proceden a dividirse y producir nuevas células anormales (Stephens y Aigner, 2009).

La predisposición a las neoplasias y su incidencia se manifiesta de manera diferente entre las especies domésticas, siendo una de las más afectadas el canino (Zaldívar Quintero *et al.*, 2002). Sin embargo, los tipos de cáncer y la prevalencia pueden modificarse en base a la edad, sexo y raza de los individuos, así como también, según las características ambientales, económicas y regiones geográficas a las que pertenezcan (Stephens y Aigner, 2009). Los perros y gatos podrían tener importancia como centinelas de vigilancia epidemiológica debido a que comparten el mismo ambiente con el humano (Nielsen, 1983; Flores, 1986).

TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE

1.1-Antecedentes Generales

Hasta 1858, existía una creencia de que los tumores eran una enfermedad propia del hombre. El reconocimiento de que los tumores ocurrían en animales, fue de fundamental importancia para el estudio experimental de las neoplasias, siendo numerosos los veterinarios que han hecho contribuciones importantes a la investigación cancerológica (Flores, *et al*, 2000).

Entre los tumores frecuentes en los caninos, se encuentra el denominado Tumor Venéreo Transmisible (TVT), descrito inicialmente por Novinsky en 1876, un veterinario de nacionalidad rusa, considerado como el "padre de la oncología experimental", pues fué quien realizó el primer trasplante exitoso del TVT de un animal a otro en el laboratorio y publicó los resultados en su tesis de grado en 1877, "On the Question of the inoculation of malignant neoplasms (experimental investigations)".

Este tumor afecta también a otros cánidos como zorros, coyotes y lobos, sin embargo no hay evidencia de transferencia a otras especies aún con inoculaciones experimentales realizadas en ratas, ratones, hamsters y gatos (Cockrill y Beasley, 1979).

El origen celular exacto del TVT no está claro, es por ello que a través del tiempo ha recibido según los investigadores, distintas denominaciones, como: sarcoma o tumor de Sticker en honor al autor de las primeras publicaciones, (Sticker, 1906), condiloma canino por cierta similitud con el condiloma humano; linfosarcoma venéreo, linfosarcoma infeccioso, linfosarcoma transmisible, sarcoma infeccioso, histiocitoma y mixosarcoma. Basado en su morfología las células de TVT han sido clasificadas como linfocitos, histiocitos, células reticulares y células retículoendoteliales maduras (Moulton, 1990).

Estudios inmunohistoquímicos muestran inmunopositividad para vimentina, lisozima, alfa 1 antitripsina, anti-enolasa neuronal específica (NSE) y proteína ácida fibrilar glial, entre otros, (Mozos *et al.*, 1996; Marchal *et al.*, 1997) insinuando compatibilidad con células

histiocíticas (Scott *et al.*, 2002; Mukaratirwa *et al.*, 2004). Por otra parte, presentan una inmunodetección negativa con respecto a citoqueratinas, proteína S100 y marcadores musculares. Estudios recientes de Gross *et al.*, (2005) y Mascarenhas *et al.*, (2014) demostraron que son negativos a lisozima y CD 18, lo cual no soportaría el origen histiocítico sugerido por Mozos *et al.*, (1996) y Marchal *et al.*, (1997), aunque algunas teorías apuntan a considerar a las células de TVT como leucocitos inmaduros indiferenciados, sugiriendo un origen mielóide ya que expresa CD45 y CD45RA pero no beta-2 ni CD1 (Goldschmidt y Hendrick, 2002; MacLachlan y Kennedy, 2002).

Según Ostrander *et al.*, (2015), los tumores transmisibles, que no tienen un origen infeccioso, rompen con el paradigma del cáncer ya que trascienden las barreras de sus incipientes huéspedes mediante la habilidad de infectar otros individuos a través de la transferencia directa de células cancerígenas que se vuelven clones cancerígenos parásitos. Uno de los tumores transmisibles por aloinjerto, de aparición más reciente, diagnosticado por primera vez en 1996 en la isla de Tasmania (Australia), es el tumor que afecta al demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*), el mayor marsupial carnívoro conocido. La transmisión puede ocurrir por mordeduras, alimentarse del mismo material, apareamiento agresivo u otras interacciones sociales. El tumor se desarrolla en cara y cabeza, es ulcerativo y causa la muerte por asfixia o inanición, dentro de los 6 meses de iniciado el mismo, lo que está llevando a la población marsupial al peligro de extinción, (Jones *et al.*, 2004; Hawkins *et al.*, 2006).

El tumor transmisible más estudiado es el TVT, por ser el linaje celular propagado más antiguo. Debido al carácter de transmisión que tiene el TVT, se consideró en un principio la posible intervención de algún agente infeccioso como virus o bacterias clamideas. Algunos autores (Cockril y Beasley, 1975; Amber *et al.*, 1985 y Trigo, 1993) atribuyeron esta neoplasia a agentes virales, sin embargo, el tumor no puede ser transmitido por extractos libres de células (DeMonbreun y Goodpasture, 1934; Calvet, 1993; Rogers, 1997) y no se han observado partículas virales por microscopía electrónica (Moulton, 1990). La transmisión clonal fue inicialmente sugerida debido al éxito obtenido por los investigadores pioneros como Novinsky (1876) y Sticker (1906) quienes demostraron que el TVT se podía transmitir por la transferencia directa de células de TVT o tejidos tumorales. Las propias células neoplásicas son los vectores de transmisión hacia las mucosas genitales durante el contacto físico a través

del coito (Purohit, 2009) y también en mucosas orales y nasales por las conductas asociadas de lamido y olfateo (Cohen, 1985). La pérdida de integridad de la mucosa favorece la transmisión (Vermooten, 1987).

El cariotipo de la célula de TVT presenta 57-59 cromosomas, y se han propuesto dos linajes, uno en coyotes y el otro en zorros grises y perros domésticos (*Canis lupus*). Estos datos sugieren que el TVT se originó en el período de pre domesticación del *Canis lupus* (Rebbeck *et al.*, 2009). Estudios genéticos de microsatélites, ADN mitocondrial y genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) mostraron que en los cinco continentes el TVT deriva de un mismo clon neoplásico (Murgia *et al.*, 2006). Estudios epidemiológicos realizados con el uso de ADN mitocondrial identificaron una fuerte relación entre los haplotipos de tumores en México, Estados Unidos, Chile y Brasil. En Asia, los haplotipos son divergentes, aunque más relacionados al haplotipo Americano, lo que sugiere que el tumor en Estados Unidos, deriva del linaje asiático (Bautista Gomez *et al.*, 2011). Esta notable similitud entre los TVT aislados de diferentes continentes durante varios años, indicaría que no solo se distribuye globalmente sino que también, a pesar de su aneuploidía el cariotipo clonal es relativamente estable, ya que todos los canidos afectados comparten una identidad genética (Murchison, 2009; Ostrander *et al.*, 2015). El mismo cariotipo se mantiene en cultivos celulares del tumor y su figura histológica no es alterada por transferencia pasiva (Adams *et al.*, 1968; Mukaratirwa *et al.*, 2004).

Hay estudios que indican que los ancestros genéticos del TVT se relacionan más con los lobos y que datarían de 7.800 y 78.000 años atrás. El verdadero origen por lo tanto es incierto, pero se estima que entre 6000 y 11000 años sería lo más real o verdadero (Ostrander *et al.*, 2015). Así, el TVT sería la línea de células somáticas conocida más antigua (Murgia *et al.*, 2006; Rebbeck *et al.*, 2009).

1.2- Antecedentes epidemiológicos

El TVT presenta una distribución geográfica muy amplia y se lo ha descripto, principalmente en países en vías de desarrollo, habiendo desaparecido en muchas áreas de países de norteamérica y europeos (Flores *et al.*, 1997, Ganguly *et al.*, 2013), como es el caso de Canadá, Reino Unido y Suiza, siendo erradicada también de Nueva Zelandia, y todo ello debido a un alto nivel de vigilancia veterinaria. El TVT afecta entre un 1 y 10% de perros en Africa, Asia, Sudamérica y América Central, con una alta incidencia en Belice (10-20%) (Strakova y Murchison, 2014) y prevalencias mayores al 20% en países índicos (Das y Das, 2000), con un comportamiento enzoótico en el sur oeste de Francia, Puerto Rico y las Bahamas, (Figura 1).

Su difusión estaría asociada a climas subtropicales o tropicales, de temperaturas cálidas y a perros vagabundos y sexualmente activos, con edades variables, (Caponi *et al.*, 1999; Sousa *et al.*, 2000; Bassani Silva, 2008; Pineda *et al.*, 2010; Uma Rani y Pazhanivel, 2015), sin diferencias en relación a raza o sexo (Brown *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1982; Mac Ewen, 1992; Amaral *et al.*, 2004; Murchison, 2008; Strakova *et al.*, 2014) aunque algunos autores determinaron que el 54% a 64% de los casos son de raza mestiza siendo más frecuente en hembras (57% a 72%) (Flores *et al.*, 1993; Gurel *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2003, Mendoza, 2006; Alvarez Espinoza, 2010). Pineda *et al.*, (2010) informaron una mayor presentación en machos. En los perros de raza, diversos estudios coinciden en un predominio de TVT en las razas de alzada grande. Factores que favorecen su diseminación son la presencia de perros vagabundos con alta capacidad de desplazamiento, la cual, no es afectada por esta patología que aún constituyendo grandes masas sangrantes, no es invalidante. (Flores *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000; Bassani Silva, 2008; Ganguly *et al.*, 2013). En nuestra región, no hay estudios previos de la incidencia de TVT ni de su comportamiento epidemiológico, a pesar de ser una patología que se diagnostica con cierta frecuencia. La ciudad de Río Cuarto está dentro del Departamento del mismo nombre, en la zona sur de la provincia de Córdoba, en la región centro de Argentina, incerta en una zona cálida, en las coordenadas 33° 7' 25.57" S, 64° 20' 56.38", la misma se identifica con una flecha en la Figura 1.

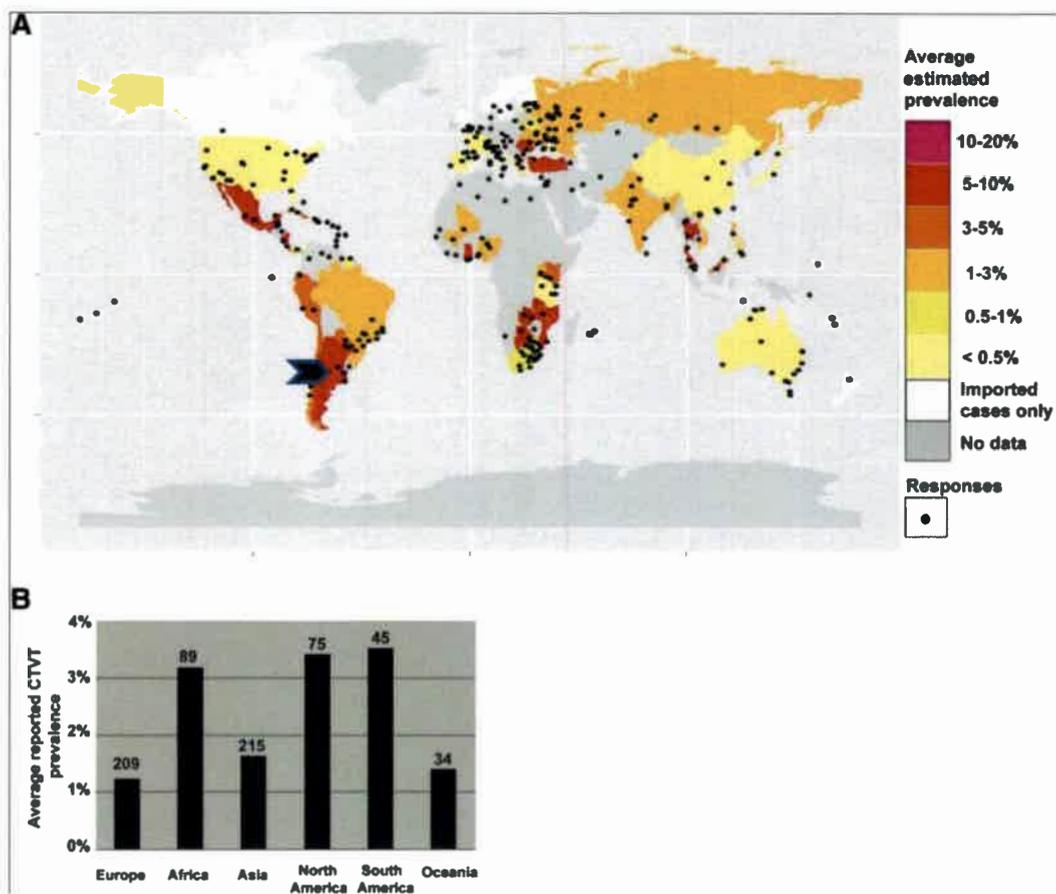


Figura 1. A: distribución mundial y prevalencia estimada, por país, de casos de TVT. El color de cada país representa el promedio de prevalencia estimada. La localización de cada información aportada por cada país está indicada por los puntos negros. La flecha indica el área geográfica perteneciente a la ciudad de Río Cuarto. B: promedio de prevalencia de TVT reportado por continente. El número de casos reportados para estimar la prevalencia en cada continente se muestra sobre las barras. Adaptado de

1.3-Transmisión y presentación clínica

El contagio natural es por transplante de células tumorales viables exfoliadas desde el perro portador a un receptor sano o a veces por un autotransplante a partir del tumor primario (Figura 2 y 3), en un sitio anatómico susceptible, mediante principalmente el coito, aunque

también, por mordeduras, rascado, lamido y olfateo. La susceptibilidad está dada por la presencia de abrasiones en las superficies mucosas penianas, vaginales, nasales, orales, o incluso soluciones de continuidad en la piel (Moulton, 1990; Trigo, 1998; Flores *et al.*, 2000, Ferreira, 2003, Ganguly *et al.*; 2013).

La transmisión experimental debe hacerse con células tumorales viables mediante inyecciones cutáneas, intravenosas o intraperitoneales, ya que ésta transmisión no puede producirse con células tumorales que hayan sido congeladas, calentadas, tratadas con glicerina o desecadas (Moulton, 1978 y Scott *et al.*, 2002).

El tumor aparece luego de 15 a 60 días después de la implantación. Experimentalmente crece rápido (fase progresiva), tiene una fase estable y regresa espontáneamente (fase regresiva), esto ocurre antes o alrededor de los 6 meses de ser visible la neoformación (Joseph, 1993; Ferreira, 2003; Ganguly *et al.*, 2013). La regresión espontánea, no ocurriría en la presentación natural, (Scott *et al.*, 2002) donde produce lesiones únicas o múltiples, afectando el estado general del animal, siendo siempre necesario realizar tratamiento. En los machos, las lesiones se localizan frecuentemente en pene, prepucio o glande (Figura 2) y en las perras, en el vestíbulo y canal vaginal, protruyendo a través de los labios vulvares y deformando la región perineal (Flores *et al.*, 2000; Nelson y Couto, 2010). Es frecuente observar un lamido excesivo de los genitales y secreciones mucosas y hemorrágicas ya que los tumores sangran fácilmente. La descarga hemorrágica inicialmente puede ser confundida con el estro, uretritis, cistitis, o prostatitis y es debido a la fragilidad de la masa. (Rogers, 1997; Flores *et al.*, 1999). Hasta el presente se conoce que muchos de los animales que sufren TVT desarrollan policitemia, lo cual podría ser de valor diagnóstico, sin embargo esto aún necesita ser validado (Cohen, 1985; Withrow y Mac Ewen, 1996; Purohit, 2009).

Se observa una alta incidencia de infecciones urinarias en perros con TVT, debido posiblemente a la obliteración del orificio uretral por el tumor, con retención urinaria. (Batamuzi y Kristensen, 1996).

El TVT puede crecer lentamente por años o puede ser muy agresivo e invasivo localmente y tener un comportamiento maligno, metastizando a diversos órganos (Lombard y Cabanie, 1968; Moulton, 1990; Ferreira *et al.*, 2000; Silva, 2007; Ramirez *et al.*, 2015). Las implantaciones extragenitales cutáneas, de mucosa nasal, oral, ocular y anal son poco frecuentes (Papazoglou *et al.*, 2001; Gurel *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2014) (Figura 3). Los tumores de localización ocular pueden crecer en la conjuntiva y en el párpado causando ceguera (Moulton, 1978; Ferreira *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2002).



Figura 2. Paciente con crecimiento tumoral en piel de prepucio. El tumor se observa ulcerado y sangrante. Gentileza de: Dr. Alcoba Adrián.

Los signos clínicos dependen de la localización del tumor observándose epistaxis, estornudos, epífora, halitosis, pérdidas dentarias, exoftalmos, deformaciones cutáneas, faciales, orales, hasta agrandamiento de ganglios linfáticos. En casos avanzados hay

dificultad respiratoria y fistulas oronasales. En localizaciones orales, puede observarse dificultad al ingerir los alimentos y deformación maxilar (Rogers, 1997; Papazoglou *et al.*, 2001; Purohit, 2009).



Figura 3. Crecimiento tumoral intranasal. El tumor genera deformación facial y se presenta ulcerado. Corresponde al mismo paciente de la Figura 2. Gentileza de: Dr. Alcoba Adrián.

Se ha demostrado que el sistema inmune del huésped tiene un rol fundamental en la inhibición o el desarrollo del crecimiento del tumor y la metástasis (Cohen, 1973 y 1985). La ocurrencia de metástasis es entre un 1,5 y 6% (Ferreira *et al.*, 2000), y hasta un 17 y 22% (Rogers, 1997; MacEwen, 2001; Santos do Amaral *et al.*, 2007); si esto ocurre, es a subcutáneo, nódulos linfáticos regionales, inguinales, parapeneanos e ilíacos, hígado, bazo,

cerebro, pituitaria, pulmones y aunque menos frecuente, en las perras, el tumor puede afectar el tracto genital interno, comprometiendo cérvix, útero, oviducto y ovario. (Aprea *et al.*, 1994, Flores *et al.*, 1997; Bastan *et al.*, 2008; Alcoba *et al.*, 2014). La metástasis se desarrolla en animales inmaduros y en caninos inmunosuprimidos (Vermooten, 1987; Yang, 1988; Scott *et al.*, 2002). En estos casos, la presentación clínica puede ser muy variada, dependiendo de la localización anatómica de la metástasis.

1.4-Anatomopatología

Macroscópicamente el tumor puede ser solitario o multifocal. En el desarrollo del tumor, inicialmente se observan pequeños nódulos rojizos localizados a nivel dermo-epidérmico. En la hembra, el tumor usualmente se encuentra en la parte posterior de la vagina y en la vulva. Las implantaciones se dan en la submucosa de la pared vaginal y se desarrollan como proliferaciones papilares que penetran y atraviesan el epitelio, alcanzando la luz de la vagina. En el macho es común ubicarlo en la base del pene; pero también puede encontrarse en el glande y prepucio (Moulton, 1978; Jubb *et al.*, 1992; Ferreira, 2003; Nak *et al.*, 2005). El tumor puede crecer con una base de implantación amplia o pedunculada, nodular o multilobular. Los nódulos coalescen formando una malla hemorrágica con aspecto de coliflor que puede llegar a tener desde 0,5 hasta 10 cm de diámetro (Murray *et al.*, 1969; Moulton, 1990; Mello Martins *et al.*, 2005). La consistencia puede ser firme aunque frecuentemente es friable y el color variable desde crema, rojo grisáceo a rojo, a menudo se observan sobre la superficie tumoral áreas de hemorragia y necrosis con infección bacteriana supurativa (MacEwen, 1992, Scott *et al.*, 2002).

1.5-Diagnóstico y pronóstico

El diagnóstico precoz es la mejor herramienta utilizada tanto en medicina veterinaria como humana para el control de tumores. Con respecto al TVT, su ubicación en las mucosas

hace que el diagnóstico clínico resulte muy importante en la detección de la neoplasia. Es necesario realizar una anamnesis detallada, teniendo en cuenta principalmente el historial reproductivo y contacto con perros callejeros y hacer una exploración clínica minuciosa, con palpación de ganglios linfáticos regionales, palpación digital vía vaginal o rectal, exploración vaginoscópica en las hembras y exposición del pene en machos, además de una exploración ecográfica (Flores *et al.*, 1999). La observación de signos clínicos compatibles hace sospechar de la neoplasia.

El examen histopatológico constituye un método diagnóstico confiable ya que permite además de la tipificación, la graduación del tumor, teniendo en cuenta la valoración de factores como infiltración vascular, cutánea y de tejidos blandos y otras variables como grado de diferenciación, grado de pleomorfismo nuclear, índice mitótico, apoptosis, necrosis y compromiso de los bordes de la pieza quirúrgica (Elston y Ellis, 1993; Santos *et al.*, 2001; Cullen *et al.*, 2002). Los criterios histopatológicos de los tumores están representados por anaplasia de las células tumorales, por crecimiento invasivo que destruye y sustituye a los tejidos normales circundantes, por rápido crecimiento autónomo y por metástasis mediante permeación linfática, siembras hematógenas o implantación. Es por ello que a pesar de los avances en el uso de marcadores de neoplasias malignas, el diagnóstico práctico de cáncer, todavía se limita en muchos casos al estudio histológico (Takahashi, 1985). Sin embargo, en las tinciones de rutina con Hematoxilina-Eosina, las diferencias citoplasmáticas y nucleares entre el TVT y los histiocitomas suelen ser sutiles (Thangathurai *et al.*, 2008).

La citología exfoliativa obtenida por punción aspiración con aguja fina (PAAF), raspados, improntas o hisopados, es utilizada para el diagnóstico de las neoplasias, aún cuando carece de estructura histológica, dependiendo solo de la morfología y de la dediferenciación de las células tumorales (Griffiths *et al.*, 1984; Takahashi, 1985; De la Sota *et al.*, 2004; Thangathurai *et al.*, 2008, Cowell *et al.*, 2009). Cuando las masas tumorales comprometen órganos internos, es de mucha utilidad realizar la PAAF guiada por una imagen ecográfica.

El TVT pertenece al grupo de tumores denominados de células redondas entre los que se encuentran además los linfomas, histiocitomas, mastocitomas, melanomas, y actualmente se incluyen también en este grupo a los osteosarcomas (Nelson y Couto, 2010). La morfología celular de estos tumores es bastante característica lo cual permite su identificación, aunque las diferencias entre ellos, a veces suelen ser sutiles (Ulčar *et al.*, 2012). La diferenciación morfológica del TVT con los histiocitomas puede ser dificultosa, teniendo algunas características en común (Guvenc *et al.*, 2002). En el histiocitoma canino se pueden presentar tres tipos de células: unas redondas o ligeramente ovales, con núcleos redondos, múltiples nucléolos, con escaso citoplasma de color azul pálido, con ocasionales vacuolas citoplasmáticas (Figura 4), otras células mas fusiformes de aspecto fibroblástico y por último, células gigantes multinucleadas con abundante citoplasma (Cowell *et al.*, 2009; de Buen de Argüero y Guzman Becerril, 2014). En las lesiones en regresión, se observa un número variable de linfocitos pequeños, bien diferenciados, probablemente células T citotóxicas, que a veces suelen ser predominantes (Gonzalez *et al.*, 2000; Raskin, 2010).

Así también, puede ser dificultosa la diferenciación entre un linfosarcoma o linfoma maligno, un plasmocitoma y un TVT cuando la localización es extragenital (Kutzler, 2013). En los linfomas las células son redondas, con núcleos redondos, o indentados, con nucléolos prominentes con escaso citoplasma (Figura 5 y 6) y en los plasmocitomas, las células plasmáticas son redondas a ovales con núcleos predominantemente redondos, cromatina condensada, cantidad variable de citoplasma levemente basófilo, con un halo pálido perinuclear, con ocasionales vacuolas pequeñas y a diferencia del TVT, muestran escasa actividad mitótica (Cowell *et al.*, 2009; Raskin, 2010; de Buen de Argüero y Guzman Becerril, 2014). El diagnóstico, por lo tanto, debería basarse además en criterios clínicos e histopatológicos (Cangul, 2001).

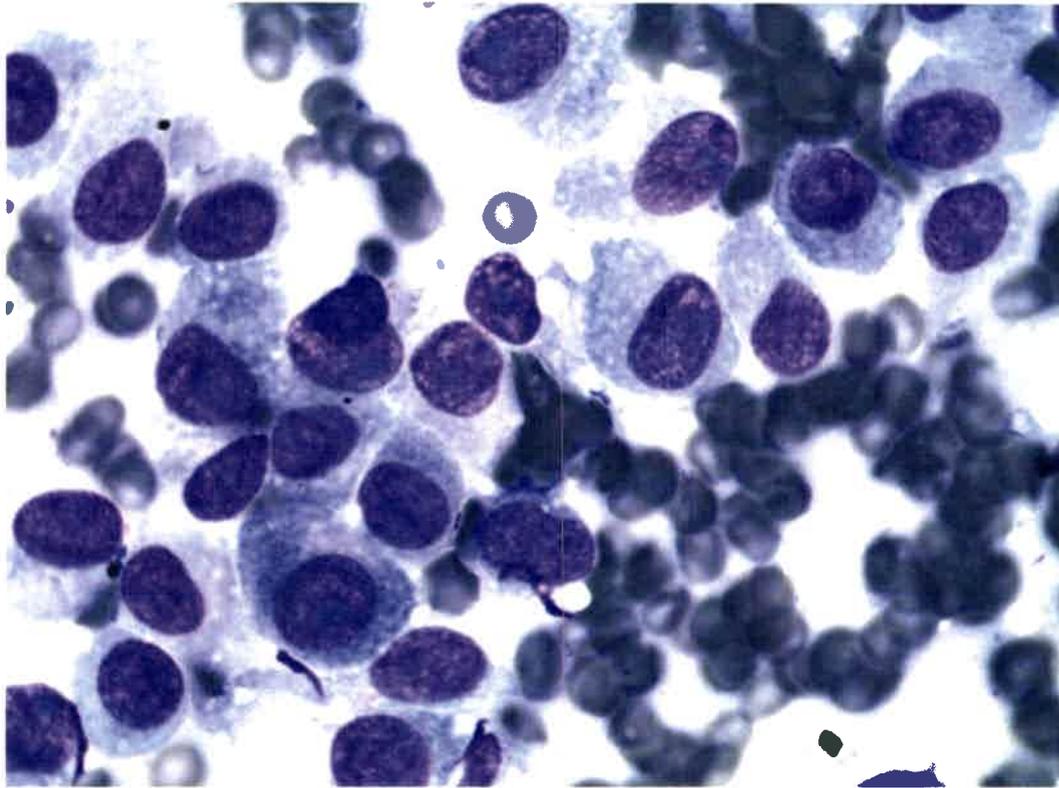


Figura 4. Células redondas correspondientes a un histiocitoma. Las células neoplásicas son redondas o ligeramente ovales, con núcleos redondos, nucléolos grandes ó múltiples, con escaso citoplasma de color azul pálido. Tinción de MGG. (1000x).

Esta similitud de las células de TVT con otras células de tumores de células redondas hace que el diagnóstico diferencial sea de máxima utilidad para definir el modelo terapéutico y determinar las probabilidades de recurrencia del tumor. Las células de TVT son redondas, con núcleos redondos, grandes, cromatina gruesa, uno o dos nucléolos prominentes, citoplasma ligeramente basófilico con múltiples vacuolas. Sin embargo, existen algunos parámetros morfológicos, tales como pleomorfismo, anisocitosis, anisocariosis, criterios nucleares como agregados cromatínicos groseros, nucléolos grandes y múltiples (Gurel *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2006; Raskin y Meyer, 2010; Ulčar *et al.*, 2012; Ramirez *et al.*, 2015) que permiten establecer el grado de malignidad de las neoplasias, a pesar de tener un fuerte componente subjetivo. Otros autores (Amaral *et al.*, 2004 y 2012; Flórez *et al.*, 2012), en

lugar de clasificar las células de TVT como típicas o atípicas prefieren caracterizarlas como células linfocitoides cuando son mas redondeadas, con un citoplasma finamente granular que contiene escasas vacuolas, con núcleos centrales, redondos de cromatina gruesa y con uno o 2 nucléolos y células plasmocitoides cuando son células algo mas ovoides, con mayor cantidad de citoplasma, abundantes vacuolas claras y con un núcleo localizado excéntricamente, relacionando a estas últimas con procesos neoplásicos mas agresivos desde el punto de vista del comportamiento biológico del tumor.

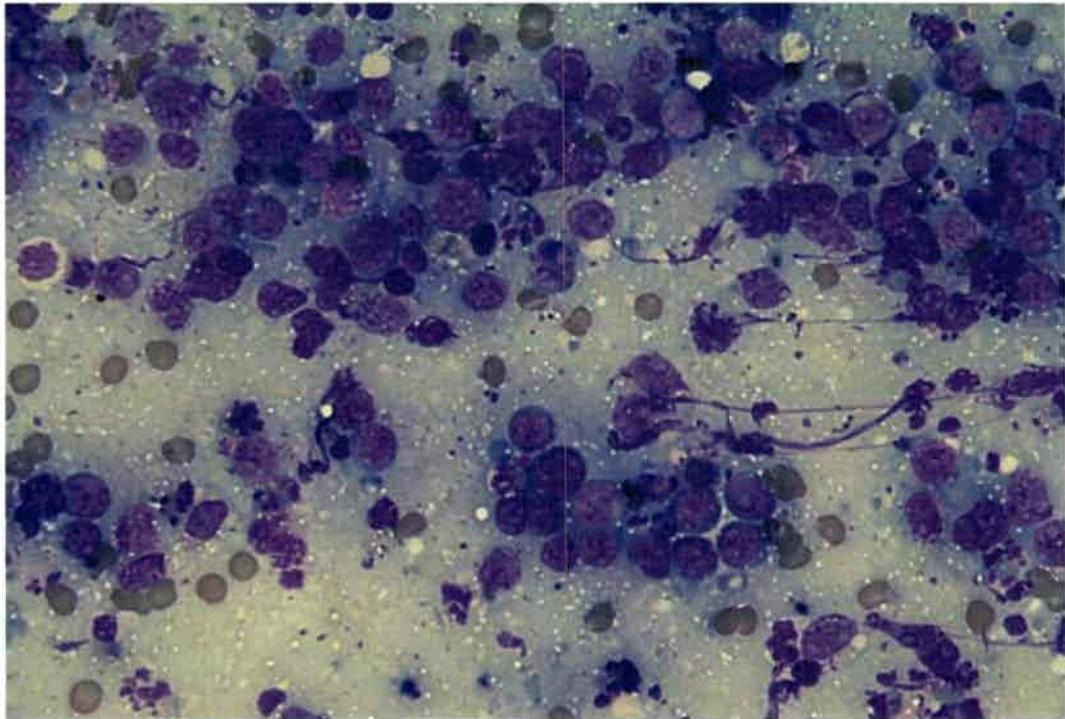


Figura 5. Células redondas correspondientes a un linfoma maligno. Las células son redondas, con núcleos redondos, o indentados, con nucléolos prominentes con escaso citoplasma. Tinción de MGG. (400x).

Con el uso de técnicas de tinción inmunohistoquímicas en cortes histológicos, se puede comparar la expresión de distintos antígenos, a fin de lograr diferenciar TVT, linfoma e

histiocitoma. Entre el 56% y el 40% de las células de TVT expresan inmunoreactividad a alfa 1 antitripsina, y lisozima respectivamente; mientras que ambas reacciones son negativas para las células de linfomas. La expresión de antígeno CD3, Inmunoglobulina G e Inmunoglobulina M, y cadena liviana lamda en células de TVT es negativa, lo que también permite diferenciar a este tumor de linfoma donde la inmunoreactividad es positiva a las diferentes determinaciones, en distintos grados. En el caso de los histiocitomas, reaccionan en forma similar a los mismos antígenos ya que las células de TVT muestran cierta compatibilidad con células histiocíticas (Mozos *et al*, 1996; Scott *et al*, 2002; Mukaratirwa *et al*, 2004).

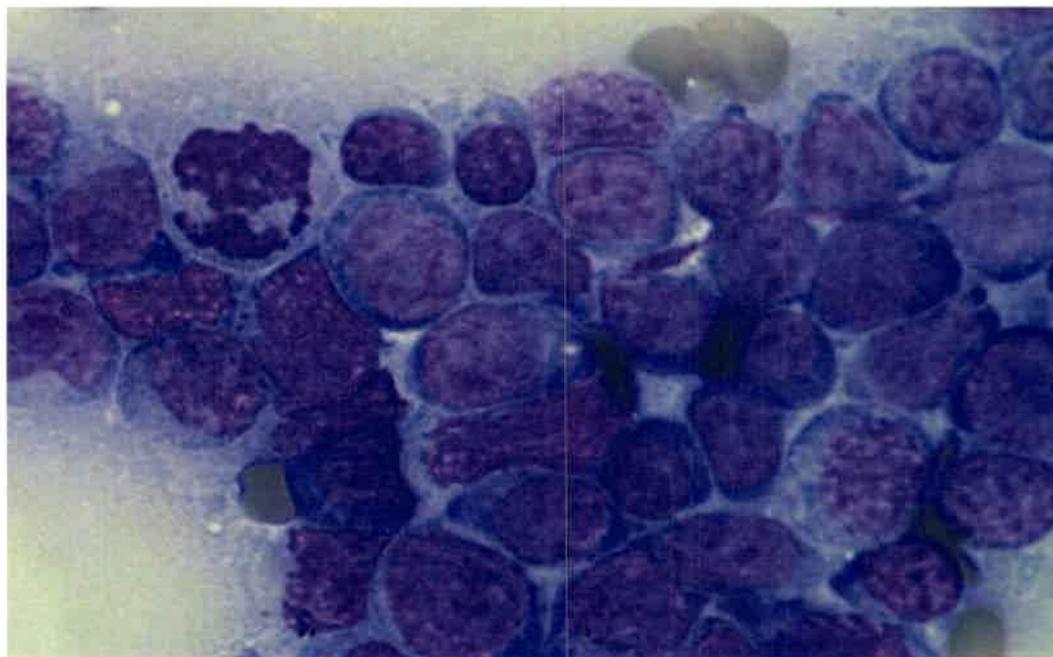


Figura 6. Células redondas correspondientes a un linfoma maligno. Se observan células redondas, con anisocitosis, anisocariosis, núcleos redondos, nucléolos prominentes, escaso citoplasma basófilo. Tinción de MGG. (1000x).

Estudios citogenéticos pueden ayudar en el diagnóstico definitivo de TVT debido a que estas células cancerígenas tienen diferencias cariotípicas muy significativas respecto a las células normales. Mientras que el número de cromosomas de una célula normal canina es de

78 y todos, excepto 2 son acrocéntricos (21), las células de TVT tienen, como se expresó anteriormente, 59 cromosomas (con un rango entre 57 y 64) de los cuales 15 ó 17 son metacéntricos y 42 a 40 son acrocéntricos (Fujinaga *et al.*, 1989).

Al examen por microscopía electrónica no se han encontrado partículas similares a virus ni hallazgos ultraestructurales distintivos en las células. En el citoplasma se ha observado un número variable de mitocondrias redondas u ovals con un número variable de crestas mitocondriales, agrupaciones de ribosomas y escasos cordones de retículo endoplásmico rugoso. Ocasionalmente se ha encontrado un aparato de Golgi en posición paranuclear, a menudo con centríolos asociados. En algunas observaciones fueron localizados unos pocos gránulos electrodensos ligados a membrana, vecinos al aparato de Golgi. La célula a menudo se ha observado rodeada de proyecciones citoplasmáticas o microvellos. (Murray *et al.*, 1969; Santos *et al.*, 2005).

Las células cancerígenas se diferencian por su crecimiento incontrolable, capacidad de producir metástasis, pérdida de diferenciación celular y resistencia farmacológica. Las células que componen las neoplasias son clónicas, es decir, descienden de una única célula progenitora y se caracterizan por portar anomalías genéticas o epigenéticas. La información genética está en el núcleo de cada célula en forma de ADN, organizado en los cromosomas. La estructura exacta de estos cromosomas cambia a medida que la célula atraviesa los diferentes estados del ciclo celular. Por lo tanto, el rápido crecimiento y el crecimiento invasivo de los tumores, dependen de la capacidad de división que tengan sus células relacionadas íntimamente con el ciclo celular.

El ciclo celular eucariótico se divide en cuatro fases: G1 donde las células crecen en tamaño, evalúan su estado metabólico y se preparan para la división; S, donde se produce la duplicación del genoma; G2, donde se chequea la finalización de la replicación del ADN y M, donde tienen lugar la mitosis y citodíesis originando dos células, cada una de las cuales recibe una serie completa de cromosomas, las cuales pueden entrar inmediatamente en fase G1 o pueden detenerse (G0) temporal o permanentemente (Figura 7).

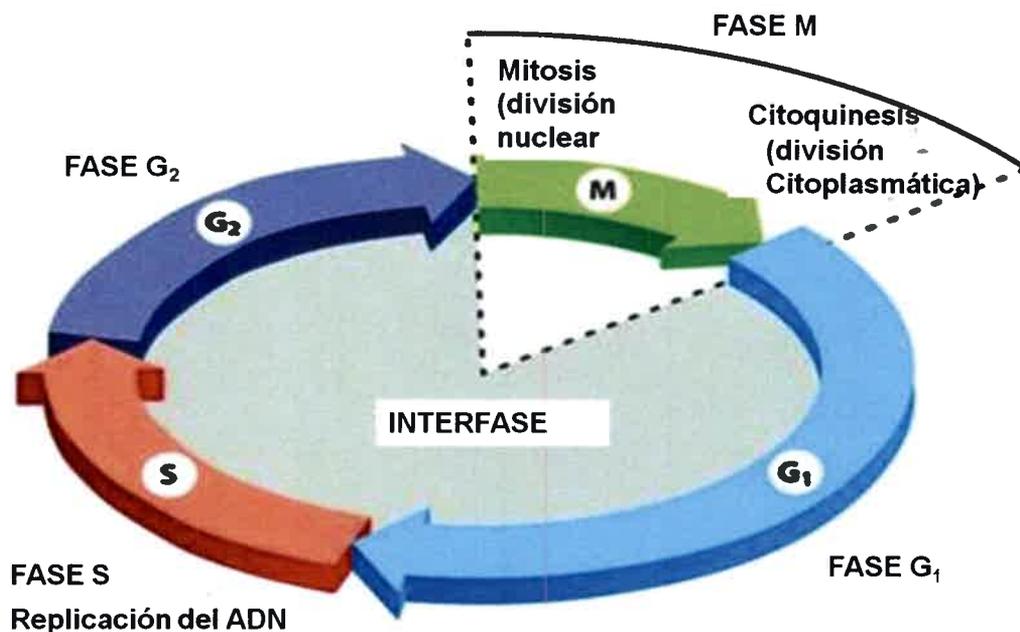


Figura 7. Fases del ciclo celular. Adaptado de Lodish, *et al.*, (2008).

Cada fase está bajo el control específico de complejos quinasas dependientes de ciclinas (CDK-ciclinas); la CDK4,6-Ciclina-D regula la progresión hacia G₁, la CDK2-ciclina-E está comprometida en la transición de G₁ a fase S, también conocido como el punto de restricción; la CDK2-ciclina y CDK1-ciclina-A actúan en la fase S y la CDK1-ciclina-B regula la mitosis (Maga y Hübscher, 2003; Lodish, *et al.*, 2008). El paso de G₁ a S está controlado por factores tales como tamaño de la célula, estado metabólico, disponibilidad de factor de crecimiento y daño en el ADN. El punto de restricción está regulado por un número de genes críticos, incluyendo p53 que juega un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Las células normales con el daño del ADN son arrestadas en fase G₁ y entran en una muerte celular programada (apoptosis) bajo el control del gen p53. Este gen es el más comúnmente mutado en el cáncer humano, que no es sorprendente, ya que la pérdida de control de la estabilidad genómica es una característica central de los cánceres (Lyman *et al.*, 2015).

El pronóstico de un tumor depende del tipo tumoral, del comportamiento biológico y del estadio de la enfermedad (Noda, 2008). Uno de los métodos comúnmente utilizados para establecer el comportamiento de malignidad de las neoplasias, es la graduación histológica y su combinación con el sistema clínico tumor, nódulos linfáticos y metástasis (TNM) (Cullen *et al.*, 2002); pero se requiere de técnicas adicionales que midan parámetros biológicos que apoyen en la evaluación del tratamiento y en determinar la probabilidad de vida del paciente (López Muñiz *et al.*, 2001).

Los marcadores tumorales se utilizan en la caracterización de las neoplasias, en la clasificación de su malignidad y especialmente en el establecimiento de un pronóstico acertado.

Entre estos marcadores de proliferación celular se encuentra el recuento de figuras mitóticas o índice mitótico que es un método morfológico tradicional que detecta solo la fase M del ciclo celular y que consiste en la enumeración de mitosis por cierto número de campos microscópicos de alto aumento, mitosis por milímetro cuadrado, o mitosis por determinado número de células tumorales.

Entre otros marcadores están las regiones organizadoras nucleolares (NORs); dichas regiones corresponden a segmentos de ADN de cromosomas que codifican el ARN ribosómico para la síntesis de proteínas, las cuales se ubican en los cromosomas acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22 de las células eucarióticas humanas, (Derenzini, 2000; López Muñiz *et al.*, 2001; Yasdi y Taghavi, 2005). Asociado a estos NORs existen un conjunto de nucleoproteínas, compuestos de subunidades de ARN polimerasa I, una proteína designada C23 o nucleolina (fosfoproteína que interviene en la transcripción de las moléculas de ARNr), la proteína B23 o nucleofosmina (fosfoproteína involucrada en las fases finales de la organización de la partícula pre-ribosomal) y UBF (factor de de transcripción nucleolar) requerido para la expresión de los ARNs ribosomales 18S, 5.8S y 28S. Por lo tanto, el número de NORs está estrictamente relacionado a la actividad de transcripción del ARNr en células que estén en constante proliferación, especialmente durante la fase S-G2 del ciclo celular (Derenzini, 2000; Sirri *et al.*, 2000; Copper, 2002).

Estas proteínas implicadas en la transcripción y procesamiento del ARNr, son argirófilas y por ello, las NORs se hacen evidentes a nivel de microscopía de campo claro en preparados cito-histológicos de rutina, a través de coloraciones argénticas, motivo por el cual son conocidas como AgNORs (regiones organizadoras nucleolares argirófilas) (Leyva Huerta *et al.*, 2008). Las impregnaciones argénticas resultan en puntos de color marrón oscuro en el núcleo.

El número y el área de los AgNORs representan parámetros que reflejan el grado de la actividad proliferativa de las células (Vargas Gonzalez, 2008) y durante décadas, han sido usadas en medicina humana en la diferenciación entre procesos reactivos y neoplásicos, observándose incrementados en neoplasias malignas (Rocher *et al.*, 2000; Trerè, 2000; Santos *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2010). Santos *et al.*, (2005 y 2011), hicieron además una diferenciación en cuanto a la forma en que estos puntos de AgNOR se distribuyen en la célula, clasificándolos en puntos distribuidos en forma aislada o difusa, que rellenan todo el nucléolo, agrupados en cordones, dispuestos alrededor del nucléolo como en satélites y agrupadas en collares (Figura 8).

Todas estas características de los AgNORs, contribuyen en el pronóstico de las neoplasias y predicen la respuesta al tratamiento en varias neoplasias humanas (Egan y Crocker, 1992; Pich *et al.*, 2000). Esto ha despertado un alto interés para el uso de esta técnica en medicina veterinaria, especialmente en aquellas neoplasias que pueden llegar a tener un comportamiento más o menos invasivo, como es el caso del TVT canino.

Existen además, marcadores de proliferación celular basados en métodos inmunohistoquímicos que detectan antígenos nucleares de proliferación celular como el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) y el anticuerpo monoclonal Ki-67. La inmunohistoquímica se basa en la unión de anticuerpos a un antígeno específico ubicado en una sección del tejido.

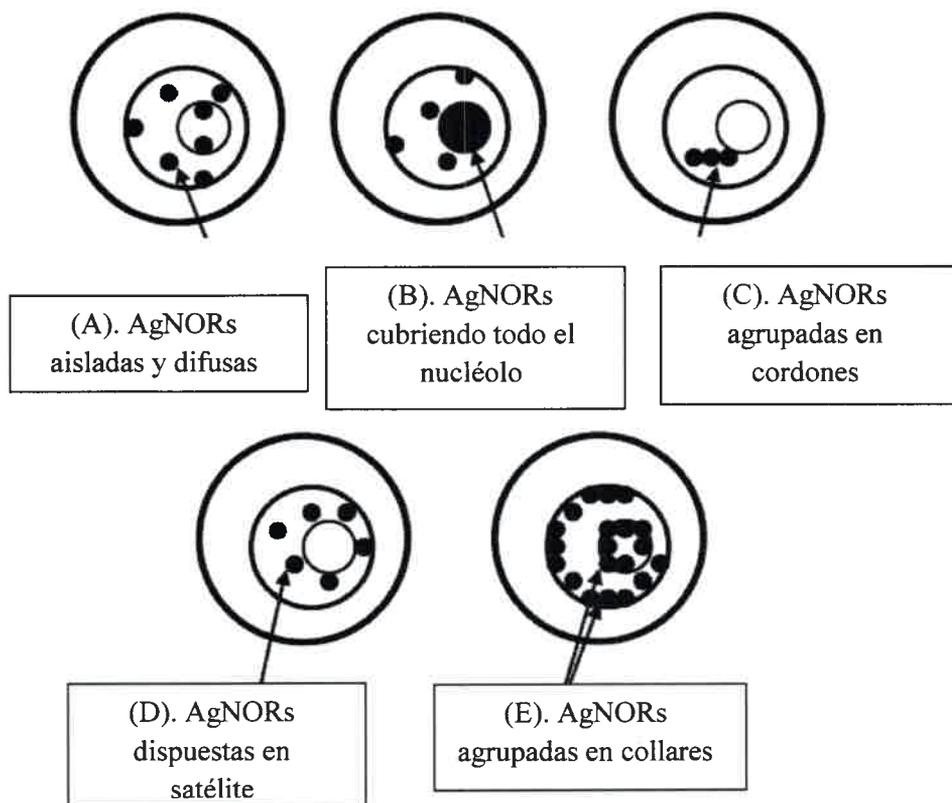


Figura 8. Esquema de distribución de los puntos de AgNOR en el núcleo y nucléolo de las células tumorales. Adaptado de Santos *et al.*, (2005).

El PCNA es una proteína no histona (Figura 9) de 36 kDa y de 261 aminoácidos con alto contenido de ácido glutámico y aspartato.

Está localizado en el núcleo e inicialmente se lo relacionó con proteínas comprometidas en la replicación del ADN, favoreciendo la síntesis de ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa delta (Hall y Levison, 1990 ; Löhr *et al.*, 1997) y está involucrado en el replisoma de la célula ya que se requiere para la síntesis coordinada de las cadenas conducida y conductora en la horquilla de replicación durante la replicación del ADN; también interactúa en distintos caminos metabólicos involucrados en la reparación del ADN. Además, estudios bioquímicos demuestran que el PCNA interactúa con las quinasas

dependientes de ciclinas (CDK-ciclinas) en la fase S del ciclo celular siendo un transductor y un disparador de señales positivas y negativas. El PCNA forma complejos con todas estas CDK-ciclinas. Además hay mecanismos específicos de control que se activan para detener la progresión del ciclo celular en caso de problemas, donde el PCNA forma complejos con proteínas que inhiben la replicación del ADN, uniéndose a la región C-terminal de p21 generando señales negativas (Maga y Hübscher, 2003), (Figura 10), teniendo en cuenta que tanto la pérdida de expresión de p21 como la sobreexpresión han sido asociados con una menor supervivencia en cáncer de mama humano (Abukhdeir y Park, 2008) y la falta de sobreexpresión de p21 está asociada con la progresión maligna de tumores (Klopffleisch y Gruber, 2009). Es decir que el PCNA juega un rol fundamental en la replicación del ADN, en los mecanismos de reparación del ADN pero también en la detención de la progresión del ciclo celular.



Figura 9. Estructura de la proteína PCNA. Adaptada de Gulbis *et al.*, (1996).

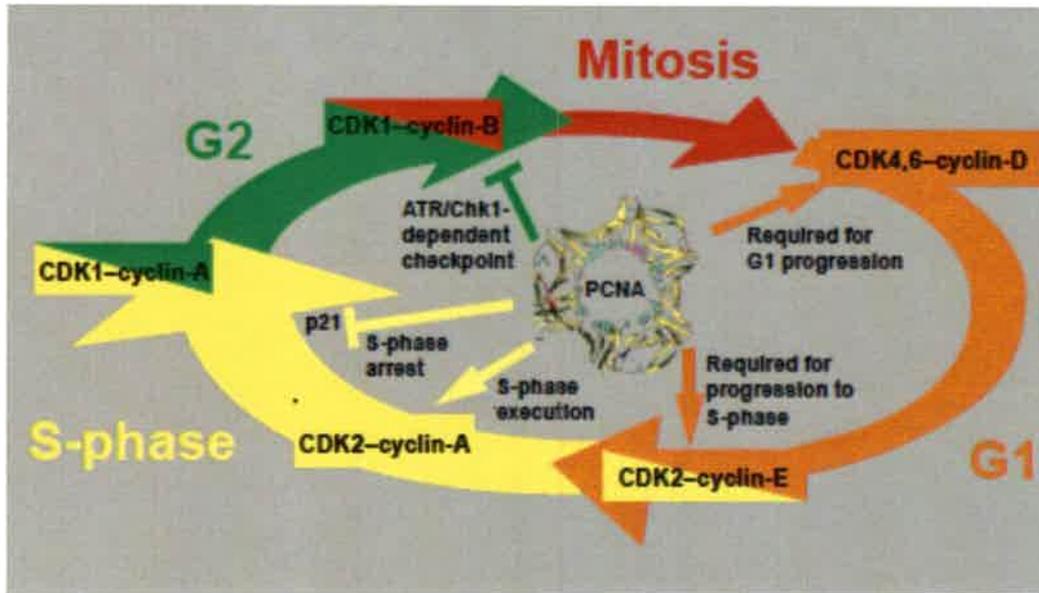


Figura 10. Interacción entre PCNA y los caminos de regulación del ciclo celular. Las señales positivas están indicadas por flechas y las negativas por barras T. (Tomado de Maga y Hübscher, 2003)

Es por ello que el PCNA aparece en el núcleo en el final de la fase G1 (síntesis baja de PCNA), alcanzando su máxima expresión en la fase S (síntesis alta de PCNA) y declina en la fase G2M, para retornar a valores basales durante el período final de la fase S (Vicente *et al.*, 1998). La principal desventaja de este marcador es el tiempo de vida útil prolongado de la proteína después de la salida de la célula del ciclo celular. (Linden *et al.*, 1992, Grifey *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 1999; Gupta y Sood, 2012). La expresión del PCNA se correlaciona con la actividad de proliferación de varios tipos celulares malignos y no malignos, como puede ser por ejemplo el desarrollo placentario (Unek *et al.*, 2011).

El antígeno Ki-67 (Figura 11), es una proteína nuclear y nucleolar, también conocida como MKi67 que está asociada y es necesaria para la proliferación celular y está codificada por un gen en el cromosoma 10. Además, está asociada con la transcripción del ARN ribosomal. Han sido identificadas dos isoformas de 345 y 395 kDa.

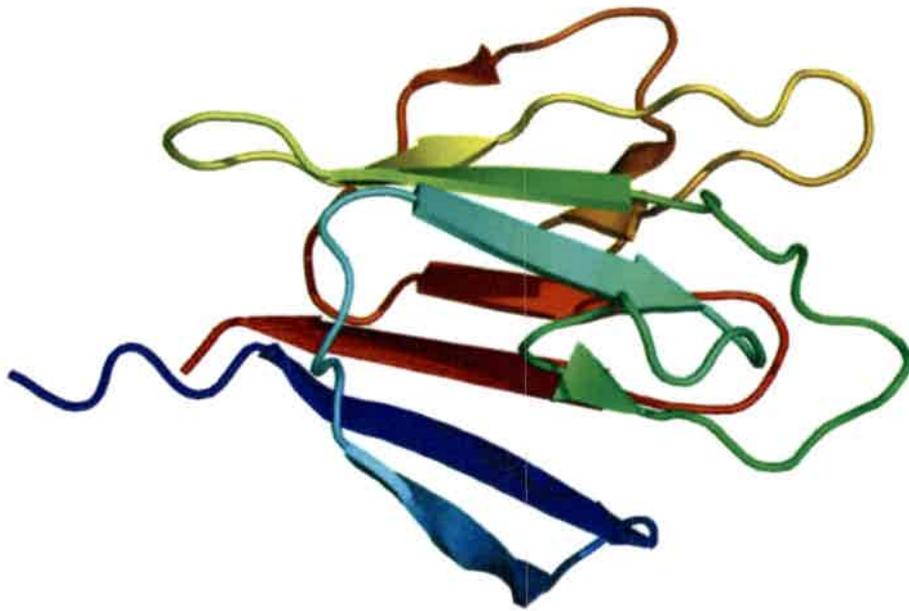


Figura 11: Estructura de la proteína MKi67. Adaptada de Li *et al.*, (2004).

Su expresión se inicia en la mitad de la fase G1, aumenta en la fase S y G2, teniendo su máxima expresión en la fase M ya que en mitosis, la mayoría de la proteína es relocalizada en la superficie de los cromosomas, luego, se degrada rápidamente pues tiene una vida media de 60-90 minutos, de modo que no tiene expresión en la fase de reposo del ciclo celular (G_0). Ki-67 es uno de los tantos factores que contribuyen a la acumulación de PP1 γ (Fosfoproteína fosfatasa 1) en la cromatina durante el final de la mitosis, que está comprometida en la fosforegulación de la proteína nucleolar B23 o nucleofosmina (Booth *et al.*, 2014).

Booth *et al.*, 2014 revelaron que cuando Ki-67 no está presente en la célula, los cromosomas no tienen una membrana pericromosomal o solo presentan remanentes de ella. Cuando los cromosomas entran en mitosis sin una membrana pericromosomal no se producen cambios ni en la forma ni el comportamiento de los cromosomas, sin embargo, el nuevo núcleo es mas pequeño que lo normal y su contenido es diferente. Esto causa problemas en la habilidad de las células hijas para sintetizar los bloques de construcción de las proteínas y

lleva a un incremento de muertes celulares espontáneas cuando la célula hija trata de realizar una próxima mitosis. Ki-67 es requerido además para la normal segregación de la nucleolina (proteína C23), y para la reactivación de las NORs después de la salida de la mitosis.

Durante la interfase, el antígeno Ki-67 puede ser detectado en el nucléolo, durante la profase en el nucleoplasma, en la metafase asociado a cromosomas individuales, y en la telofase estaría distribuido por todo el núcleo con un patrón puntiforme (Linden *et al.*, 1992).

El hecho de que esta proteína se exprese durante la fase activa del ciclo celular y esté ausente en las células en reposo proporciona de este modo una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido (Scholzen y Gerdes, 2000; Greatti *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Bassani Silva, 2008).

El uso de estos marcadores está muy difundido en medicina humana, en tanto en medicina veterinaria su utilización ha sido escasa, siendo más aplicado en los cánceres de mama (Bostock *et al.*, 1992; Bratulic *et al.*, 1996; Vicente, *et al.*, 1998; Palomo Gonzalez *et al.*, 2002; Giraldo *et al.*, 2003; Perez e Itoiz, 2004; Rosciani *et al.*, 2005; Leyva Huerta *et al.*, 2008).

1.6-Inmunidad

La mayoría de las neoplasias expresan antígenos que inducen en el organismo una respuesta inmune de tipo celular y humoral, ya sea antígenos tumor específico (ATE), presentes solo en células neoplásicas, o antígenos asociados a tumor (AAT), que se encuentran tanto en células tumorales como también en células normales. Los individuos inmunocompetentes cuentan con un sistema de vigilancia capaz de reconocer a dichos antígenos y destruir en forma sistemática células neoplásicas. (Taussing, 1989).

Los TVT implantados experimentalmente presentan tres estadios de crecimiento: progresivo (que dura aproximadamente 4 a 6 meses), estable (de corta duración) y regresivo (Hill *et al.*, 1984; Joseph, 1993; Das, 2000; Alcoba, 2001; Ferreira, 2003; Liao *et al.*, 2003).

En la fase de crecimiento del tumor los caninos muestran señales de una supresión de la respuesta inmune (Hess *et al.*; 1975). La regresión espontánea en parte, estaría relacionada a la aparición de anticuerpos específicos contra células del TVT (IgG) en la fase regresiva del tumor, que se incrementan a partir de los 40 días de la implantación (Cohen, 1985; Das y Das, 2000, Santos *et al.*, 2005) y a que los linfocitos periféricos de caninos con TVT en fase de regresión presentan citotoxicidad para las células neoplásicas (Santos *et al.*, 2005), en tanto que los linfocitos de caninos normales o en los que el TVT esté en fase progresiva, no presentan esas características (Yang *et al.*, 1987). La regresión completa del tumor está asociada al desarrollo de resistencia a futuras implantaciones del TVT (Cohen, 1985). Liao *et al.*, (2003) demostraron que la inoculación de células de TVT reducen proporcionalmente los linfocitos B entre los linfocitos de sangre periférica que regresan a lo normal luego de la completa remoción del tumor debido a que las células de TVT secretan una o más proteínas citotóxicas, de 30-100 kDa que específicamente inducen la apoptosis de linfocitos B y la secreción de estas sustancias podría explicar en parte como el TVT afecta la inmunidad humoral en la fase progresiva del tumor, además, los oncocitos se tornan capaces de escapar de la vigilancia inmunológica.

Se ha observado además que la expresión de los complejos de histocompatibilidad mayor (MHC) clase I y II en las células neoplásicas posterior a la inoculación experimental de células de TVT es baja durante la fase inicial de progresión del tumor y que aumentan considerablemente luego de 12 semanas post inoculación y continúan aumentando en la fase de regresión tumoral y que los linfocitos que infiltran el tumor (TIL) están fuertemente relacionados con la mayor expresión de MHC I y II por los oncocitos a través de la síntesis de una sustancia soluble, sensible al calor producida por ellos y que sería el disparador de la sobre expresión de MHC a las 12 semanas post inoculación lo que lleva al tumor a entrar en fase de regresión (Hsiao *et al.*, 2002).

La regresión tumoral está asociada a edema, inflamación, necrosis, apoptosis y a la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario (Cohen, 1973; Cockrill y Beasley, 1975; Nielsen y Kennedy 1990; Das y Das, 2000; Santos *et al.*; 2001; Santos *et al.*, 2005). El número y tipo de células inflamatorias en los tumores en crecimiento y en regresión, también varían, siendo

mayor en los tumores en fase de regresión, (Santos *et al.*, 2005). Además, se cree que las citoquinas que se expresan en el microambiente del tumor son importantes mediadores tanto de la respuesta inmune como de la supervivencia del tumor.

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), es una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento de las citoquinas. Es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis y es frecuentemente secretada por células tumorales. Inhibe la proliferación de células B y T y la actividad citolítica de las células NK, permitiendo al tumor escapar de la respuesta inmune. Hsiao *et al.*, (2004) demostraron que las células de TVT expresan TGF-mRNA y proteínas y que el TGF está presente tanto en fases progresivas como regresivas del tumor y produce una inhibición de las células “killer” activadas por citoquinas (LAK) o células NK activadas por IL2 y suprime la actividad citolítica de los TIL. Estos investigadores también demostraron que en las suspensiones de TIL está presente la IL6 y que es más elevada en la etapa de regresión tumoral. La IL6 es una citoquina producida por una gran variedad de células y actúa tanto inhibiendo el crecimiento, induciendo el crecimiento o induciendo la diferenciación, según el tejido. La IL6 también antagoniza el efecto inmunosupresor de TGF-1 y demostraron que la IL6 producida por los TIL en la fase regresiva del tumor, restablece la actividad asesina de las células LAK, independientemente de los valores de TGF-1.

La regresión espontánea no está documentada en tumores que ocurren naturalmente (Cohen, 1978; Brown *et al.*, 1980; Das y Das, 2000; Scott *et al.*, 2002) y es debido a que las células T, B y plasmáticas participan en una respuesta inmune contra las células tumorales, siendo las células T citotóxicas las que desempeñarían el rol principal en una respuesta inmunitaria eficaz (Scott *et al.*, 2002; Mukaratirwa *et al.*, 2004). Según Adams y Slaughter, (1970), la falla del huésped en producir una suficiente cantidad de anticuerpos, lo predispondría al desarrollo de metástasis. Se ha demostrado además que los cachorros implantados experimentalmente con células de TVT que provienen de madres que tengan anticuerpos contra el tumor, tienen un período de latencia mayor para el desarrollo de la neoplasia, la cual es mas pequeña y regresa mas rápidamente (Moulton, 1990).

Se cree que el mecanismo por el cual se bloquea la inmunidad del huésped, permitiendo la implantación de las células neoplásicas es la pérdida de expresión de los antígenos de histocompatibilidad mayor, Clase I y Clase II (Yang *et al.*, 1987) y en ello está implicada una proteína, la beta 2 microglobulina, que no se expresaría en las células de TVT y que sería necesaria para la expresión de los MHC (Cohen *et al.*, 1984; Gazapoa *et al.*, 1996)

1.7-Tratamiento

En el manejo terapéutico del TVT se han probado diferentes tratamientos como la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia.

La sola escisión quirúrgica, es practicada por algunos autores (Kisani y Adamu, 2009), aunque resulta en una alta tasa de recurrencia, que varía según los autores entre un 18% y 68% (Amber y Henderson, 1982; Weir *et al.*, 1987), influenciado por la localización y la extensión de la neoplasia. La contaminación del campo quirúrgico con células de TVT es también una causa de recurrencia (Boscos y Ververidis, 2004).

La radioterapia es un tratamiento efectivo si se tiene todo el equipamiento necesario y si la ubicación del tumor permite una correcta exposición a los rayos y es particularmente útil en los casos de resistencia a la quimioterapia (Rogers *et al.*, 1998; Cangul, 2001).

Como inmunoterapia se han probado transfusiones de sangre entera o suero de animales recuperados, homogeneizados del tumor, a modo de autovacunas, inoculaciones con toxinas bacterianas, o con suspensiones bacterianas muertas de *Chromobacterium prodigiosum* solo o combinado con otros microorganismos; aplicaciones locales del bacilo de Calmette-Guérin's (BCG), aplicaciones de interleukina-2, pero todos ellos con resultados variables (Das y Das, 2000).

Los agentes antimitóticos como la ciclofosfamida, metotrexato, vincristina, vinblastina, doxorubicina, son los agentes quimioterápicos preferidos para el tratamiento del tumor (Das y Das, 2000) demostrando ser el tratamiento más efectivo, lográndose remisiones

de hasta el 100% (Amber *et al.*, 1990) y la droga más utilizada es la vincristina en forma de sulfato de vincristina (Calvet *et al.*, 1993; Nak *et al.*, 2005). Esta droga es la sal del alcaloide extraído de las hojas de la planta *Catharanthus roseus* conocida también como Vinca rosa, oriunda de Madagascar (Figura 12), (Purohit, 2009).



Figura 12. Planta de *Catharanthus roseus*. Adaptada de Sain y Sharma, (2013).

Los alcaloides son los componentes químicos más potentes de la planta y tanto la vincristina como la vinblastina tienen efectos de inhibición del crecimiento sobre algunos tumores (Sain y Sharma, 2013).

La fórmula empírica del sulfato de vincristina es $C_{46}H_{56}N_4O_{10}H_2SO_4$ y su peso molecular es 923,1 (Gidding *et al.*, 1999), (Figura 13).

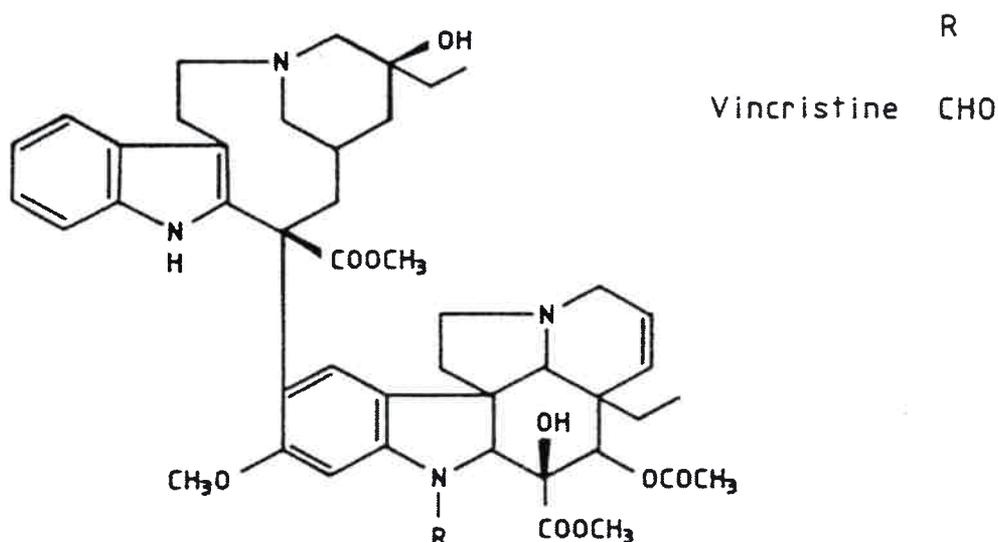


Figura 13: Fórmula estructural de la vincristina. Adaptada de: Gidding *et al.*, (1999).

El mecanismo de acción de la vincristina es unirse a los dímeros de tubulina, de este modo, interfiere con la dinámica microtubular necesaria en la formación del huso mitótico, con lo cual, detiene la división celular en la etapa de metafase (George *et al.*, 1965; Lu *et al.*, 1983; Coppoc, 2009). Además de la formación de husos mitóticos, los microtúbulos participan en muchas otras funciones, algunos tipos de movimientos celulares, la fagocitosis y otros, lo que explica algunos de los otros efectos de la vinca. Es además inmunosupresora, aunque menos que otros agentes. Se usan en el tratamiento de trombocitopenia inmunomediada, porque además produce trombocitosis. Se unen a las proteínas plasmáticas, se concentran en las plaquetas y en menor proporción en los leucocitos y los eritrocitos (Flores, 2000). En cultivo, la vincristina induce apoptosis y en modelos animales interfiere selectivamente con el flujo sanguíneo tumoral, resultando en necrosis (Takano *et al.*, 1993; Rowinsky y Donehower, 1996; Gidding *et al.*, 1999).

Para una máxima eficacia terapéutica la droga debe usarse en una dosis que cause mínima toxicidad con una máxima efectividad. El margen de seguridad de las drogas en general es muy estrecho; la dosis de máxima efectividad esta muy próxima a la tóxica letal. Las dosis de los citotóxicos se calculan en base a la superficie corporal, porque la irrigación a los órganos, base de la activación, metabolismo, desintoxicación y excreción, como son hígado y riñón , está más relacionada con la superficie corporal que con el peso, los animales de pequeño peso tienen una superficie corporal mayor a los de talla grande. La dosis calculada en base a superficie corporal (mg/m^2) es mayor para un animal pequeño con relación a uno grande. La dosis óptima es la que permite una adecuada eliminación de las células neoplásicas, teniendo una acción no deteriorante sobre las células orgánicas normales susceptibles. El tiempo entre una y otra dosis es crítico, pues debe ser suficiente para permitir la recuperación de células normales del individuo, pero no la de células tumorales que no fueron afectadas por el tratamiento anterior, para evitar que puedan desarrollar resistencia a la droga. La administración de una sola dosis produce su efecto terapéutico esperado, pero si no se continúa con el siguiente ciclo se produce una rápida recuperación del volumen tumoral, incluso mayor que el inicial (Flores, 2000). El tratamiento probado de máxima eficacia, consiste en una aplicación semanal de sulfato de vincristina a la dosis de 0,5- 1 mg/m^2 de superficie corporal (0,025 a 0,03 mg/kg), (Flores, 2000; Boscos y Ververidis, 2004; Varela *et al.*, 2013). La vía de administración es endovenosa, siendo de suma importancia que la aguja o el catéter estén bien posicionados antes de administrar la droga, ya que la vincristina produce necrosis de los tejidos periféricos y es muy irritante localmente (Boyiadziz *et al.*, 2014). Tiene un patrón de depuración plasmático multifásico, con una vida media terminal de 24 hs. y es metabolizada en el hígado, sin derivados biológicamente activos, se excreta en la bilis; debe ser usada con precaución y en dosis reducida en pacientes con disfunción hepática (Flores, 2000). La involución del tumor post tratamiento es gradual aunque es particularmente notorio al comienzo del mismo (Purohit, 2009).

El tiempo del tratamiento hasta la remisión completa del tumor varía ampliamente ya que puede llevar entre 2 a 8 administraciones (Calvet, 1993; Nak *et al.*, 2005; Ramirez Perez *et al.*, 2011; Hantrakul *et al.*, 2014) y ocurre en más del 90% de los casos tratados. Una cura del 100% de los casos se produce si el tratamiento se realiza en los estadios iniciales,

especialmente en los casos que tengan menos de un año de duración e independientemente que tengan o no metastasis (Daleck *et al.*, 1987; Boscos y Ververidis, 2004).

Como efectos adversos del tratamiento pueden observarse tempranamente anemias transitorias y leucopenias, resultado del efecto mielosupresor, anorexia y deshidratación, signos que desaparecen completamente luego de la regresión del tumor (Tella *et al.*, 2004; Arce Visales, 2012). Además de la mielosupresión pueden aparecer efectos gastrointestinales como vómitos entre el 5 al 7% de los pacientes. También se ha descrito paresia como consecuencia de una neuropatía periférica (Calvet, 1993; Withrow y Mac Ewen, 1996; Flores, 2000). Si la leucopenia cae por debajo de los 4,000/ μ l de sangre, la siguiente administración de la vincristina debería demorarse unos 3 o 4 días y la dosis se podría reducir a un 25% de la inicial (Calvet *et al.*, 1983).

El animal tratado, que no presente signos de recidiva en el período de un año, se lo considera clínicamente sano y puede ser usado como reproductor si el propietario así lo requiere (Alvarez Espinoza, 2010).

Se han reportado casos de pacientes con TVT que no responden al tratamiento con vincristina. La expresión de una glicoproteína (P-glycoproteína), podría estar involucrada en la resistencia a la quimioterapia (Gaspar *et al.*, 2010).

Debe considerarse una resistencia a la terapia, si luego de 6 ciclos semanales de administración de la droga, se mantiene el tumor residual (Said *et al.*, 2009; Sudjaidee *et al.*, 2012). Los casos de resistencia, pueden ser tratados con doxorubicina (30 mg/m², EV) cada 21 días, repitiendo 2 ó 3 ciclos (Richardson, 1981; Lorimier y Fan, 2007; Purohit, 2009). Se han descrito casos de resistencia a la vincristina, vinblastina y doxorubicina y que han respondido satisfactoriamente a la resección quirúrgica mas la administración de L-asparaginasa y prednisona (Da Silva *et al.* 2014). Sería importante contar con herramientas que tempranamente permitan evaluar la respuesta del tejido neoplásico a la quimioterapia.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2-HIPÓTESIS

En medicina veterinaria se hace necesario disponer de herramientas diagnósticas y pronósticas confiables. El contar con una herramienta cuantitativa que soporte las observaciones subjetivas que aporta el diagnóstico citomorfológico, podría contribuir a establecer de manera confiable el pronóstico del paciente con TVT, así como también definir el modelo terapéutico. Por esto es necesaria la búsqueda de técnicas diagnósticas seguras que permitan establecer pronósticos más precisos y confiables.

3-OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el uso de marcadores tumorales como indicadores de malignidad y del manejo terapéutico con sulfato de vincristina en el Tumor Venéreo Transmisible canino.

Objetivos específicos:

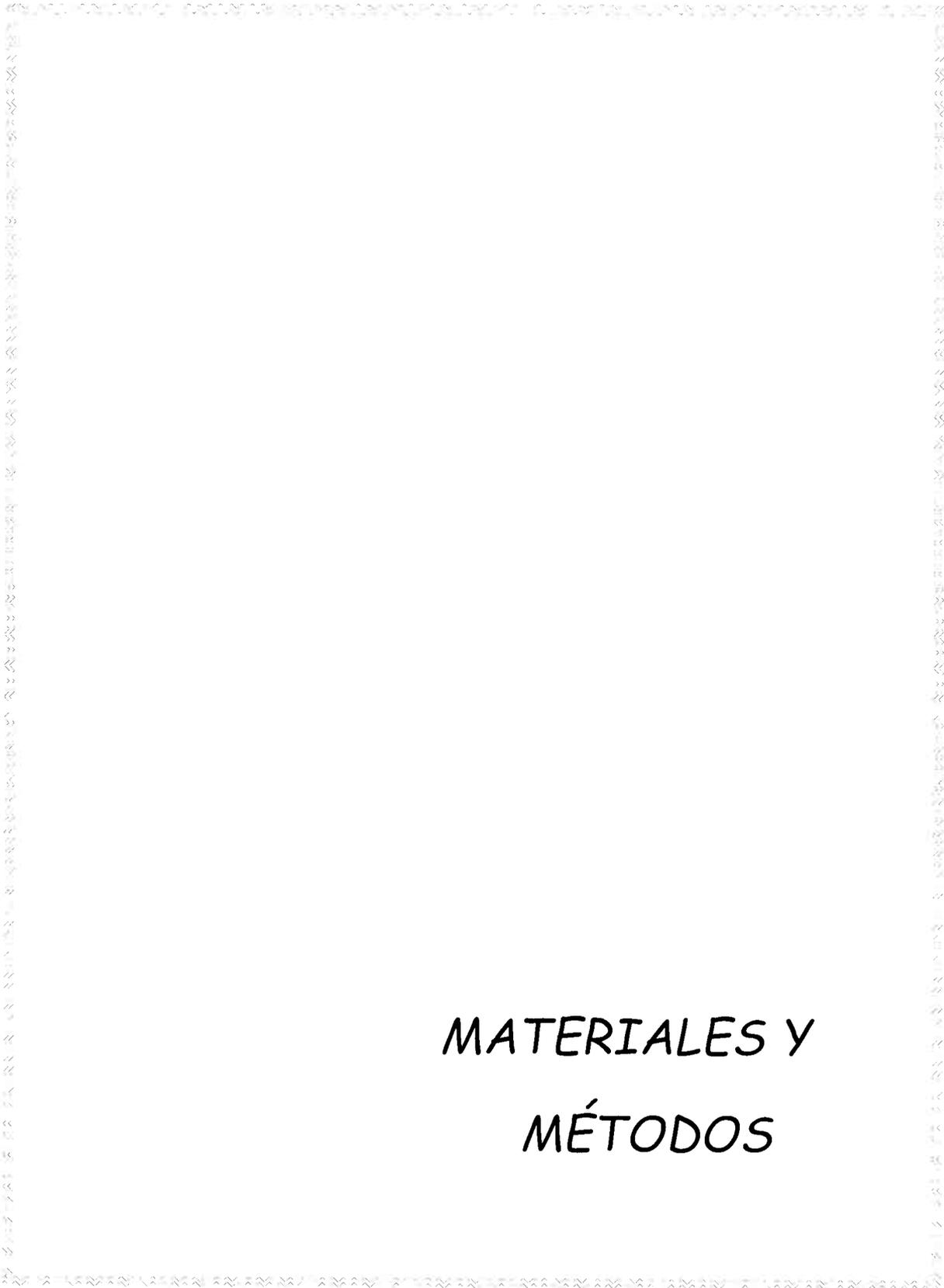
2.1-Evaluar el comportamiento biológico del Tumor Venéreo Transmisible y su relación con factores clínico-patológicos y hematológicos en caninos de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

2.2-Determinar la importancia de la citología diagnóstica en la detección y predicción de malignidad del TVT.

2.3-Determinar el valor pronóstico de factores relacionados con la manifestación del TVT a través de la evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNOR), de marcadores de proliferación celular Ki-67 y PCNA, mediante tinciones y técnicas inmunohistoquímicas, respectivamente.

2.4-Evaluar por microscopía óptica de alta resolución (MOAR) la estructura celular y por microscopía electrónica la ultraestructura celular en muestras de distintos estadios de progresión tumoral.

2.5-Evaluar las tinciones y técnicas inmunohistoquímicas durante la remisión tumoral de TVT, inducida con el tratamiento con sulfato de vincristina endovenosa.



MATERIALES Y
MÉTODOS

4-MATERIALES Y METODOS

A. Animales

Se realizó un estudio observacional con 20 pacientes caninos a los que se les diagnosticó TVT de presentación espontánea, que ingresaron al Hospital de Clínica Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) y/o a consultorios externos privados de la ciudad de Río Cuarto. Para evaluar el comportamiento biológico del TVT, se hizo un análisis retrospectivo de 90 casos de TVT.

En todo momento se respetaron las normas éticas de manejo de los animales de acuerdo con la resolución 253/10 del Consejo Superior de la UNRC y según consta en el expediente 11/11 del Comité de Ética de la Investigación (CoEdI). Se trabajó sin interferir con el tratamiento terapéutico ni con sus posibilidades de recuperación y se evitó permanentemente el sufrimiento del animal.

B. Obtención y análisis de las muestras

Las muestras fueron tomadas y analizadas bajo estrictas normas de seguridad, siguiendo los lineamientos obtenidos del Manual de Hábitos y Procedimientos de Trabajo seguro en el Laboratorio (Maffrand *et al.*, 2012).

B.1 Muestra y estado del paciente: El paciente que presentó tumoraciones visibles o signos compatibles con TVT, como agrandamiento o deformación prepucial, vulvo-vaginal y/o sangrado, fue evaluado clínicamente y citológicamente. Confirmada la presencia de células de TVT en los extendidos citológicos, se completó una ficha donde se registraron todos los factores intrínsecos y extrínsecos relacionados a la carcinogénesis y epidemiología del TVT

como: raza, edad, sexo, estado general, hábitat en que se encontraba (ámbito hogareño o callejero), localización y tiempo de aparición de la masa tumoral

B.2 Muestras de sangre: A 20 pacientes ingresados en un período determinado, se les tomo una muestra de sangre al momento de la consulta y antes de cada quimioterapia. Se realizó venipunción en la vena cefálica antebraquial, se obtuvieron 4 ml de sangre. La mitad de la muestra se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA al 1% para realizar hemograma y el resto de la sangre se colocó en un tubo sin anticoagulante para la obtención de suero. El suero fue separado inmediatamente y se conservó a temperatura de -20 °C y se usó para la determinación bioquímica de alanina transferasa (ALT), urea, creatinina, proteínas totales, albúmina y perfil electroforético.

B.2.1 Hemogramas: las muestras se procesaron inmediatamente a la extracción, mediante un contador hematológico veterinario, automático (Auto Hematology Analyzer, BC-2800 (Mindray Bio-Medical Electronics Co., China).

B.2.2 Determinaciones bioquímicas: Las determinaciones se realizaron por métodos colorimétricos y enzimáticos de uso comercial (Wiener Lab®), para la GPT (ALT) se usó el método UV optimizado (IFCC), la urea y creatinina se dosaron por métodos cinéticos AA, UV, línea líquida; la proteína total y la albúmina por método colorimétrico AA. Se usó para la lectura de densidades ópticas un analizador automático para química clínica, compuesto por un sistema con computador PC/IBM, impresor de 80 columnas, bandeja refrigerada de carga múltiple, bandeja de reacción, brazo de toma de muestra, dilutor, fotómetro, sistema de limpieza, sensores de nivel, lector de código de barra y lavador automático de cubetas, (Wiener Lab CM 250, Argentina).

B.2.3 Electroforesis de proteínas: se conservaron los sueros a temperatura de -20 °C. Se realizaron las corridas electroforéticas sobre tiras de acetato de celulosa de 5,7 por 14 cm. (Cellogel), las que se conservaron en una solución de metanol al 35 - 40 %. Al momento de su uso, se sumergió el Cellogel en una solución tamponada de veronal sódico 0,04 M (dietilbarbiturato sódico 8,24 gr/lit), pH 8-9, durante 15 minutos como mínimo. Se secó ligeramente cada tira entre dos hojas de papel de filtro para eliminar el exceso de solución tamponada. Se extendieron las tiras sobre el puente de la cámara electroforética en un equipo combinado para electroforesis (Elomed, Argentina). La superficie penetrable se dirigió hacia arriba. La tira se colocó bien tensa y plana de manera que las puntas de las mismas contactaran con la solución tamponada, en un sobrepunte de 8,5 cm y se las sometió a un voltaje de 200 V. Se realizó una microaplicación de 0,5 µl/5 mm a 3 cm del borde catódico durante 20 minutos (longitud de la migración 25 mm). Finalizado el tiempo, se cortó la corriente y las tiras se colocaron con la fase absorbente contra el colorante de Amido Schwartz (0,5 gr de colorante en 45 ml de metanol + 45 ml de agua destilada + 10 ml de ácido acético). Se sumergieron y agitaron durante 5 minutos. Luego se decoloraron con 3 a 4 baños de solución decolorante (metanol: 475 ml + agua destilada: 475 ml + de ácido acético: 50 ml) hasta la obtención de un fondo perfectamente blanco. La cuantificación de las proteínas se realizó por elución de cada fracción (albúmina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y gama globulina) en 3 ml de acetona cada uno (Figura 14). Se realizó la lectura a 620 nm en espectrofotómetro de rango ultravioleta visible, programable, con microcelda de succión programable, con sistema de calentamiento y enfriamiento de la celda para operar en rangos de 20 a 40 °C (Wienerlab, Metrolab 1600 DR, Argentina).

B.3 Estadificación del tumor: se realizó de acuerdo al sistema de calificación TNM, descrito por la UICC (Hermanek *et al.*, 1997), definiendo del tumor: la localización, tamaño, aspecto, consistencia; del nódulo linfático: la descripción, tamaño, consistencia y de la metástasis: los órganos afectados, para ello, se realizó ecografía abdominal con un ecógrafo con transductores lineales y microconvex de 5 a 10 MHz. (SonoScape A6, China).

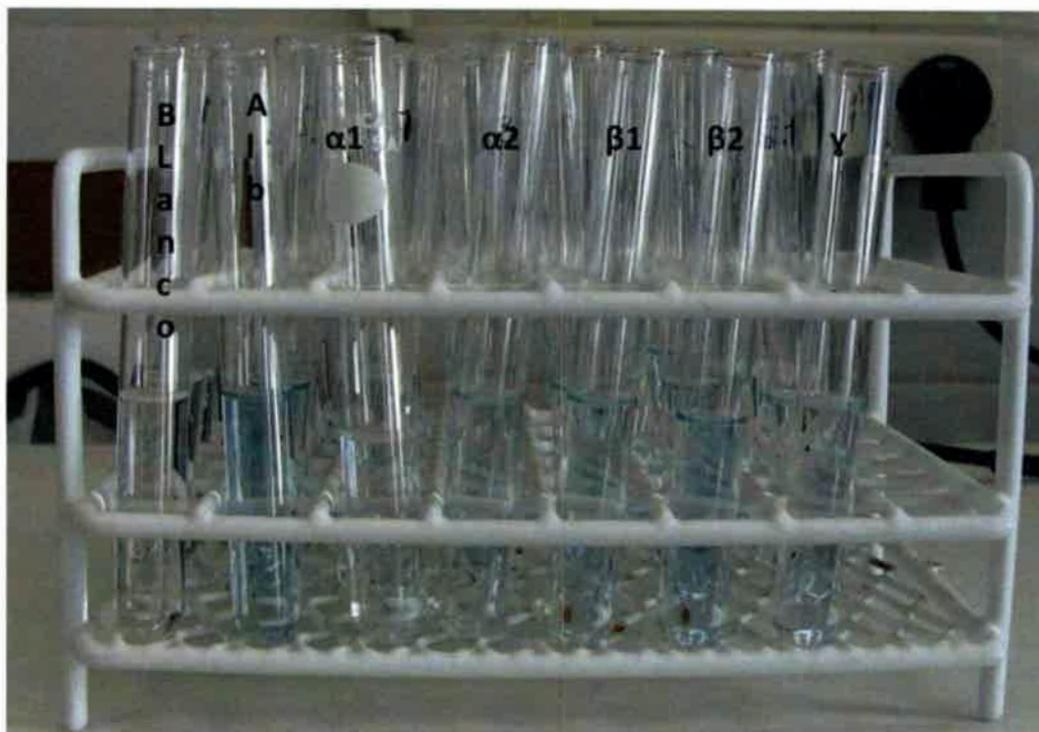


Figura 14. Elución de las distintas fracciones de proteínas a partir de la tira de acetato de celulosa, en tubos con 3 ml de ácido acético.

B.4 Obtención de muestras de tumor:

B.4.1 Obtención de muestras citológicas del tumor: se procedió a tomar muestras por PAAF usando agujas finas 25:8 o 45:8 según el tamaño de la tumoración y jeringa de 10 cc.; se higienizó la zona de punción con algodón embebido en povidona yodada; se estabilizó la masa tumoral con una mano y con la otra se introdujo la aguja acoplada a la jeringa y se aspiró con firmeza de varios sitios del tumor haciendo tracción con el émbolo (Figura 15), se interrumpió la presión negativa y se retiró la aguja (Tyler *et al.*, 1999; Meinkoth *et al.*, 2009). Para las tumoraciones internas se procedió con la misma metodología pero guiada por ecografía (Figura 16).

El material obtenido se depositó en portaobjetos (Figura 17) y se extendió con un vidrio extensor, realizándose al menos tres extendidos delgados.



Figura 15. PAAF de una masa tumoral localizada en piel y subcutáneo, mostrando el momento en que se realiza la succión con jeringa..



Figura 16. PAAF de una masa tumoral localizada en cavidad abdominal, guiada por ecografía. Gentileza de Dra. Gonzalez Griselda

Los tumores que se presentaban ulcerados, expuestos, o en fondo de vagina y prepucio fueron muestreados con hisopos (Figura 18 y 19). Una vez embebido el hisopo con la muestra del tejido, se lo hizo rotar sobre un portaobjetos, haciendo una leve presión sobre el vidrio, evitando un deslizamiento brusco para no provocar citolisis (Figura 20).

Los portaobjetos fueron secados al aire y fijados en alcohol 96°. Sobre uno de ellos se procedió a realizar la tinción de May Grünwald-Giemsa y los restantes se conservaron para realizar la tinción argénica para la determinación de AgNOR según Howell and Black (1980).

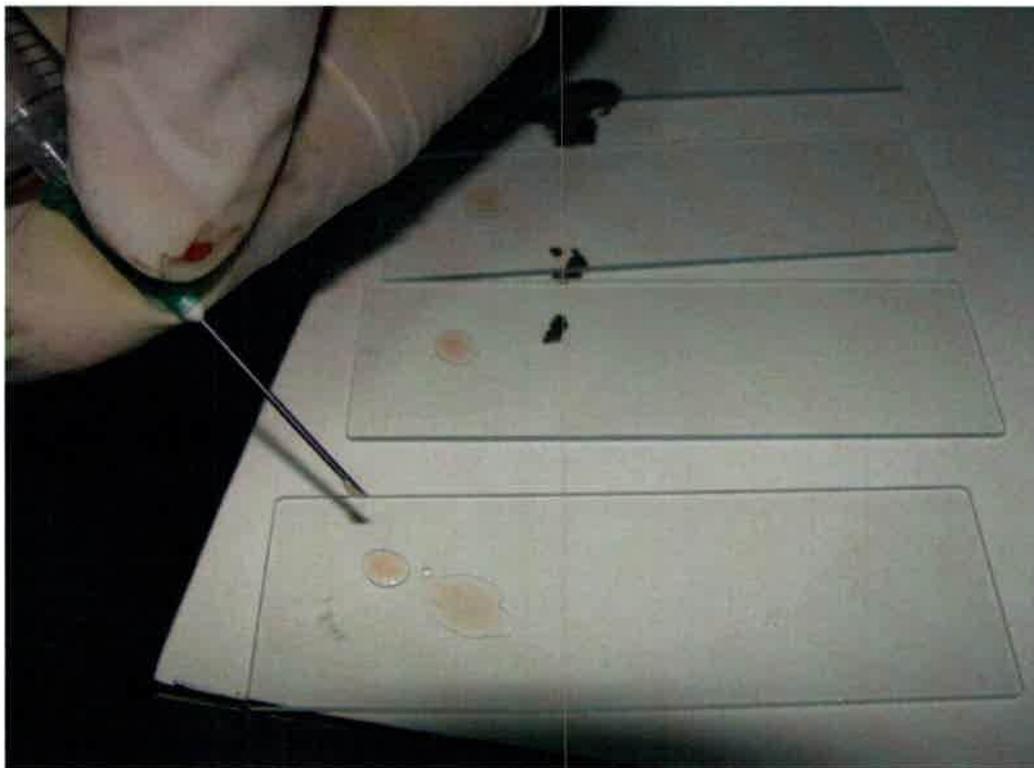


Figura 17. Depósito de la muestra obtenida por PAAF, en un extremo del portaobjeto.

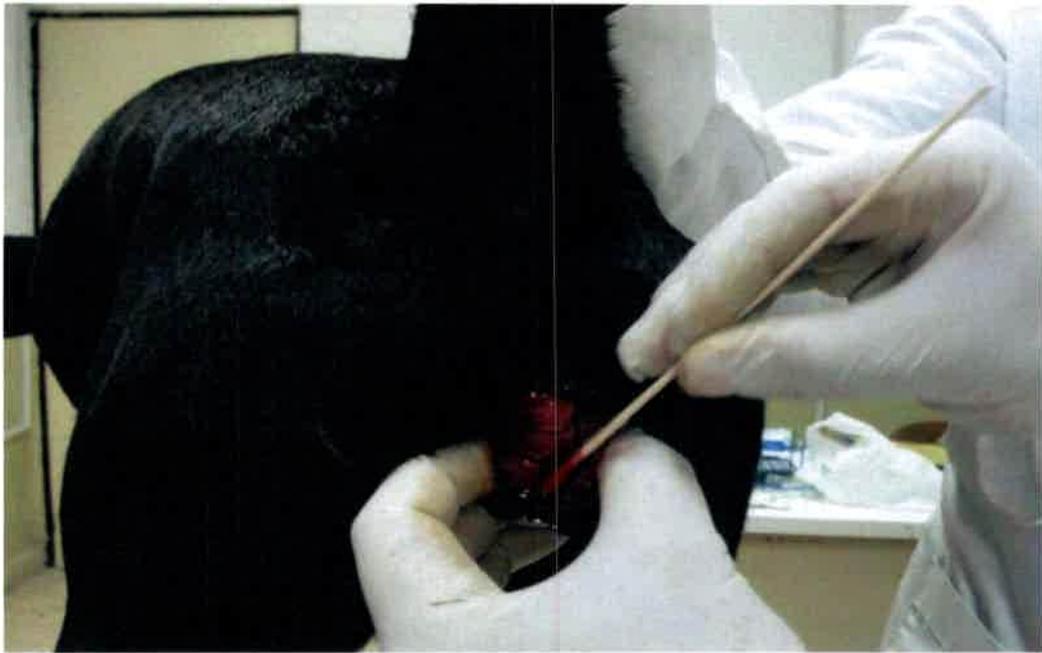


Figura 18. Toma de muestra con hisopo en una hembra, de una masa tumoral que protruye a través del vestíbulo vaginal.



Figura 19. Toma de muestra con hisopo en un macho, de una masa tumoral localizada en mucosa del glande.



Figura 20. Rotación del hisopo sobre el portaobjeto de una muestra de tumor obtenida por hisopado.

B.4.1.1 Tinción de May Grünwald-Giemsa: el portaobjeto con la muestra citológica del tumor se cubrió con 3 a 10 gotas de colorante May Grünwald, dejándolo actuar 3 minutos, se agregó una cantidad igual de buffer pH 6.6 - 6.8 durante 1 minuto. Se escurrió y agregó solución de Giemsa en solución tamponada pH 6.6 - 6.8 (dos gotas de Giemsa por cada 1 ml de solución tamponada) dejándolo 15 minutos. Se lavó con agua de grifo. Se procedió a la observación microscópica con objetivo de 40x y 100x. con un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó a través de la cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón), adosada al microscopio.

B.4.1.2 Determinación de AgNOR: para la determinación de Regiones Organizadoras de Nucléolos de cada una de las muestras citológicas de tumor, se usó el

protocolo de tinción descrito por Howell_y Black (1980): se colocó 1 parte de solución acuosa de gelatina al 2% (con ácido fórmico al 1%) y dos partes de solución acuosa de Nitrato de Plata al 50%, sobre el portaobjetos que contenía la muestra citológica fijada, se mezcló y cubrió con un cubreobjetos. Se incubó en estufa a 60 °C durante 3 a 6 minutos hasta que la lámina adquiriera una coloración marrón dorada. Luego se retiró de la estufa y se lavó el cubreobjetos con agua destilada.

B.4.2 Biopsias insicionales: se tomaron dos muestras de biopsia por insición en 20 caninos (Figura 21).



Figura 21. Biopsia insicional de un TVT localizado en el glande.

B.4.2.1 Biopsia 1: se tomaron muestras de cada primer biopsia correspondientes a porciones de tejido tumoral de 5 mm³ aproximadamente y se fijaron con formol salino tamponado (Figura 22). Posteriormente, se deshidrataron con una batería de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de

aproximadamente 4 μm ; parte de los mismos se usaron para la tinción de hematoxilina-eosina y en los cortes restantes se realizó la tinción argéntica y las técnicas inmunohistoquímicas para la detección de Ki-67 y PCNA.

B.4.2.1.1 Análisis histopatológico: las muestras de tejido tumoral fijadas en formol tamponado se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos de \pm 4-5 μm . Los cortes fueron desparafinados y rehidratados. Luego se colorearon con la solución de trabajo de hematoxilina de Harris durante 2-3 minutos y se lavaron por 5 minutos con agua corriente. Posteriormente, se tiñeron con la solución de trabajo de eosina, 2-3 minutos y se lavaron nuevamente, 5 minutos con agua corriente (Clark, 1981). Los cortes fueron deshidratados y montados en Entellán (Merk®). La observación se realizó a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.



Figura 22. Cortes de tejido de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm conservados en formol tamponado.

B.4.2.1.2 Índice mitótico (IM): se calculó determinando la cantidad de mitosis observadas a un aumento de 1000x, sobre un total de 1000 células tumorales y al menos 10 campos microscópicos tomados aleatoriamente al azar, expresado en porcentaje.

$$IM = n^{\circ} \text{ mitosis} \times 100 \text{ células} / 1000 \text{ células}$$

B.4.2.1.3 Determinación de AgNOR: Se usó la técnica de Plotón *et al.*, (1994), a la que se le hicieron algunas modificaciones en cuanto a tiempo y temperatura debido a la dificultad observada en la calidad de los extendidos. Los cortes histológicos obtenidos según el párrafo B.4.2.1 se desparafinaron en xilol y luego se pasaron por alcohol etílico 100°. Se colorearon con una solución al 2 % de gelatina y 1 % de ácido fórmico en agua deionizada tibia, mezclando en una proporción 1:2 con Nitrato de Plata al 50 %. Los cortes se incubaron en cámara húmeda, 20 min a 60 °C, protegidos de la luz. Luego se lavaron con agua deionizada y se colocaron en una solución de Tiosulfato al 5 % durante 5 minutos. Posteriormente se enjuagaron con agua y se realizó una coloración de contraste con rojo congo al 1% durante 10 min, se enjuagaron con agua deionizada, se deshidrataron, aclararon y se montaron con bálsamo Entellán (Merk®).

Se localizaron las áreas de la muestra donde predominaran las células de TVT y se contaron los puntos marrones y su distribución sobre un total de 200 células neoplásicas.

B.4.2.1.4 Técnicas de Inmunohistoquímica: para la realización de estas técnicas se utilizaron cortes histológicos de tumores, obtenidos según el párrafo B.4.2.1. Los tejidos fueron primeramente desparafinados mediante 2 pasajes por xilol de 15 min cada uno. Posteriormente, se rehidrataron con batería de alcoholes de graduación decreciente de 5 min cada uno, luego se lavaron 2 veces en agua destilada (10 min cada uno) y 2 veces en pH 7,2 (10 min cada uno). Luego se aplicó el protocolo que se detalla a continuación para cada molécula en particular.

B.4.2.1.4.1 Inmunohistoquímica para PCNA: se desparafinaron y rehidrataron cortes histológicos obtenidos según ítem B.4.2.1.4. Posteriormente, se agregó peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 20 minutos y se lavó nuevamente con PBS. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con suero de caballo (dilución 1/100 (PBS: 50 µl suero puro + 5 ml PBS)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó el primer anticuerpo anti-PCNA (PCNA M0879), (DAKO, Denmark) dilución: 1/100, cubiertos con parafilm e incubados over-night en cámara húmeda a 4 °C.

Posteriormente, se utilizó como anticuerpo secundario el kit Polivalent Biotinylated Link (YELLOW- pool de segundos anticuerpos-biotinilados anti-rabbit anti-mouse, HiDef Detection™ HRP Polymer System Cell Marque, USA). Entre cada paso se lavó con PBS. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron mediante el cromógeno diaminobencidina (DAB Cell Marque, USA). Finalmente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Dako). Por último, las secciones se deshidrataron en serie de alcoholes de graduación creciente (70%, 80%, 90%, 100%) seguidas de xilol 100% y fueron montados con Entellán (Merk®), (Sanchis, *et.al.*, 2011). La observación se realizó a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

B.4.2.1.4.2 Inmunohistoquímica para Ki-67: se realizó la recuperación antigénica en microondas, colocando los portaobjetos (con cortes histológicos según ítem B.4.2.1.4) en coplin de plástico, llenos con buffer citraro 10 mM, pH 6 irradiados durante 10 minutos al 78% de potencia (600-700w) y se dejó enfriar 20 minutos. Se enjuagaron con PBS por 10 minutos. Posteriormente, se agregó peróxido de hidrógeno 3 % en PBS por 20 minutos y se volvió a lavar con PBS. Los anticuerpos inespecíficos fueron bloqueados con suero de caballo (1/100 PBS: 50 µl suero puro + 5 ml PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Sin lavar, se agregó el primer anticuerpo anti-Ki67 (Anti Human Ki-67 Antigen M 7240) dilución: 1/100, (DakoCytomation, Denmark) cubiertos con parafilm e incubados 1 h a temperatura ambiente. Se agregó el segundo anticuerpo biotinilado ImmunoCruz™ goat ABC Staining

System: sc-2023 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) (preparado en botella tapa verde, $\pm 1 \mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. Se añadió AB enzyme reagent (complejo Avidina-HRP botella tapa púrpura) por 30 minutos. Entre cada paso se lavó con PBS. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron mediante el cromógeno diaminobencidina (DAB Cell Marque, USA). Finalmente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Dako). Por último, las secciones se deshidrataron en serie de alcoholes de graduación creciente (70%, 80%, 90%, 100%) seguidas de xilol 100%, fueron montados con Entellán (Merk®), (Sanchis *et al.*, 2011). La observación se realizó a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

B.4.2.2 Biopsia 2: la otra muestra se colocó dentro de los 20 minutos de extraída en solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato de Sörensen 0,1 M, pH: 7,2-7,4, para el estudio de la estructura celular mediante microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y de la ultraestructura celular por la técnica convencional de microscopía electrónica de transmisión.

B.4.2.2.1 Técnica de microscopía óptica de alta resolución (MOAR): para el estudio de la estructura celular por MOAR, las muestras de tejido se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en solución tampón fosfato (0,2 M, pH 7,4) durante 3 h a 4 °C. Luego se lavaron dos veces con solución tampón fosfato. Se refijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces en solución tampón fosfato y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. Se realizó una preinclusión en resina epoxi EMBED 812 1:1 en acetona 100 %, durante toda la noche a temperatura ambiente y luego una inclusión en EMBED 812 a 60 °C, durante 24 horas. A través de un ultramicrotomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) los que fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostaticada para permitir la entrada del colorante al tejido

incluido en la resina. Los cortes fueron montados en DPX (Merck®) y observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), se tomaron imágenes a través de la cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio, las que fueron procesadas con el Software Axiovision Release 4.6.3 (Carl Zeiss).

B.4.2.2.2 Técnica convencional de microscopía electrónica de transmisión: las biopsias obtenidas según párrafo B.4.2.2 se lavaron dos veces con la misma solución tamponada de Sorensen, se refijaron en tetróxido de osmio al 1 % durante 1 h a temperatura ambiente y se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. La preinclusión se realizó con EMBED 812, 1:1 en acetona, durante toda la noche a temperatura ambiente. La inclusión definitiva se realizó con EMBED 812 a 60 °C, durante 24 horas. Se eligió la zona de interés sobre cortes semifinos ($\pm 0,25 \mu\text{m}$) teñidos con azul de toluidina. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (60-80 nm) con un ultramicrotomo (Sorvall MT-1A, DuPont, USA) que se contrastaron con acetato de uranio y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión (MET) Elmiskop 101 (Siemens, Alemania). Todos los reactivos utilizados fueron de Electron Microscopy Science. Se observó la ultraestructura celular en los distintos estadios de progresión tumoral. La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio electrónico JEM 1200 ExII (JEOL, Japan), utilizando software: digital micrograph TM (Gatan, Inc Japan).

C. Tratamiento: se realizó el tratamiento con sulfato de vincristina vía endovenosa, con dosis de 0,025 mg/Kg cada 7 días hasta la remisión total del tumor. Se contabilizó el número de dosis totales suministradas para cada individuo.

C.1 Remisión del tumor: se constató por observación clínica y citología exfoliativa del sitio anatómico de localización del tumor y en los casos de órganos internos, por imágenes ecográficas y citología por PAAF.

D. Análisis Estadístico: los resultados se sometieron a un análisis de tipo descriptivo, donde se utilizó la media como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión. Los resultados de los parámetros de distribución se llevaron a una valoración porcentual.

La asociación entre las diferentes variables de clasificación y la presencia de TVT se evaluó mediante la prueba de Chi cuadrado.

Para los indicadores: urea, creatinina, proteínas totales, variables hematológicas, AgNOR e Índice mitótico (IM) se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y un test de Tukey *a posteriori* para detectar las diferencias estadísticamente significativas.

Para los parámetros: leucocitos y neutrófilos, se realizó un ANOVA no paramétrico (Test de Kruskal Wallis). (Balzarini *et al.*, 2008).

Para todas las variables, los datos obtenidos fueron sujetos a un análisis estadístico usando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2009) de acuerdo a un diseño completamente al azar.

RESULTADOS

5-RESULTADOS:

Del total de caninos ingresados al servicio de Análisis Clínico del Departamento de Clínica Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se obtuvo que en el 2,03% de los casos se diagnosticó TVT.

Del estudio observacional realizado, se analizaron las fichas clínicas donde se registraron los factores intrínsecos y extrínsecos relacionados a la carcinogénesis y epidemiología del TVT como raza, edad, sexo, hábitat en que se encontraba el animal.

De los 90 caninos evaluados, el 57,8 % (n: 52) fueron hembras y el 42,2 % (n: 38) machos (Figura 23). Respecto a la edad de los animales, la mayor cantidad de casos de TVT se presentó en animales entre los 2-3 años y 4-5 años (Tabla I).

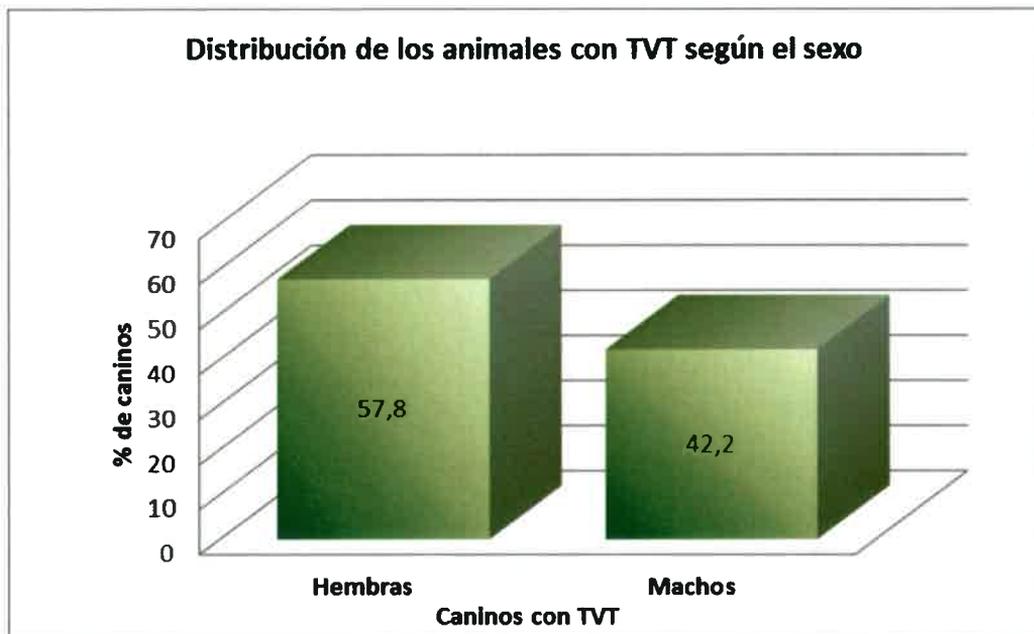


Figura 23. Porcentaje de caninos hembras y machos que presentaron TVT.

Al agrupar por categoría considerando A: cachorros y púberes (animales menores a 18 meses); B: adultos (animales entre 18 meses y 9 años) y C: gerontes (animales de 10 años o mayores) los casos de TVT observados correspondieron en su mayoría a animales adultos, presentándose en un 76,7 % (n: 69) en perros adultos, 17,8 % (n: 16) en animales gerontes y 5,5 % (n: 5) en animales cachorros y pre púberes (Figura 24). La edad mínima en la que se presentó el TVT fue en un cachorro de 7 meses y la máxima en un canino de 16 años de edad.

Tabla I. Distribución de los animales con TVT en base a la edad.

Edad	Nº de animales	% de animales
Menor a 18 meses	5	5,5
2-3	20	22,2
4-5	23	25,5
6-7	9	10,0
8-9	8	8,9
10-11	6	6,7
12-13	3	3,3
14-15	5	5,5
16-17	1	1,1
Desconocida	10	11,1

En relación a las razas, el 33,3 % de los animales (n: 30) fueron fenotípicamente de razas puras y el 66,7 % (n: 60) correspondían a perros mestizos, lo que marca una mayor presentación en perros mestizos (Figura 25). Las razas puras comprometidas se observan en la Tabla II. De los 30 caninos de raza pura observados en este estudio, el 96,7 % (n: 29) de los pacientes fueron razas de tallas medianas y grandes y el 3,3 % (n: 1) fue raza de talla pequeña.

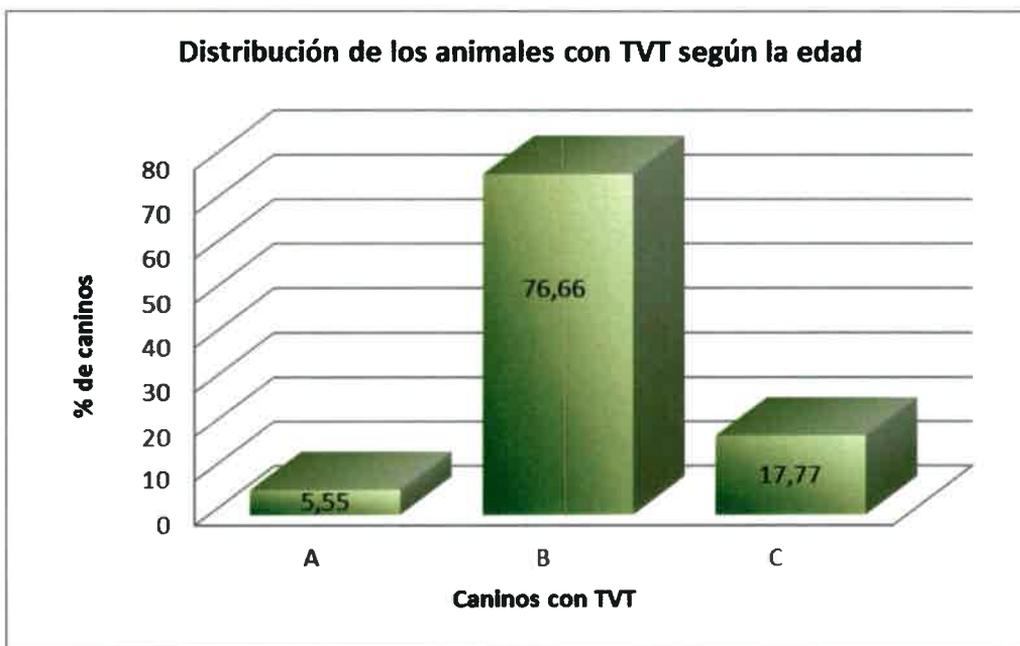


Figura 24. Distribución por categoría de animales con TVT según la edad de los mismos. A: cachorros y púberes; B: adultos; C: gerontes.

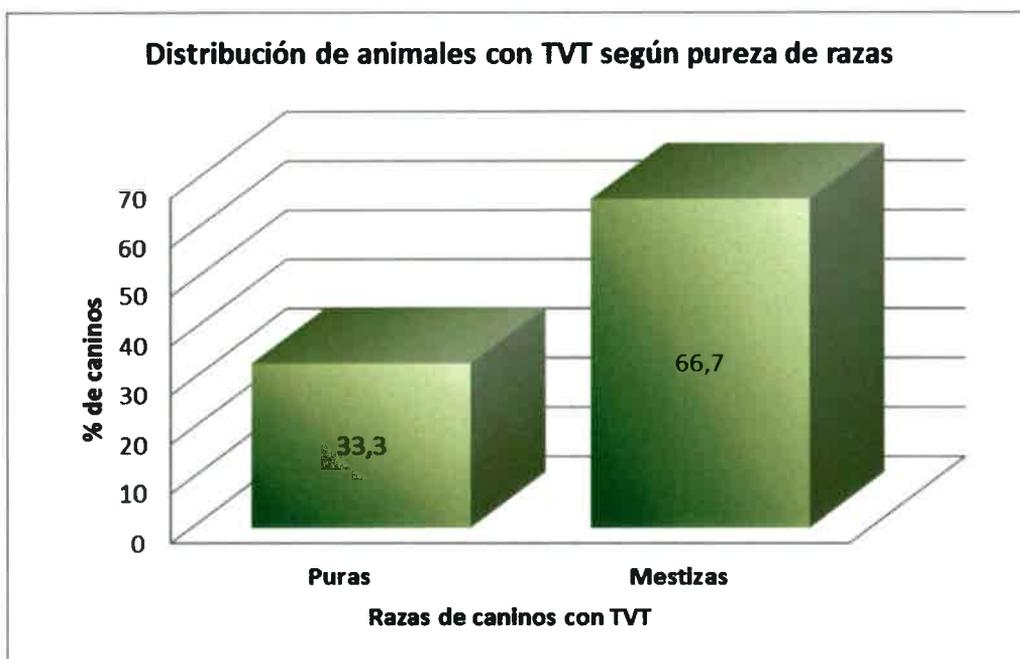


Figura 25. Distribución de casos de TVT según la raza, considerando razas puras y mestizas.

De 42 perros con TVT, que pudo conocerse el hábitat en el que se desenvolvían, correspondió en un 61,9 % (n: 26) a perros que vivían en la calle o que fueron recogidos de la calle por sus actuales dueños. El 30,1% (n: 16) tenía un hábitat domiciliario, pero los propietarios le permitían salir a la calle durante determinados momentos del día sin controlarlos, por lo que se observa un predominio de casos de TVT en animales que han vivido en la calle (Figura 26).

Tabla II. Distribución de casos de TVT según la raza de los animales.

RAZAS	Nº DE CASOS
Mestizas	59
Husky Siberiano	3
Collie	4
Labrador	2
Dogo Argentino	1
Pekinés	1
Golden Retriever	1
Pit Bull	2
Boxer	5
Dobermann	2
Ovejero Alemán	4
Galgo	4
Fox Terrier	1

En relación al sitio anatómico de localización de la masa tumoral, se consideraron aquellos TVT que se desarrollaron en algún órgano genital como vagina, vulva, pene, prepucio (presentación genital) y como extragenital se agrupó a cualquier tumor observado fuera de esa localización. En el 73,3% de los casos (n: 66) fue de presentación genital y en 2

de ellos el tumor se extendía al útero. Solo en el 23,3% (n: 21) el tumor fue extragenital y en un un 3,3% (n: 3) se localizó a nivel de órganos genitales y además en mucosa nasal y piel (Figura 27).

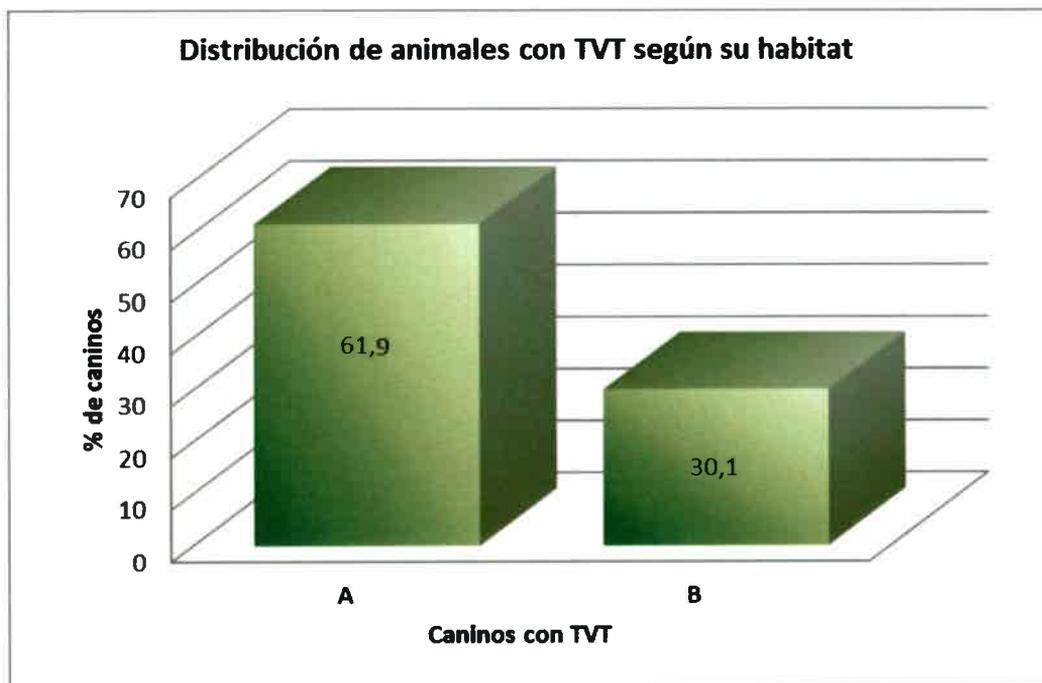


Figura 26. Porcentaje de animales con TVT según su hábitat de vida. A: animales callejeros o recogidos de la calle. B: animales con hábitat domiciliario pero con salida a la calle.

En las hembras, los tumores genitales se observaron en 43 casos a nivel de vagina, vestíbulo y vulva (Figura 28), 1 en zona perivulvar y 2 en útero y fondo de vagina, los cuales fueron diagnosticados por radiografía (Figura 29) y ecografía (Figura 30) y 1 de las hembras tuvo el tumor de localización extragenital (en paladar superior, maxilar y ganglio), 3 en ano y peri-anal y 1 en cavidad abdominal. De los machos, 19 animales presentaron tumoraciones en el pene y prepucio (Figura 31 y 32) en zona parapeneana, 2 en pene y además en piel y mucosa nasal. De las neoplasias localizadas extragenitalmente en los machos, hubo 3 animales que presentaron tumores en recto, ano y región perianal, 12 machos con TVT nasal, 1 bucal y 1 en donde estaba comprometido tanto la mucosa nasal como bucal.

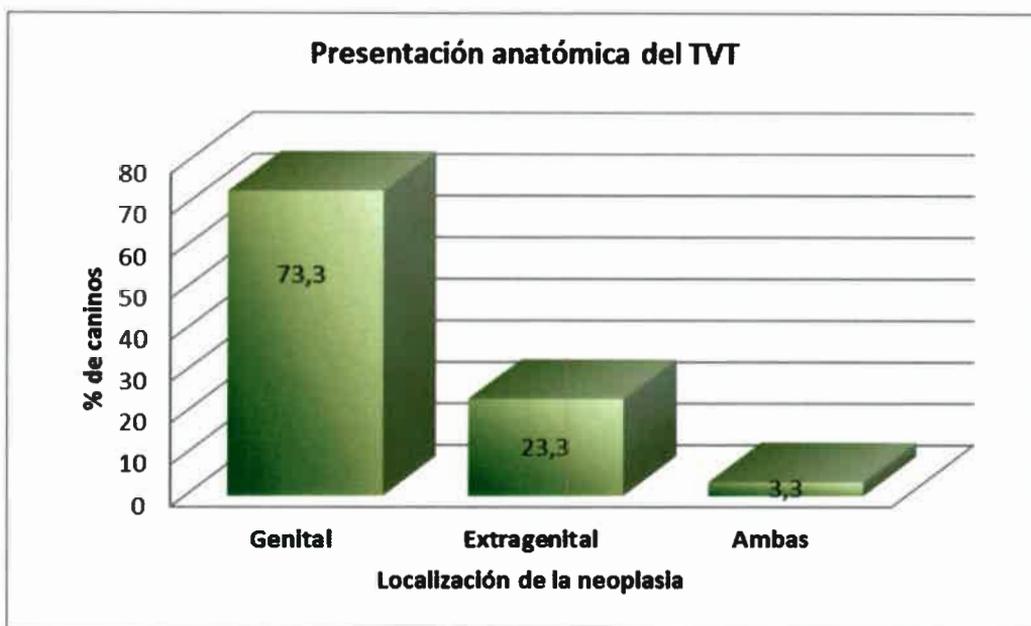


Figura 27. Distribución de casos de TVT según la localización anatómica de la masa tumoral.

La presentación extragenital en hembras fue del 11.5% mientras que en machos fue de 41,7%. La presentación extragenital de TVT fue significativamente mayor en machos (Prueba de Chi Cuadrado, $p \leq 0.05$).

El tamaño de los tumores al momento de la consulta varió de 0,5 cm a 18 cm. El valor promedio fue de 6,5 cm.

Los signos clínicos variaron según la localización del tumor. En la mayoría de los casos de localización genital del tumor se observó sangrado vulvar (Figura 28) o prepucial. En el caso de la hembra pekinés se observó una marcada deformación facial, exoftalmo y epistaxis (Figura 33).

Los caninos con TVT nasal presentaban deformación y/o sangrado persistente.



Figura 28. Presentación clínica del TVT. Tumor genital, localizado en el vestíbulo vaginal. El tumor presenta aspecto de coliflor, es friable y sangrante.

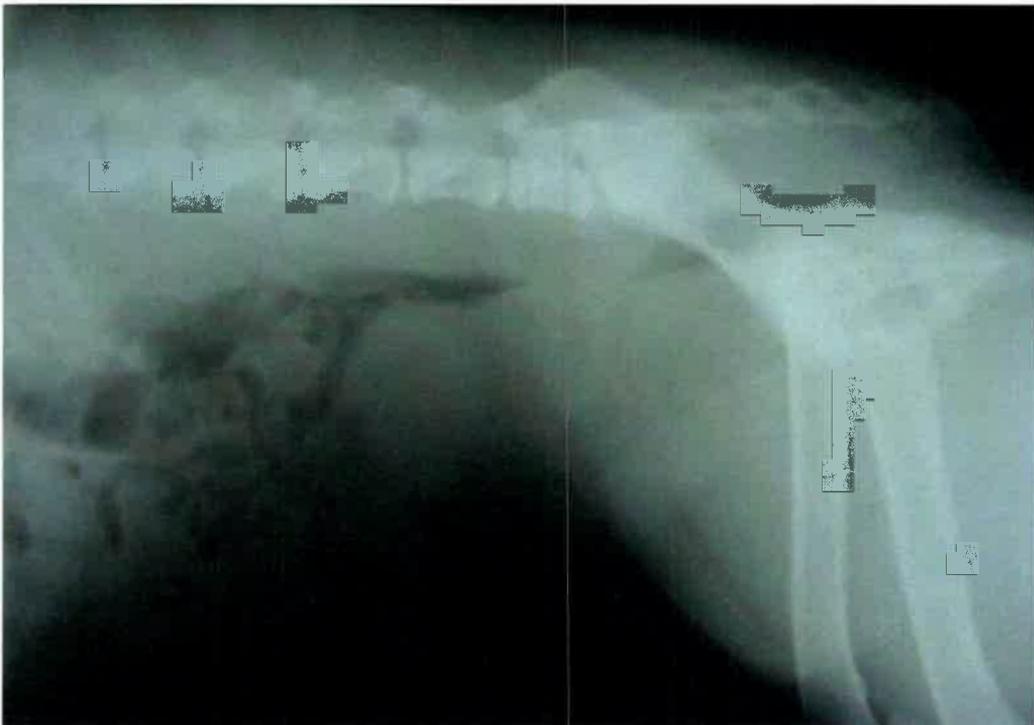


Figura 29. Radiografía latero-lateral de abdomen, se observa en zona de proyección de vejiga y útero una imagen radiolúcida a ventral del recto. El intestino se encuentra desplazado hacia craneal.



Figura 30. Imagen ecográfica. Se observa una masa voluminosa, hipoeocénica, que se proyecta a craneal de la vejiga.



Figura 31. Presentación clínica del TVT. Tumor genital, localizado en la base del pene. El tumor es de aspecto verrugoso, friable y sangrante.



Figura 32. Presentación clínica del TVT. Tumor genital, localizado en el glande y extremo anterior del pene. El tumor presenta aspecto verrugoso, es friable y sangrante.

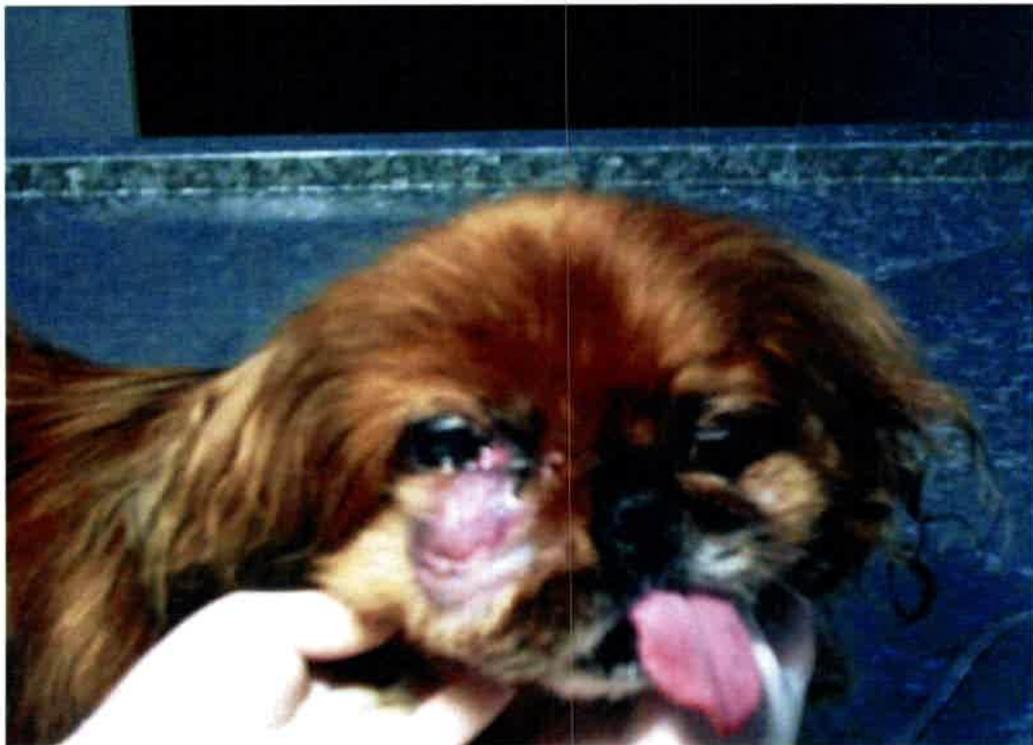


Figura 33. Presentación clínica del TVT. Tumor extragenital. El tumor se localiza en mucosa bucal. Se observa deformación facial, exoftalmo y epistaxis.

Al momento de la consulta, se realizaron hemogramas en 20 caninos; el 35% de los animales presentaba valores de eritrocitos, VGA y hemoglobina disminuidos respecto al rango de referencia para la especie canina y para la edad de los animales, clasificándose la anemia como leve en 4 pacientes y moderada en 3 caninos. El 65% de los animales tenía un eritrograma dentro de los valores de referencia (Tabla III). No se presentaron animales con valores de eritrocitos, hemoglobina y VGA por encima del rango de referencia (Figura 34).

En la Tabla III se presentan los resultados hematológicos que incluyen: VGA, eritrocitos, hemoglobina y leucocitos en los caninos con TVT en la etapa progresiva de la neoplasia, antes de iniciarse el tratamiento con sulfato de vincristina.

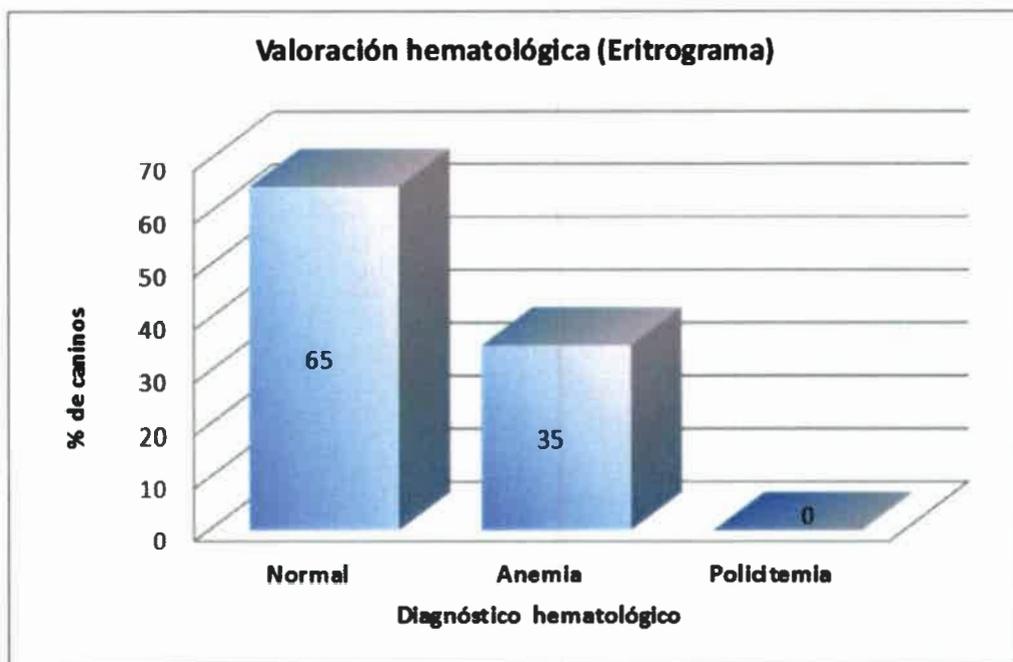


Figura 34. Representación gráfica de animales que presentaron anemia, policitemia y que no mostraron alteraciones eritrocitarias.

El porcentaje de animales que presentó anemia, se mantuvo a los 7 días de iniciado el tratamiento (35%) aunque solo en uno de los pacientes fue moderada, el resto cursó con una

anemia leve, mientras que a los 14 días de tratamiento el porcentaje disminuyó a 17,6% de pacientes con anemias leves a moderadas, a los 21 y 35 días fue del 16,6% de anemias leves (Figura 35). De los pacientes estudiados, el 28% presentó una disminución de los valores eritrocitarios durante la primer semana del tratamiento, valores que se normalizaron a los 14 días y el 28% de los animales que ingresaron al tratamiento con un cuadro de anemia, se recuperó durante los primeros 7 días de tratamiento.

Tabla III. Valores de VGA, eritrocitos, hemoglobina y leucocitos de los caninos con TVT al momento de realizar el diagnóstico y previo a iniciar un tratamiento.

Caso	VGA	Eritrocitos x 10 ⁶ /μl	Hemoglobina g/dl	Leucocitos x 10 ³ /μl
1	26,8	5,32	9,4	24,0
2	41,8	6,07	15,5	8,3
3	29,5	5,10	10,8	19,6
4	38,1	5,39	13,3	22,2
5	39,0	6,45	14,8	20,8
6	53,0	8,70	17,5	12,2
7	43,0	7,50	14,3	12,2
8	44,0	5,90	16,5	24,4
9	31,4	5,50	11,4	37,4
10	49,4	6,90	17,5	12,6
11	38,0	5,40	12,3	15,8
12	46,5	6,80	17,1	16,1
13	34,1	4,74	12,4	15,7
14	46,0	7,08	17,4	10,9
15	42,8	5,89	15,3	16,5
16	36,0	5,60	11,9	7,4
17	36,0	6,30	12,0	20,6
18	41,5	5,95	14,9	14,8
19	18,0	4,10	5,8	21,4
20	40,2	5,46	14,0	10,9
Promedio:	38,8	6,01	13,71	17,19
Valor máximo:	53,0	8,70	17,50	37,40
Valor mínimo:	18,0	4,10	5,80	
D.E.	8,15	1,04	3,04	6,95
C.V.	0,21	0,17	0,22	

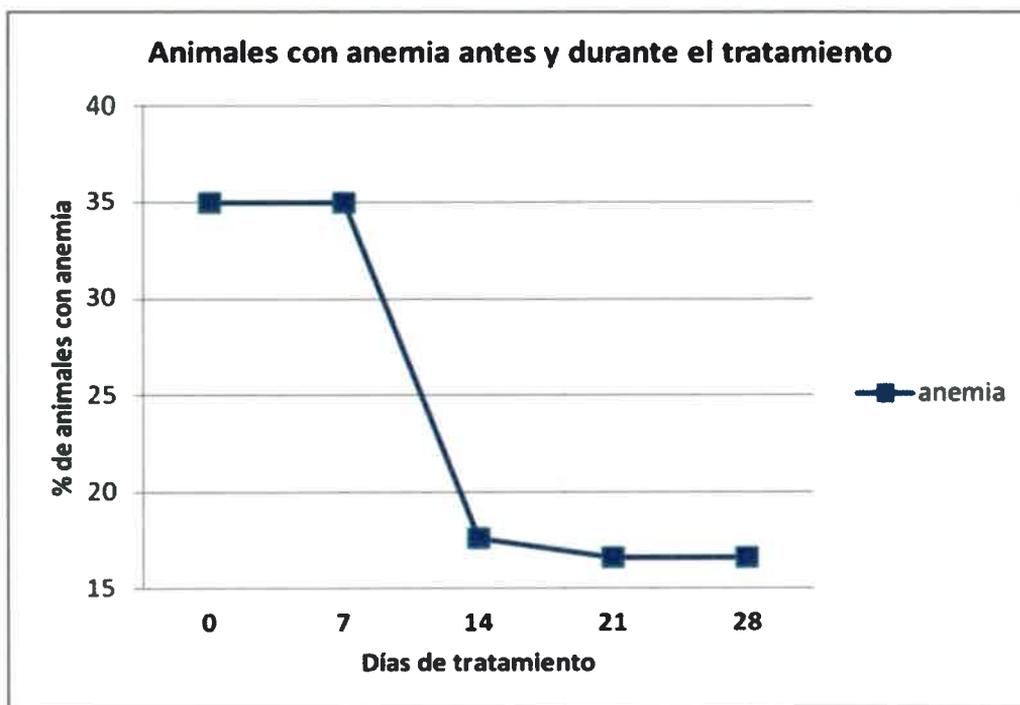


Figura 35. Porcentaje de animales que cursó con anemia previo y durante el tratamiento.

El volúmen corpuscular medio (VCM) tuvo un promedio de $64,3 \mu^3 \pm 8 \mu^3$ con una máxima de $74,6 \mu^3$ y una mínima de $43,9 \mu^3$ y un C.V. de 10%. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) tuvo un promedio de $35,3\% \pm 1,8\%$ con un máximo de 37,9% y un mínimo de 32,2% y un C.V. de 10%. La población eritrocitaria, morfológicamente fue en un 75% normocítica normocrómica y el 25% restante microcítica normocrómica, sin embargo, en los pacientes anémicos, el 66,6% tenía anemias microcíticas normocrómicas. La hemorragia, valorada macroscópicamente, en algunos casos era de una magnitud importante (Figura 36).

El 35% de los animales presentó leucocitosis moderada, es decir, incremento en la cantidad de leucocitos con valores correspondidos entre $17,0$ y $30,0 \times 10^3 /\mu\text{l}$. El 5% tenía leucocitosis marcada (valores por encima de $30,0 \times 10^3 /\mu\text{l}$) y el 60% de los caninos mostró

una cantidad de leucocitos dentro del rango de referencia (entre $6,0$ y $17,0 \times 10^3 /\mu\text{l}$) (Figura 37). La leucocitosis iba acompañada de neutrofilia (40% de los animales), desvío a la izquierda regenerativo leve (10%), linfopenia (20%), monocitosis (35%), eosinofilia (55%), eosinopenia (5%). Los valores promedios de leucocitos totales y diferenciales con sus correspondientes estadísticos descriptivos en la fase progresiva y regresiva del tumor, se muestran en las Tablas IV, V, VI, VII, VIII, IX.



Figura 36. Imagen que muestra la magnitud de la hemorragia que puede producirse en relación al TVT.

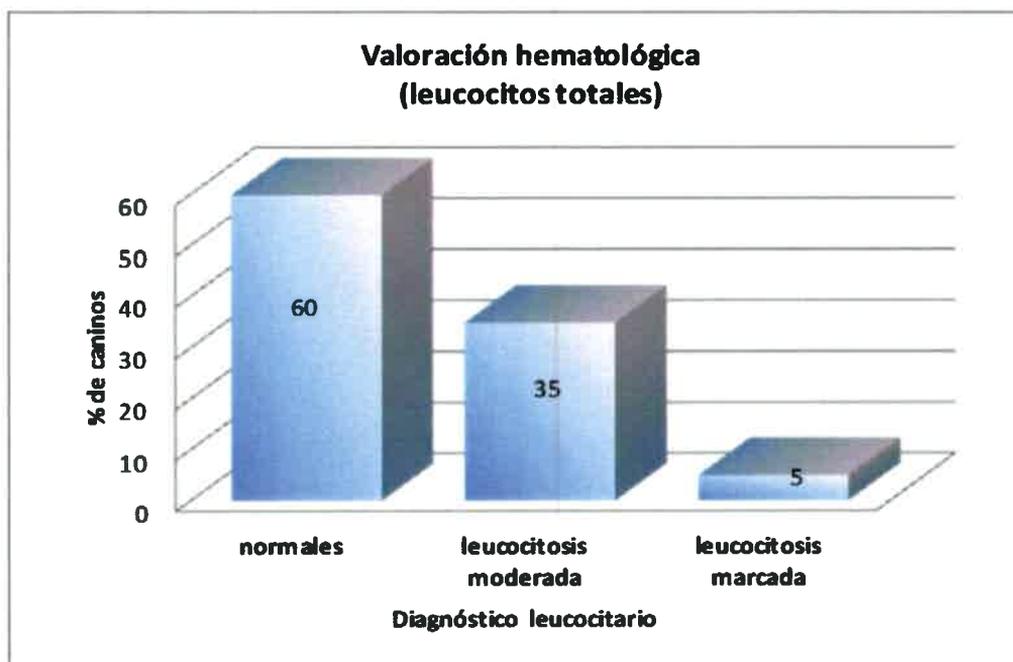


Figura 37. Representación gráfica de la cantidad de animales en base al valor total de leucocitos.

Tabla IV. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase progresiva del tumor (previo al tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/ $10^3/\mu$ l						
Promedio:	16,550	0,072	10,803	1,868	1,188	2,299	0
V.Máximo:	37,4	0,740	20,16	3,795	2,4	16,456	0
V.Mínimo:	7,4	0	5,071	0,240	0,222	0,300	0
D.E.:	6,835	0,198	4,634	1,045	0,599	3,534	0
C.V.:	0,41	2,73	0,43	0,56	0,50	1,54	0

Tabla V. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (7 días después de iniciarse el tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/10 ³ / μ l						
Promedio:	10,828	0,048	5,4	2,040	1,509	1,637	0
V.Máximo:	21,4	0,347	12,893	3,575	8,69	5,610	0
V.Mínimo:	3,9	0	0,33	0,66	0,136	0,08	0
D.E.:	5,395	0,098	3,889	0,957	1,941	1,613	0
C.V.:	0,50	2,04	0,72	0,47	1,29	0,99	0

Tabla VI. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (14 días después de iniciarse el tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/10 ³ / μ l						
Promedio:	8,544	0,034	4,538	2,013	1,015	0,916	0
V.Máximo:	15,4	0,184	8,775	4,2	3,78	3,08	0
V.Mínimo:	4,5	0	1,0	0,46	0	0,09	0
D.E.:	3,318	0,061	2,383	1,05	0,895	0,845	0
C.V.:	0,39	1,79	0,53	0,52	0,88	0,92	0

Tabla VII. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (21 días después de iniciarse el tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/10 ³ / μ l						
Promedio:	9,267	0,031	4,769	2,41	0,82	1,516	0
V.Máximo:	17,6	0,176	9,504	4,048	1,978	4,524	0
V.Mínimo:	4,5	0	1,71	1,118	0,182	0,370	0
D.E.:	4,218	0,061	2,309	0,974	0,529	1,44	0
C.V.:	0,46	1,99	0,48	0,40	0,64	0,95	0

Tabla VIII. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (28 días después de iniciarse el tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/10 ³ / μ l						
Promedio:	9,4	0,013	5,599	1,909	0,504	1,719	0
V.Máximo:	13,4	0,063	11,524	3,348	1,534	3,776	0
V.Mínimo:	4,7	0	2,632	1,410	0,188	0,470	0
D.E.:	3,722	0,028	3,542	0,818	0,578	1,45	0
C.V.:	0,40	2,24	0,63	0,43	1,15	0,84	0

Tabla IX. Valores promedios de leucocitos totales y diferenciales en animales en fase regresiva del tumor (35 días después de iniciarse el tratamiento).

	LT	NB / μ l	N / μ l	L / μ l	Mo / μ l	E/ μ l	B / μ l
	/10 ³ / μ l						
Promedio:	8,338	0	4,045	2,663	0,788	0	0
V.Máximo:	9,450	0	5,103	3,87	1,6	0	0
V.Mínimo:	6,9	0	3,6	1,656	0,27	0	0
D.E.:	1,134	0	0,76	0,914	0,569	0	0
C.V.:	0,14	0	0,18	0,34	0,72	0	0

Cuando se inició el tratamiento, durante los 7 y 14 días posteriores al comienzo del mismo, se observó una disminución brusca de los leucocitos en el 100% de los casos (n: 20), el 85% (n: 17) de los pacientes presentó una disminución de los leucocitos ya en la primer semana del tratamiento y esa reducción se produjo a expensas de una disminución de los neutrófilos (Figura 40), observándose verdaderas neutropenias (valores de neutrófilos por debajo de los $3,0 \times 10^3/\mu$ l) en el 45% de los pacientes (n: 9). Los leucocitos y neutrófilos, se mantuvieron luego disminuídos mientras duró el tratamiento. Se analizaron estadísticamente las variables leucocitos y neutrófilos, de los datos se realizó un ANOVA no paramétrico (Test de Kruskal Wallis), obteniéndose para ambas variables $p \leq 0.0001$ (Figuras 38 y 39), lo cual,

indica que la disminución observada entre las muestras obtenidas previo al tratamiento y posterior al mismo, son significativas estadísticamente, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los días 7 y 14 del tratamiento.

Concentración de leucocitos en función de los días de tratamiento

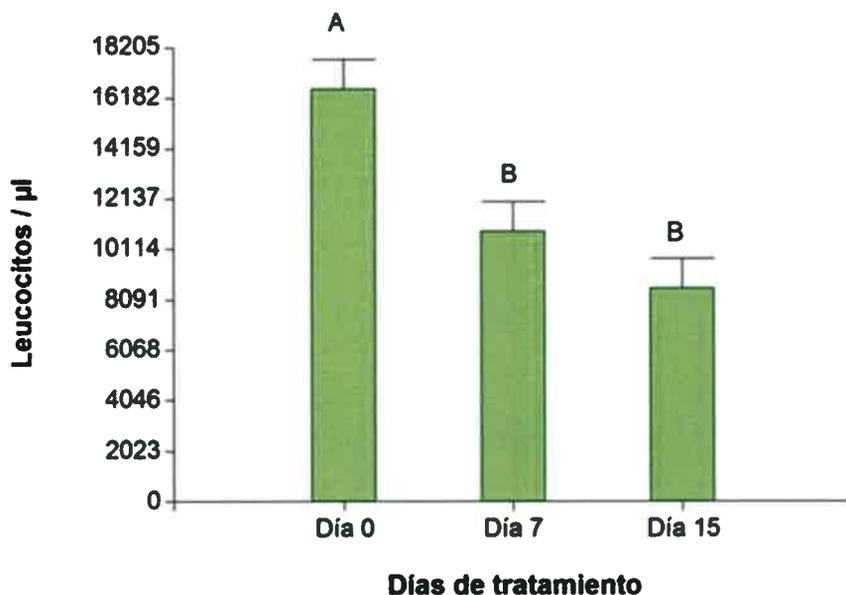


Figura 38. Concentración de leucocitos en sangre, antes y durante el tratamiento con vincristina. Letras diferentes son significativas estadísticamente ($p \leq 0,05$).

Los linfocitos y monocitos, fluctuaron sin una tendencia establecida, con valores por encima de los de referencia para los monocitos a los 7 días de iniciado el tratamiento.

Los eosinófilos, si bien no tuvieron una tendencia de modificación a lo largo del tratamiento de los pacientes con TVT, se presentaron por encima del valor de referencia en las etapas previas al tratamiento y durante los 7, 21 y 28 días siguientes al inicio de la quimioterapia (Figura 41).

Concentración de neutrófilos en función de los días de tratamiento

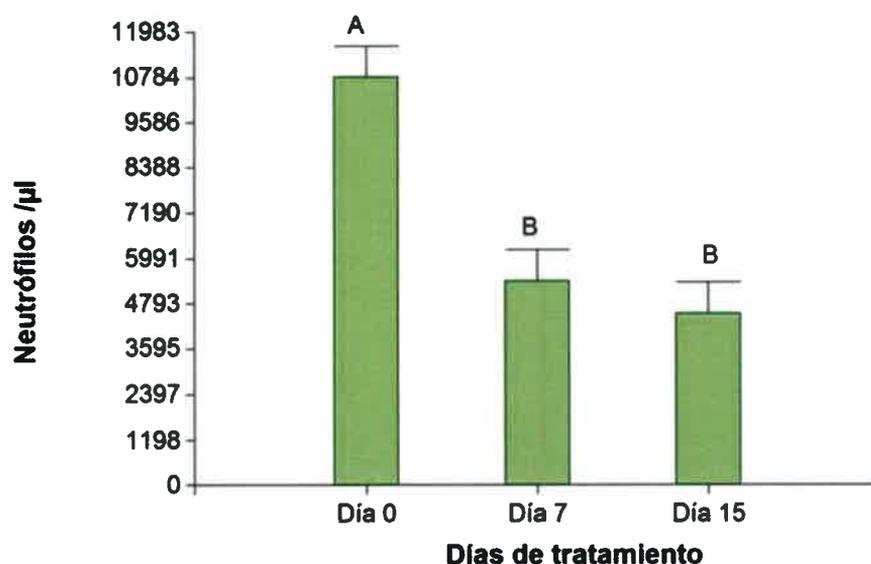


Figura 39. Concentración de neutrófilos en la etapa previa y durante el tratamiento con vincristina. Letras diferentes son significativas estadísticamente ($p \leq 0,05$).

La cantidad de animales que presentaron eosinofilia, fue de un 55% previo al tratamiento, 36,8% a los 7 días de iniciado el tratamiento, 31,5% a los 14 días, 33% a los 21 días, 50% a los 28 días y 25% a los 35 días. No se observaron eosinopenias como consecuencia de la terapia. Se analizó estadísticamente la variable eosinófilo para la etapa previa y a los 7 y 14 días de tratamiento; se realizó un ANOVA no paramétrico (Test de Kruskal Wallis), obteniéndose un $p \leq 0.0932$ (Figura 40).

En cuanto a las plaquetas, los resultados obtenidos con la correspondiente estadística descriptiva se muestran en la Tabla X. Los promedios de los valores de plaquetas se encontraron dentro de los valores de referencia, tanto en fase progresiva como regresiva, existiendo un porcentaje de animales que cursaron con trombocitopenia y trombocitosis en cada etapa. Los mismos se muestran en la Tabla XI.

Concentración de eosinófilos en función de los días de tratamiento

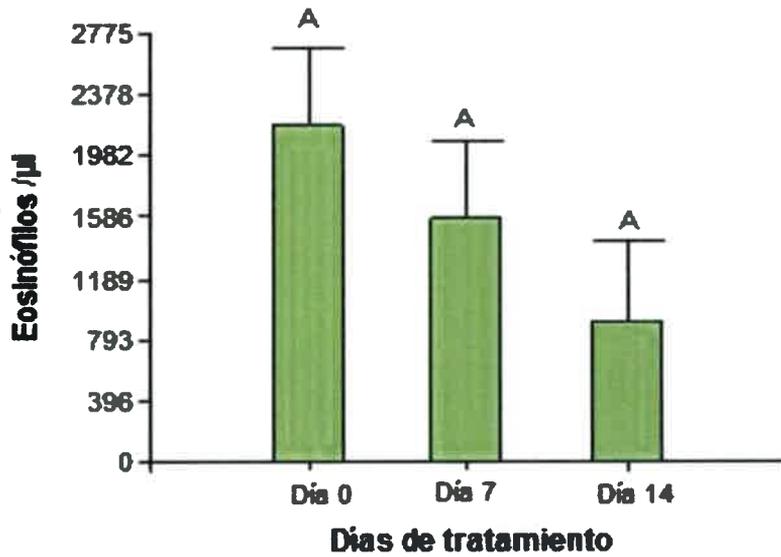


Figura 40. Concentración de eosinófilos en la etapa previa y durante los 7 y 14 días de tratamiento con vincristina. Letras iguales no son diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

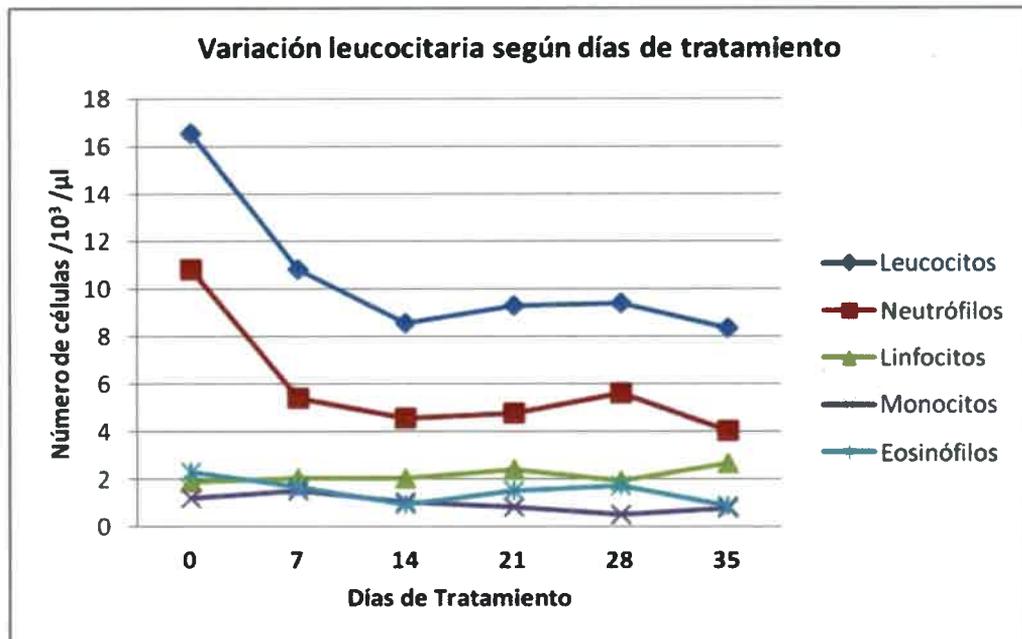


Figura 41. Variaciones leucocitarias total y diferencial previa y durante el tratamiento con vincristina.

Tabla X. Valores promedios de plaquetas en animales previo al tratamiento (0 días) y en fase regresiva del tumor (a los 7, 14 y 21 días post tratamiento).

	0 días	7 días	14 días	21 días
	/10 ⁶ /μl	/10 ⁶ /μl	/10 ⁶ /μl	/10 ⁶ /μl
Promedio:	285,22	353,63	319,89	325,80
V.Máximo:	596,00	629,00	590,00	567,00
V.Mínimo:	68,00	52,00	93,00	87,00
D.E.:	157,50	179,04	173,38	189,09
C.V.:	0,55	0,51	0,54	0,58

Tabla XI. Porcentaje de animales que cursan con trombocitopenias y trombocitosis en la etapa progresiva y regresiva inducida por el tratamiento.

	0 días	7 días	14 días	21 días
	% animales	% animales	% animales	% animales
Trombocitopenia:	22,2	12,5	33,3	20
Trombocitosis:	11,1	12,5	11,1	0

La actividad de ALT (GPT), se encontró dentro de los valores de referencia para el canino, tanto en las muestras obtenidas previo al tratamiento como en las recogidas durante el seguimiento del tratamiento con vincristina. Los promedios de actividad de ALT para cada semana previo y posterior al tratamiento se muestran en la Figura 42.

Las concentraciones de urea al inicio del estudio, se observaron entre los valores de referencia para el canino y presentaron una leve disminución a los 7 días del tratamiento, observándose fluctuaciones a través del tiempo sin una tendencia establecida (Figura 43).

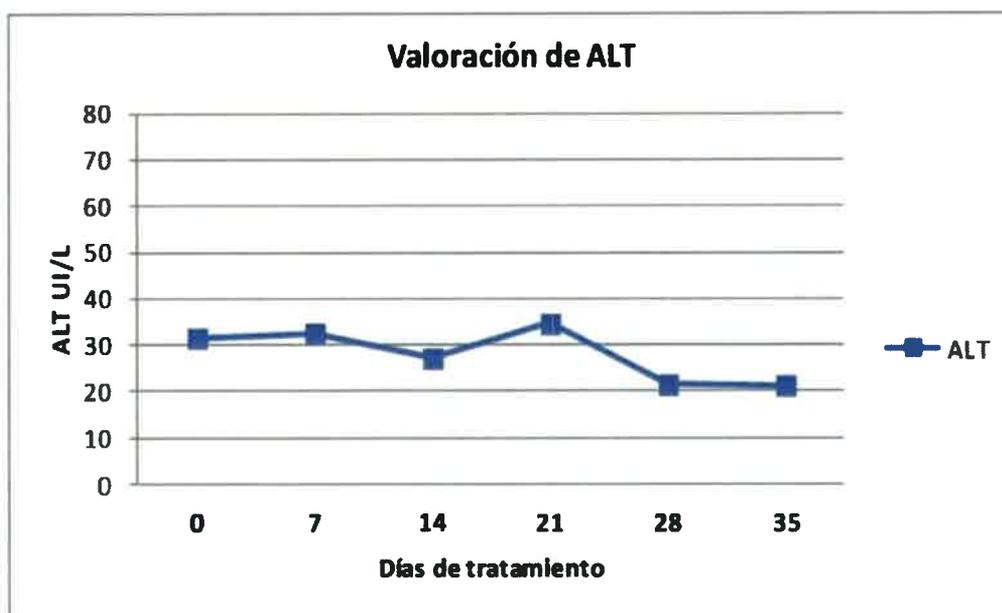


Figura 42. Variación en la actividad de ALT previo y durante el tratamiento con vincristina.

Para el análisis de la variable urea se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y un test LSD-Fisher *a posteriori* para detectar las diferencias estadísticamente significativas. La disminución en las concentraciones de urea observada a los 7 días de iniciado el tratamiento, no fué significativa estadísticamente ($p \leq 0,1582$) (Figura 44).

La creatinina sérica se mantuvo dentro de los valores de referencia a lo largo de todo el estudio y no presentó cambios significativos durante el tratamiento (Figura 43).

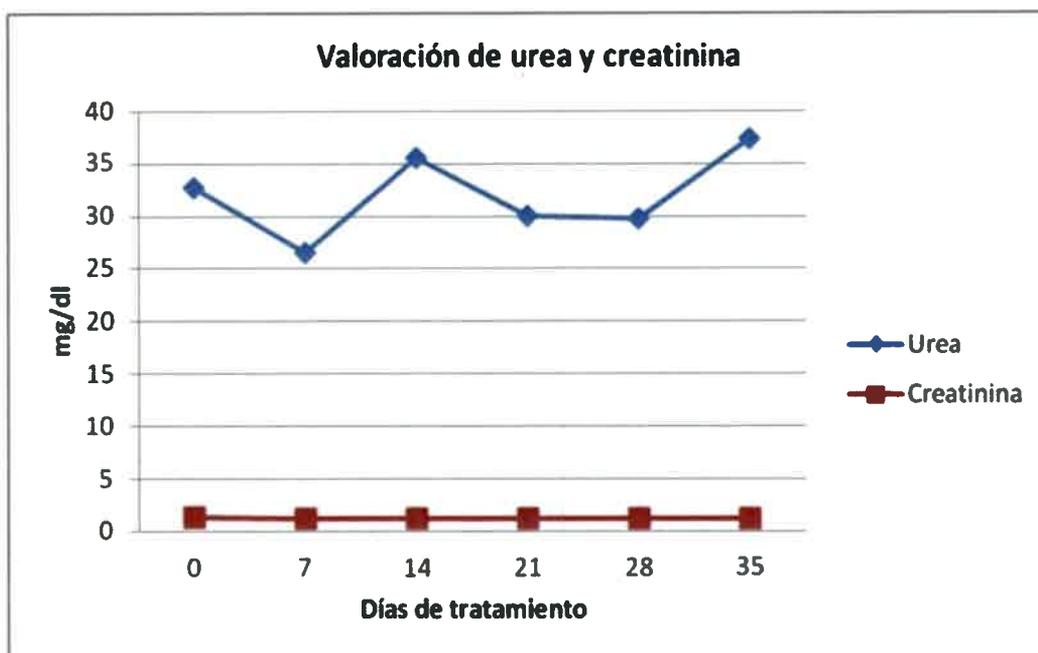


Figura 43. Variación en la concentración de urea y creatinina sérica previo y durante el tratamiento con vincristina.

Concentración de urea en función de los días de tratamiento

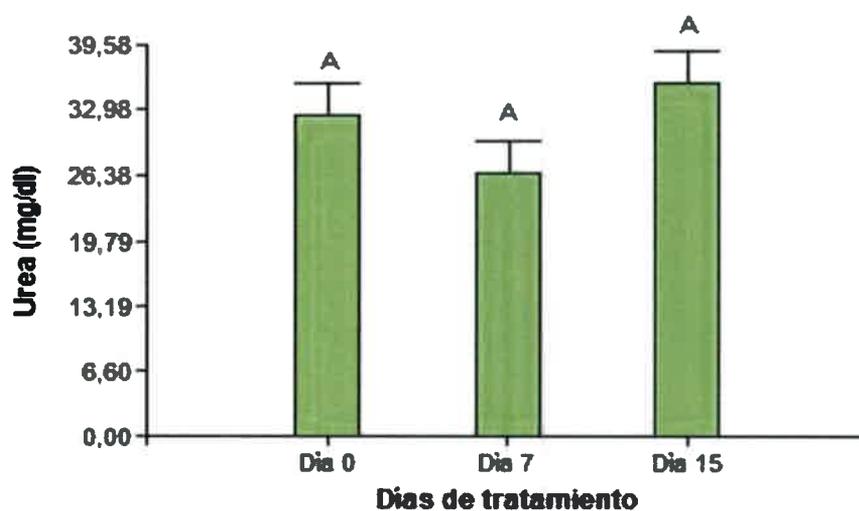


Figura 44. Concentraciones promedio de urea, previo y durante el tratamiento con vincristina. Letras iguales no son diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Las corridas electroforéticas sobre acetato de celulosa mostraron las distintas bandas correspondientes a cada una de las proteínas séricas, separándose en: albúminas (Alb), alfa-1 globulinas (α_1), alfa-2 globulinas (α_2), beta-1 globulinas (β_1), beta-2 globulinas (β_2) y gama globulinas (γ_1 y γ_2). Estas últimas no mostraron una banda neta de separación por lo cual se las consideró juntas (Figura 45).

Los valores promedios de proteínas totales (PT), Alb, globulinas (Glob), α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 y γ_2 (Figuras 46 y 47), obtenidos en los animales previo al tratamiento y durante las 5 semanas posteriores al inicio de la administración de sulfato de vincristina se muestran en la Tabla XII.

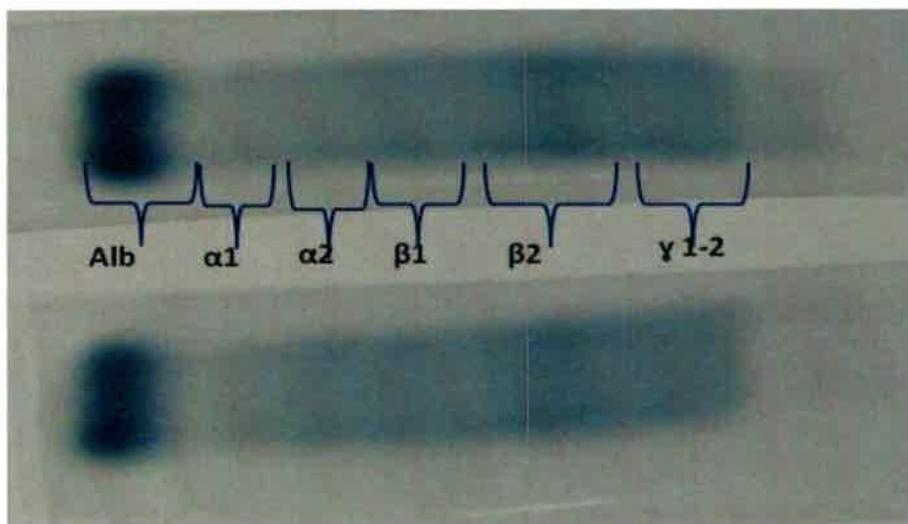


Figura 45. Electroforesis de proteínas sobre acetato de celulosa. Tinción de Amido Schwartz.

Los valores promedios de PT, Alb, Glob, α_1 , α_2 , β_1 , γ_1 y γ_2 , se encontraron dentro de los valores de referencia para la especie canina. Las concentraciones promedio para la fracción β_2 de las proteínas se observaron en el límite superior del valor de referencia ó ligeramente incrementada.

Tabla XII. Valores promedios de proteínas totales, albúmina, globulinas totales y diferenciales antes y durante el tratamiento con vincristina.

Días de iniciado el tratamiento	PT g/dl	Alb g/dl	Glob g/dl	$\alpha 1$ g/dl	$\alpha 2$ g/dl	$\beta 1$ g/dl	$\beta 2$ g/dl	$\gamma 1-2$ g/dl
0	7,75	3,47	4,23	0,31	0,58	0,63	1,69	1,02
7	7,27	3,52	3,75	0,27	0,54	0,54	1,5	0,9
14	7,63	3,55	4,08	0,34	0,57	0,64	1,59	0,94
21	7,36	3,8	3,56	0,31	0,45	0,54	1,42	0,84
28	7,43	3,76	3,68	0,33	0,49	0,61	1,32	0,93
35	6,83	3,57	3,26	0,22	0,37	0,49	1,31	0,87
Valor de referencia:	5,4-7,1	2,6-3,3	2,7-4,4	0,2-0,5	0,3-1,1	0,7-1,3	0,6-1,4	0,9-2,2
Promedio:	6,1	2,9	3,4	0,3	0,6	0,82	0,89	1,5
D.E.:	0,52	0,19	0,51	0,03	0,21	0,23	0,33	0,39

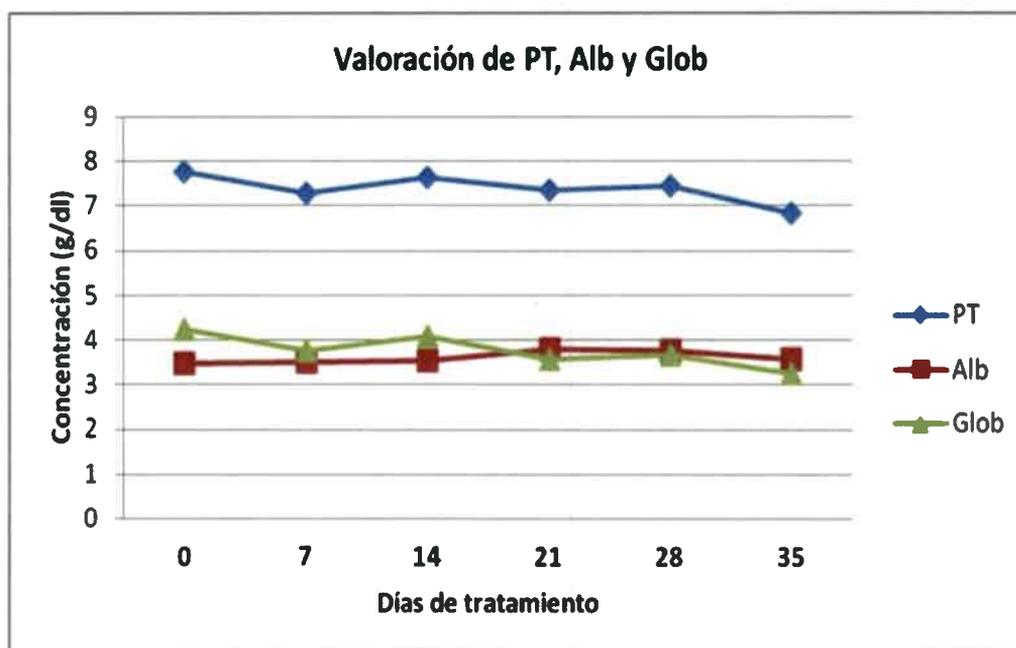


Figura 46. Representación gráfica de los valores promedios de PT, Alb y Glob previo y durante el tratamiento con vincristina.

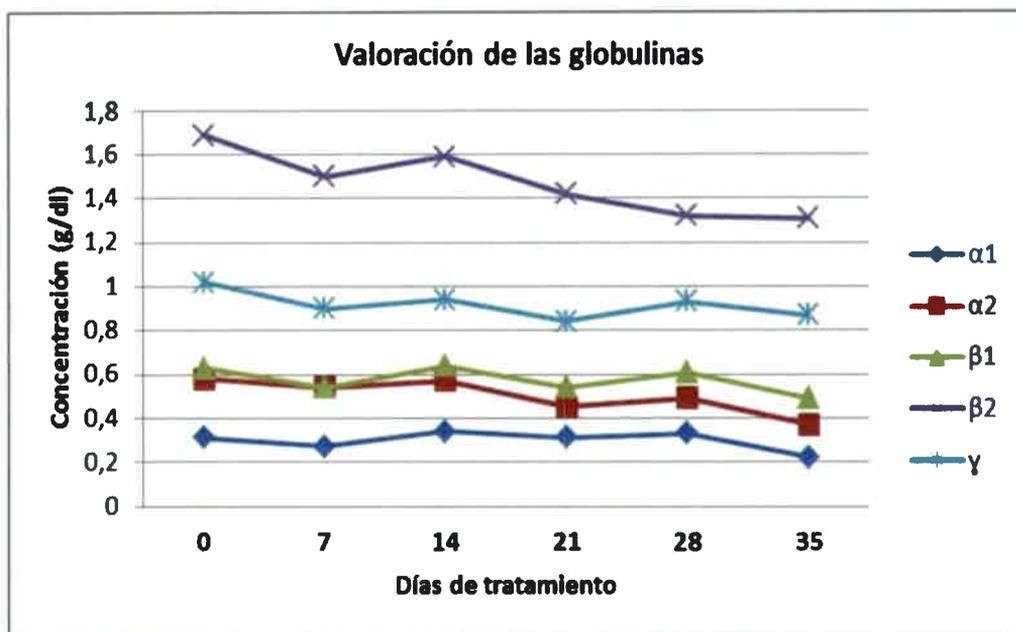


Figura 47. Representación gráfica de los valores promedios de las diferentes globulinas previo y durante el tratamiento con vincristina.

De los animales que fueron tratados con sulfato de vincristina vía endovenosa a dosis de 0,025 mg/Kg cada 7 días, 17 caninos (85%) presentaron remisión del tumor, no observándose recidiva en el período de uno a dos años siguientes. La cantidad de dosis necesarias para reducir totalmente la masa tumoral en este grupo de animales varió de 3 a 7 aplicaciones con una media de 4,59 dosis de vincristina para la población seleccionada, con un D.E. de 1,37 y un C.V. de 29,8%. Los 3 animales restantes (15%), no tuvieron una buena respuesta al tratamiento. Estos 3 casos, fueron identificados con los números 20, 21 y 22. Dos de ellos (caso 20 y caso 22), fueron resistentes al sulfato de vincristina a la dosis programada y el tercero (caso 21) que presentaba TVT extragenital con compromiso de cara y vías aéreas superiores, fue un animal en el que demoraron en realizar el diagnóstico y se inició el tratamiento cuando el tumor estaba muy avanzado y murió debido a complicaciones cardiorrespiratorias cuando se había aplicado la segunda dosis del sulfato de vincristina.

En las muestras obtenidas por PAAF e hisopados de la masa tumoral en los animales previo al inicio del tratamiento y cuyo material fue extendido en portaobjetos y teñido con

May Grünwald Giemsa (MGG), se observó en su mayoría, extendidos hipercelulares. Las células predominantes fueron las neoplásicas, cuyas características morfológicas eran redondas y otras ovoides, con una relación núcleo citoplasma levemente aumentada debido a la presencia de un núcleo grande y con moderada cantidad de citoplasma. Los núcleos, de localización central en algunas y periféricas en otras, presentaban una dispersión de la cromatina granular y la mayoría de las células tenían uno o dos nucléolos prominentes, de forma circular y bien distintivos. Los citoplasmas presentaban distintos grados de basofilia, la cantidad de citoplasma fue variable, siendo menor en las células mas redondeadas; muchas células contenían pequeñas vacuolas bien delimitadas, especialmente aquellas células de formas más ovoides. En las muestras fue frecuente observar mitosis (Figura 48).

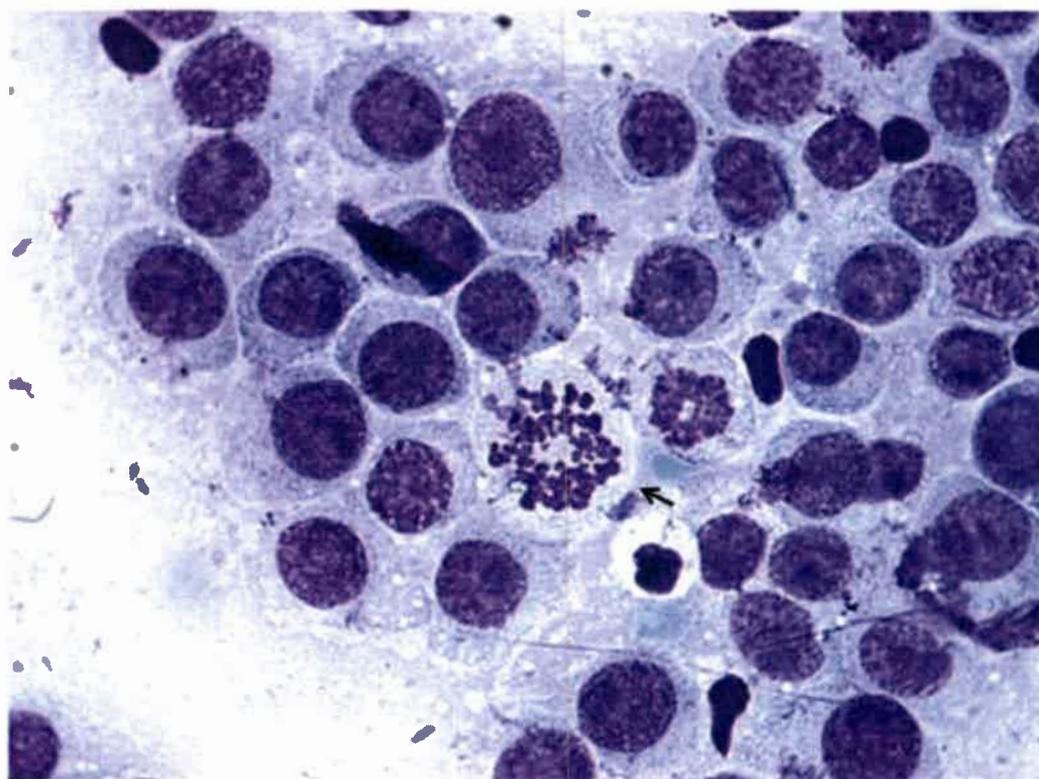


Figura 48. Microfotografía de una muestra citológica de TVT. Se observan células neoplásicas redondas, con núcleos grandes, nucléolos prominentes, citoplasmas abundantes. La flecha indica una célula en mitosis. Tinción de MGG. (1000x).

Las células presentaron ciertos criterios de malignidad, tales como pleomorfismo, anisocitosis, anisocariosis y nucléolos gigantes, con citoplasmas basófilos. Las membranas citoplasmáticas se distinguían perfectamente aún cuando las células se encontraban agupadas. Algunos extendidos presentaron otros tipos celulares como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos (Figura 49).

Los extendidos realizados por hisopados de la superficie de los tumores presentaron mayor cantidad de neutrófilos y bacterias (Figura 50).

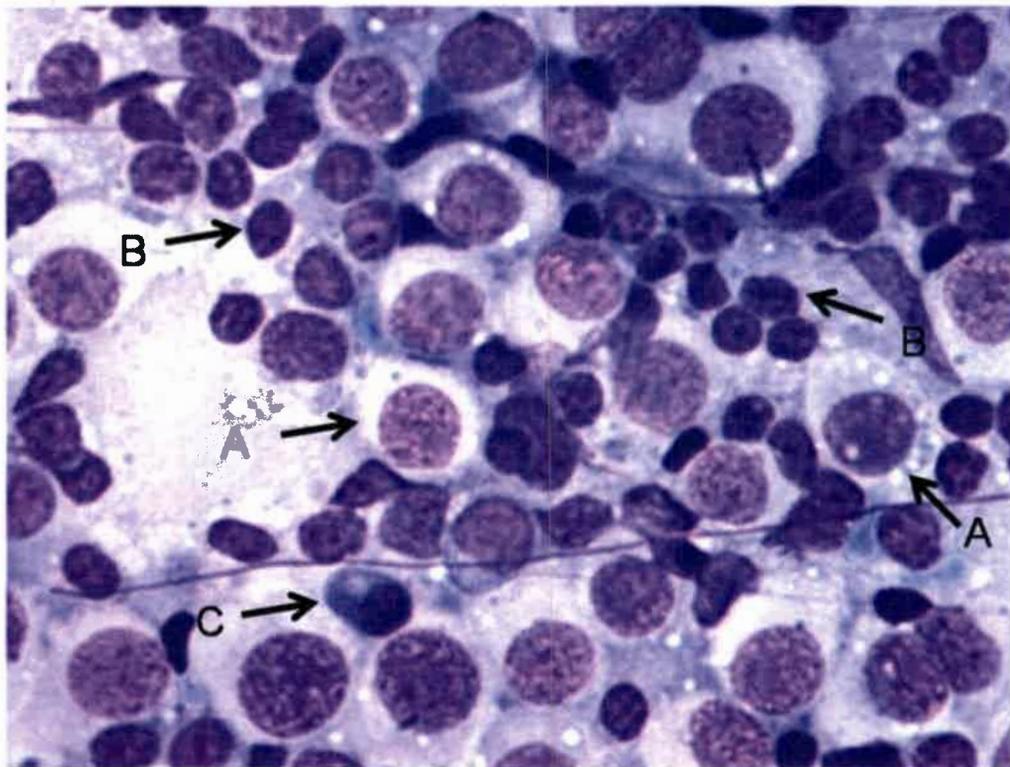


Figura 49. Microfotografía de una muestra citológica de TVT. Se observan, A: numerosas células neoplásicas de TVT; B: abundantes zonas con linfocitos y C: escasas células plasmáticas. Tinción de MGG. (1000x).

Los resultados de los estudios histopatológicos de las muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina (H/E), mostraron que en todos los casos, el tumor observado por

citología correspondía a TVT. La imagen histológica se caracterizó por la presencia de células redondas, ovoides y poliédricas, agrupadas de manera laxa o en masas compactas, dispuestas en cordones, filas o sueltas, intercaladas con un estroma vascular delicado. Presentaron núcleos redondos, grandes e hipercrómicos, con nucléolos centrales, únicos. Los citoplasmas fueron de tamaño variable, color rosado a claro; las figuras mitóticas se observaron con regular frecuencia (Figura 51). Generalmente se observó marcada vascularización; algunos cortes mostraron áreas de necrosis, ulceración e infiltrado de neutrófilos. Se observó en algunos casos un número variable de células plasmáticas, macrófagos y linfocitos infiltrando el tumor (TILs) (Figura 52) o en su perifería (Figura 53).

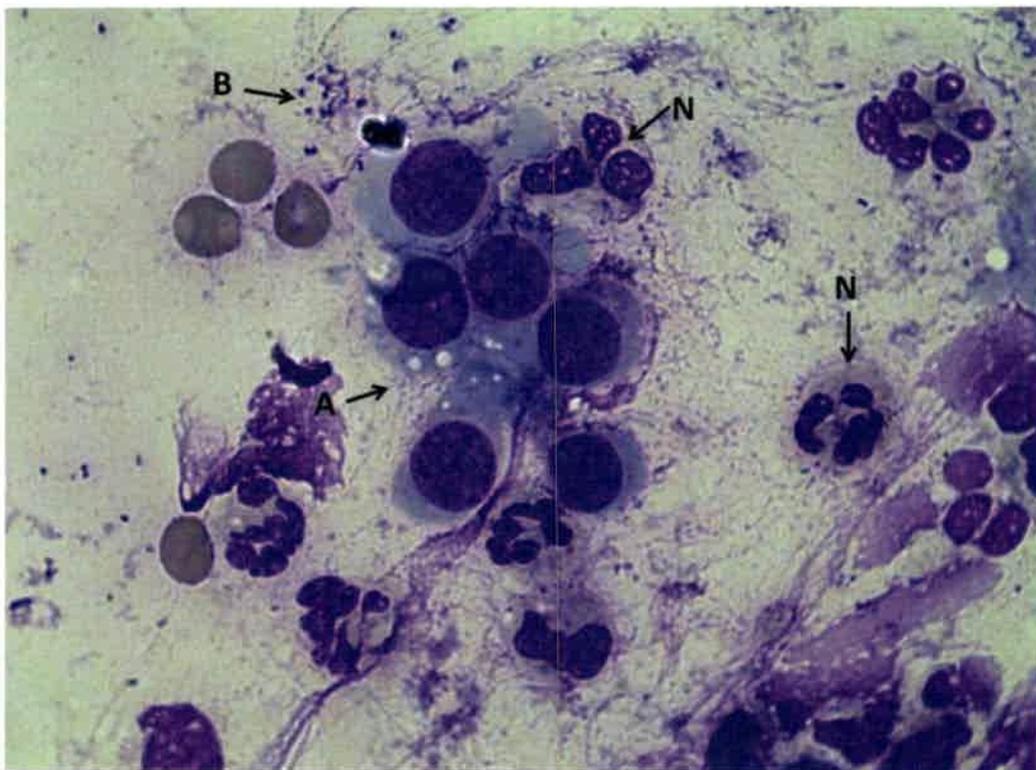


Figura 50. Microfotografía de una muestra citológica de TVT obtenida por hisopado de superficie. Se observan, A: células neoplásicas de TVT; B: bacterias y N: neutrófilos, muchos muestran cariólisis y citólisis. Tinción de MGG. (1000x).

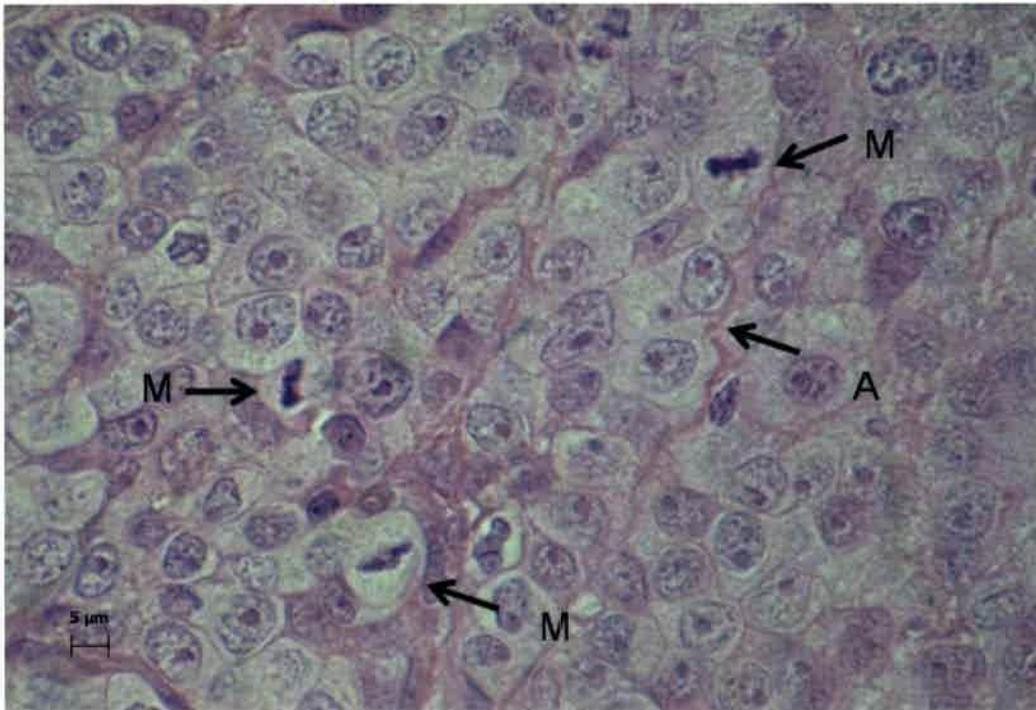


Figura 51. Microfotografía de TVT. Las células tumorales (A) son redondas u ovoides con núcleos redondos y nucléolos prominentes con citoplasmas variables. Se observan numerosas mitosis (M). Tinción de H/E. (1000x).

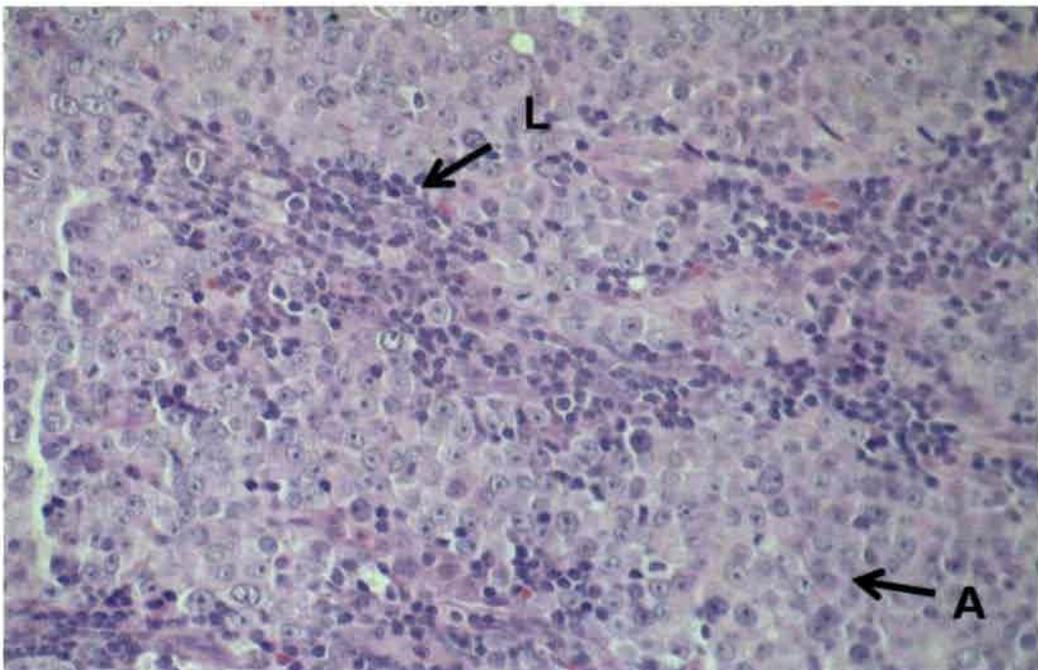


Figura 52. Microfotografía de TVT mostrando las células tumorales (A) y áreas de infiltrado linfoplasmocitario (L). Tinción de H/E. (400x).

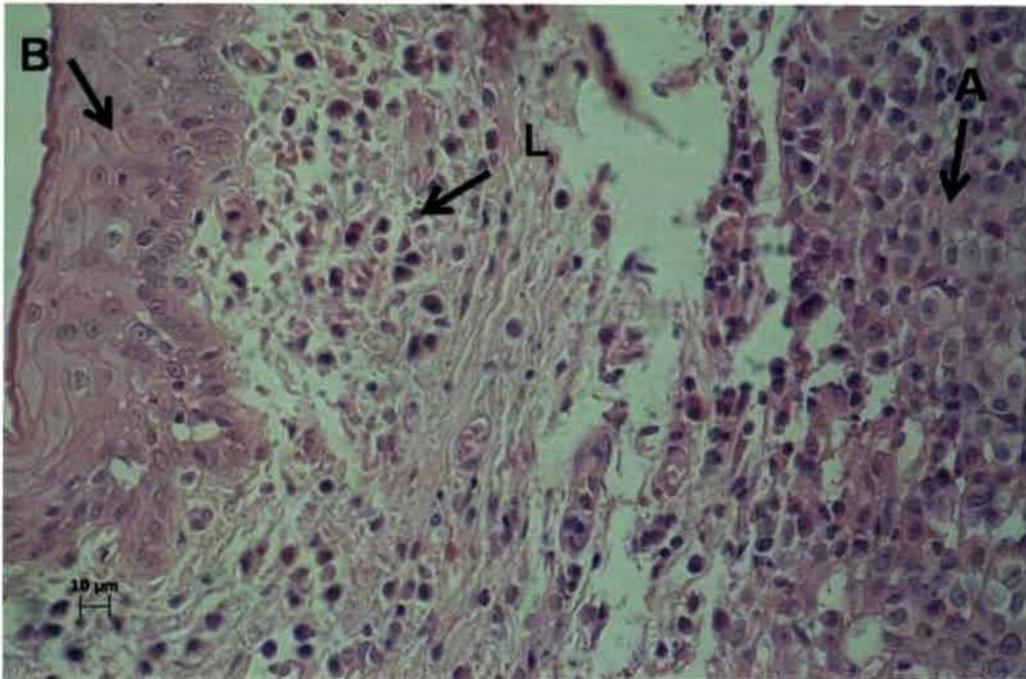


Figura 53. Microfotografía de TVT mostrando las células tumorales (A) y áreas de infiltrado linfoplasmocitario en la periferia del tumor (L). Se observa una zona epitelizada (B). Tinción de H/E. (400x).

A medida que se avanzó en el tratamiento, en la etapa de regresión del tumor, se observó un incremento en la cantidad de tejido conectivo, fibroblastos, angioblastos y linfocitos (TILs) entre las células neoplásicas (Figura 54).

La presencia de figuras mitóticas se observó en el 100% de los tumores previo a la realización del tratamiento (fase progresiva) y en algunos casos aún después de iniciado el tratamiento (fase regresiva). El índice mitótico (IM) en los casos problema (20, 21 y 22) tuvo una media de $0,46\% \pm 0,5$ (con un valor máximo de $1,03\%$ y un mínimo de $0,16\%$ y un C.V. de $108,6\%$). En los casos que respondieron bien a la vincristina el IM promedio fue de $0,57\% \pm 0,27$ con un valor máximo de $1,37\%$ y un mínimo de $0,25\%$ y un C.V. de $47,3\%$. A los 7 días de administrada la primera dosis de vincristina se realizó una segunda biopsia y se obtuvo un IM promedio de $0,62\%$ una máxima de $1,21\%$ y un mínimo de 0% con un D.E. de $0,3\%$ y un C.V. de $48,3\%$. En 11 animales, el índice mitótico una vez iniciado el tratamiento, a los 7 días post tratamiento fue superior o igual al valor observado previo al tratamiento (día

0). Al realizar el análisis de los datos de IM previo al tratamiento y 7 días posterior a la administración de la primer dosis de vincristina, se determinó mediante el test de Tukey, que las diferencias observadas en el IM no fueron estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) (Figura 55).

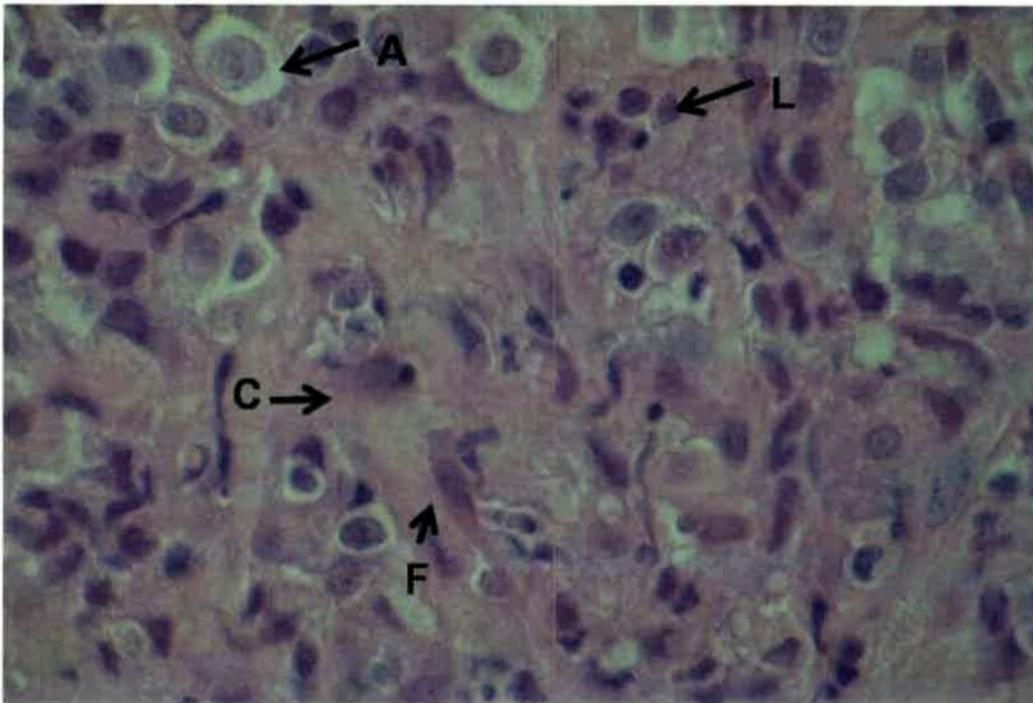


Figura 54. Microfotografía de TVT, en etapa regresiva, durante el tratamiento con vincristina. Se observan, (A): células tumorales aisladas, (L): infiltrado linfoplasmocitario en íntimo contacto con las células neoplásicas, (C): tejido conectivo y (F): fibroblastos. Tinción de H/E. (1000x).

A los 14 días de iniciado el tratamiento, posterior a la aplicación de la segunda dosis de vincristina se realizó una tercer biopsia a 5 pacientes y se obtuvo un IM promedio de $0,28\% \pm 0,19\%$, con una máxima de $0,56\%$ y un mínimo de 0% y un C.V. de $67,8\%$. En este caso, en todos los animales se observó una disminución respecto al valor anterior y al valor pre tratamiento. Los resultados de la estadística descriptiva de estos 5 pacientes se muestran en la

Tabla XIII. Si bien entre la primer y segunda dosis de vincristina, las diferencias en el IM no fueron significativas, luego de la segunda dosis de vincristina las diferencias observadas respecto al IM en fase progresiva, si resultaron ser estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) (Figura 56).

Índice mitótico en función de los días de tratamiento

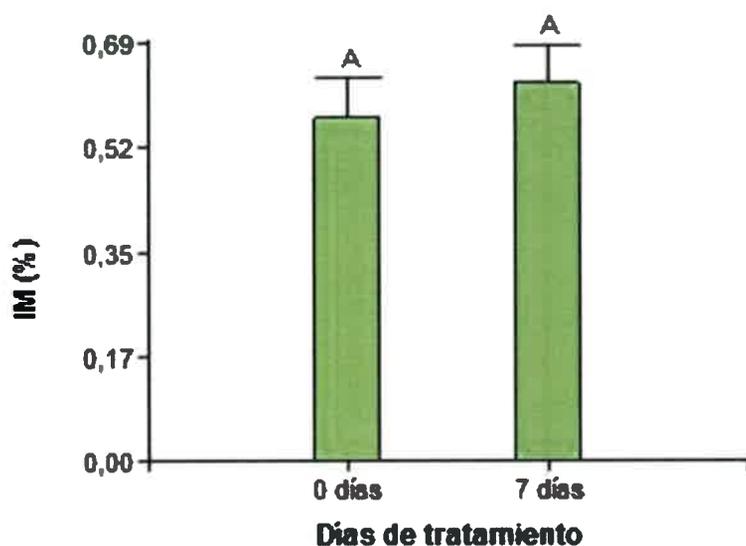


Figura 55. Índice mitótico en cortes histológicos de TVT, obtenido previo y 7 días posteriores a la aplicación de la primera dosis de vincristina. Letras iguales representan que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla XIII. Variación del IM (%) en 5 de los casos que respondieron al tratamiento con Vincristina.

Tiempo	Mínimo	Máximo	Medias	D.S.	C.V. (%)
Fase progresiva	0,31	1,37	0,80	0,39	48,7
Fase regresiva (7 días)	0,39	0,92	0,64	0,20	31,2
Fase regresiva (14 días)	0	0,56	0,28	0,21	75,0

Las muestras citológicas e histopatológicas se analizaron independientemente en distintos momentos del proceso. Se compararon los resultados y se agruparon en verdaderos positivos (VP) los casos en que se diagnosticó TVT tanto con el método citológico como histopatológico; falsos positivos (FP) para los casos en que se diagnosticó TVT por citología y no por histopatología y falsos negativos (FN) para los casos en que la citología no diagnosticó TVT y en el examen histopatológico correspondió a TVT. Se realizó un análisis de confianza definida por la sensibilidad de la técnica, utilizando los datos tal como se agruparon anteriormente (VP, FP, FN). Resultó que hubo 18 casos VP y no se presentaron FP ni FN. Del análisis de confianza resultó que la sensibilidad de la técnica citológica fue del 100%.

Índice mitótico en función de los días de tratamiento

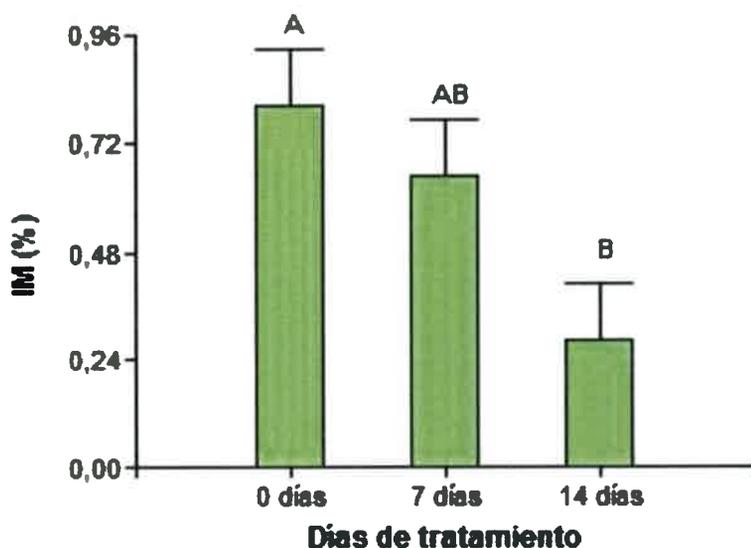


Figura 56. Índice mitótico en cortes histológicos de TVT, obtenidos previo, 7 y 14 días posteriores al inicio del tratamiento con vincristina. Letras diferentes representan que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Se realizó el recuento de partículas de AgNOR en forma manual e individual. Los AgNORs se observaron como puntos marrones oscuros en el núcleo y nucléolo de la célula de TVT y el resto de la célula se observó de un color amarillo pardo.

Cuando los puntos marrones se encontraban agrupados, una cuidadosa observación estableció el número total del conjunto. Si la masa de partículas era muy compacta e impedía el recuento diferencial, esa célula no era considerada en la evaluación. Dichos puntos, variaron en cantidad, tamaño y distribución según se considerara animales previo y posterior al tratamiento con sulfato de vincristina. La cantidad de AgNORs variaron de 0 a 16 puntos por célula, la mayoría de las veces distribuidos de forma aislada. Las formas eran redondeadas o ligeramente irregulares, ubicadas en el interior del núcleo, alrededor del nucléolo y en el nucléolo; en el caso 22, resistente a la vincristina, gran parte de los puntos se encontraban en los bordes nucleares. En la Figura 57 se muestra una tinción de AgNOR de uno de los casos resistentes a la vincristina, donde luego de la tercer aplicación de la droga, mantiene un porcentaje promedio de puntos AgNOR/ célula de TVT de 3,1; en tanto que el promedio observado en uno de los pacientes que respondió a la vincristina fue de 2,6 puntos AgNOR/ célula de TVT (Figura 58).

Durante el tratamiento se presentaron tres casos que podemos considerar como casos problema debido a la resistencia presentada al tratamiento o a una respuesta inadecuada al tratamiento con sulfato de vincristina a la dosis planificada. Estos fueron los casos identificados como 20, 21 y 22. En la Tabla XIV se muestra la cantidad de puntos de AgNOR/célula de TVT en cada uno de los animales, antes y durante el tratamiento. En ellos, el número de AgNOR por núcleo fue en promedio de $4,1 \pm 1,6$ y un C.V. de 39%.

La cantidad de AgNORs promedios observados en cada uno de los animales con TVT, previo al tratamiento y que respondieron a la vincristina, se muestra en la Tabla XV y presentaron un promedio $3,1 \pm 1,3$ puntos marrones de AgNOR /célula de TVT, con un valor máximo de 5,4 y un valor mínimo de 1,3 y un C.V. de 41,9%.

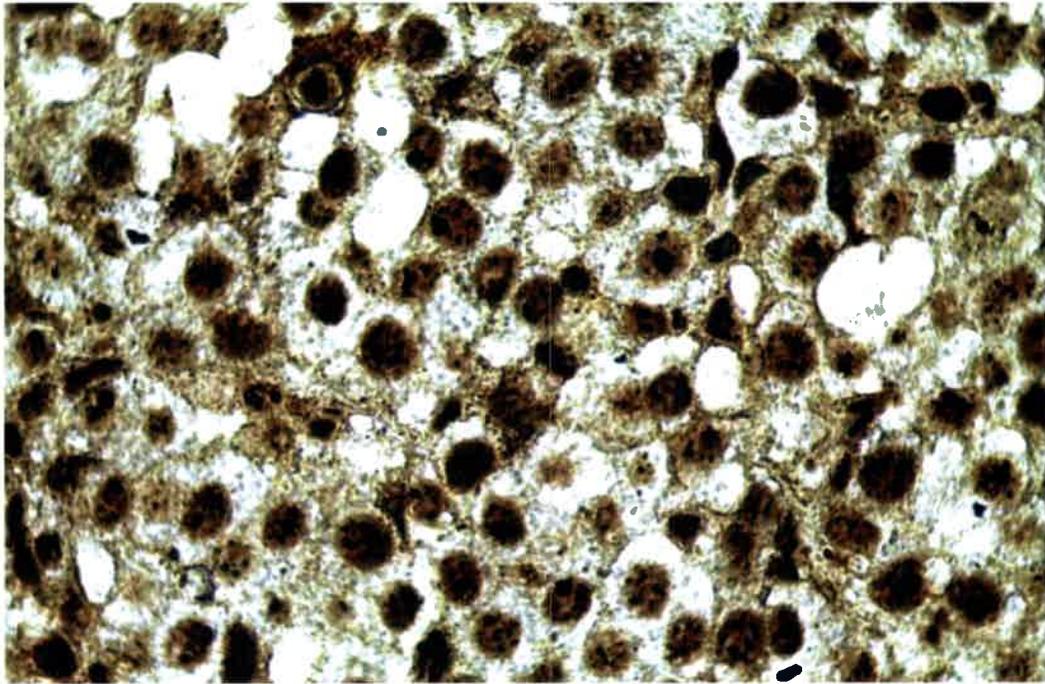


Figura 57. Microfotografía óptica utilizando la tinción de AgNOR. Se observan los puntos marrones en el núcleo y nucléolo celular (promedio: 3,1 puntos/célula de TVT). Tinción de plata (1000x).

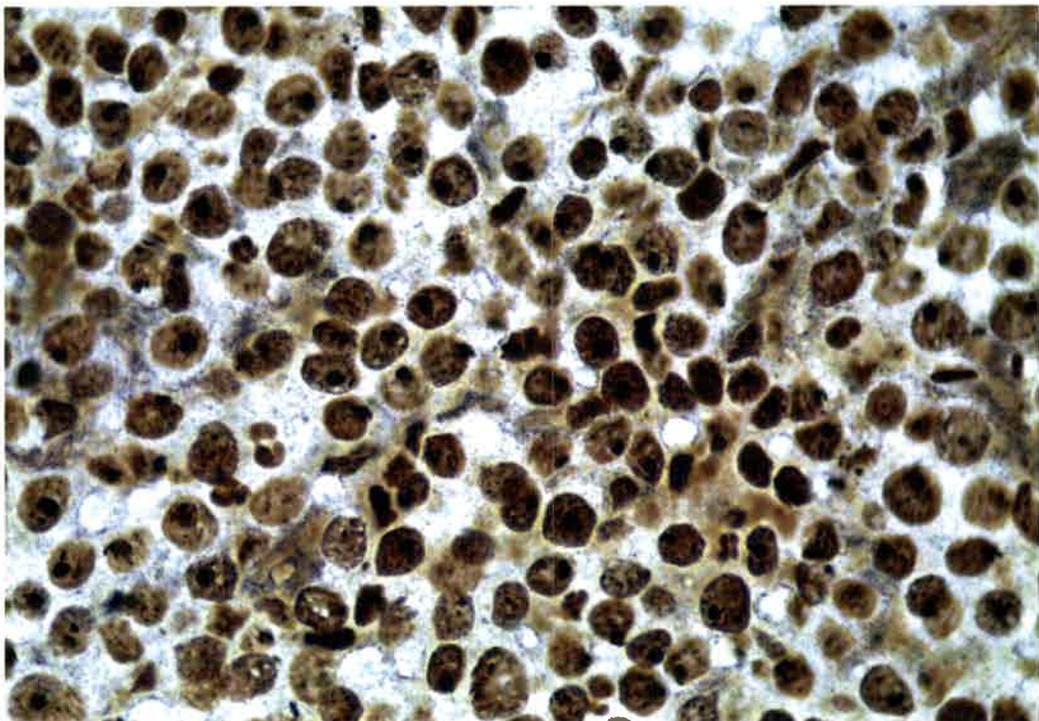


Figura 58. Microfotografía óptica utilizando la tinción de AgNOR, con un promedio de 2,3 puntos marrones/ célula de TVT. Tinción de plata (1000x).

En la Tabla XVI se muestra la cantidad de AgNORs promedios observados en cada animal con TVT, a los 7 días de iniciado el tratamiento con vincristina.

En la Figura 59 se presentan los resultados de AgNOR/núcleo a medida que avanza el tratamiento, con una tendencia a la disminución en los 14 días iniciales de tratamiento, pero luego, se produjo un incremento de los AgNOR/ núcleo, llegando a valores incluso superiores a los obtenidos en la etapa progresiva del tumor previo al inicio del tratamiento, esto en concordancia con la falta de respuesta de este paciente a la terapia con vincristina.

Tabla XIV. Valores promedios de AgNOR/ célula de TVT en los pacientes que tuvieron una mala respuesta al tratamiento con vincristina y sus correspondientes estadísticos.

Caso	Promedio AgNOR/ cél	Valor Máximo	Valor Mínimo	DE	C.V.
20 (pre tratamiento)	4.3	16	0	3.27	0,76
20 (15 días post trat)	3.1	13	0	2.87	0,92
20(21 días post trat)	1.7	12	0	2.24	1,31
20(28 días post trat)	3.1	13	0	3.22	1,04
20(45 días post trat)	7.2	15	0	3.0	0,42
21(pre tratamiento)	2.4	11	0	2.97	1,24
21(7 días post trat)	2.8	11	0	2.86	1,02
22(pre tratamiento)	5.7	15	0	3.99	0,70
22(7 días post trat)	5,8	15	0	4,15	0,71

En los casos 21 y 22 se obtienen valores de AgNOR ligeramente superiores en las muestras obtenidas 7 días posterior al inicio del tratamiento con vincristina (Figura 60), en tanto que, en los animales donde el tumor entró en una fase de regresión con resultados favorables, los AgNORs, disminuyeron en la muestra obtenida posterior al inicio del tratamiento (Figura 61).

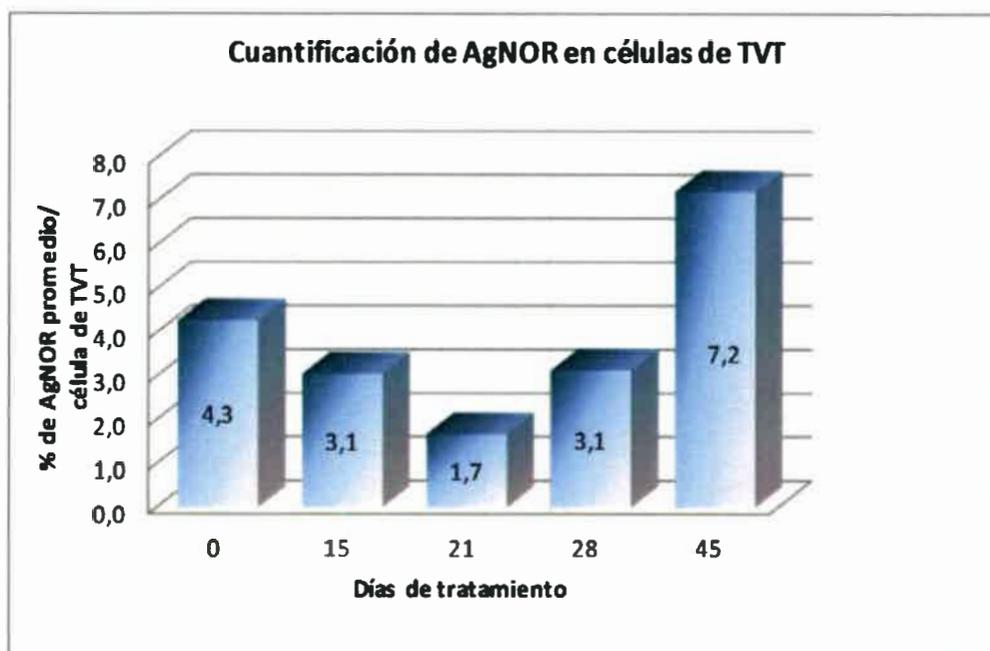


Figura 59. Números promedios de AgNOR por cada núcleo de células de TVT en cortes histológicos del caso 20.

A los datos obtenidos con la tinción de AgNOR, se los analizó con un análisis de varianza (ANOVA) y un test de Tukey *a posteriori* para detectar las diferencias estadísticamente significativas. Los resultados indicaron que la disminución de puntos de AgNOR observadas después de iniciado el tratamiento, cuando el tumor entró en fase regresiva, fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0.0002$) (Figura 62).

En cuanto a la distribución de los puntos de AgNOR en los diferentes casos de TVT, se observaron todos los casos posibles de distribución de las partículas de AgNOR, pero el patrón predominante observado en los pacientes con TVT fue la distribución puntiforme aislada y difusa, con el nucléolo totalmente cubierto; excepto en uno de los casos resistentes al tratamiento, donde los puntos se encontraban distribuidos preferentemente en cadena y en la perifería del núcleo.

Tabla XV. Valores promedios de AgNOR/ célula de TVT en tumores previo al tratamiento con vincristina y sus correspondientes estadísticos.

Caso	Promedio AgNOR/ cél	Valor Máximo	Valor Mínimo	D.E.	C.V.
1	2.5	13	0	2.8	1.12
2	3.3	10	0	2.62	0.79
3	5.3	13	0	3.15	0.59
4	5.4	12	0	2.55	0.47
5	3.6	13	0	3.07	0.85
6	3.6	12	0	3.16	0.88
7	2.3	8	0	2.13	0.93
8	2.8	9	0	2.39	0.85
9	2.3	9	0	2.27	0.97
10	2.2	9	0	2.25	1.02
11	3.0	9	0	2.49	0.83
12	1.4	9	0	2.01	1.43
13	1.3	9	0	1.54	1.18
14	5.1	14	0	3.35	0.66

Se realizaron tinciones de AgNOR en muestras citológicas y en la mayoría de las células se observaron puntos marrones oscuros en el núcleo distribuidos en forma aislada y difusa y un punto argirófilo de gran tamaño, correspondiente al nucléolo de la célula de TVT (Figura 63 y 64). Cuando se inicia el tratamiento, se reduce la cantidad de células en los extendidos dificultando analizar la cantidad de AgNORs promedios.

Tabla XVI. Valores promedios de AgNOR/ célula de TVT y sus correspondientes estadísticos en pacientes que respondieron al tratamiento con vincristina, a los 7 días de iniciado el tratamiento.

Caso	Promedio AgNOR/ cél	Valor Máximo	Valor Mínimo	Desvío Estandar	Coefficiente Variación
1	1,1	7	0	1.28	1,16
2	0.9	7	0	1.31	1.45
3	3.0	11	0	2.44	0.81
4	1.7	6	0	1.34	0.79
5	0.8	8	0	1.26	1.57
6	1.4	8	0	1.57	1.12
7	1.0	5	0	1.38	1.38
8	1.3	7	0	1.39	1.07
9	0.7	5	0	1.26	1.08
10	2.0	10	0	2.58	1.29
11	1.9	7	0	1.96	1.03
12	0.5	5	0	0.97	1.94
13	0.8	8	0	1.53	1.91
14	2.6	11	0	2.57	0.99

Se compararon los promedios de puntos de AgNOR obtenidos mediante tinción en muestras citológicas e histológicas en cinco casos de TVT. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XVII.

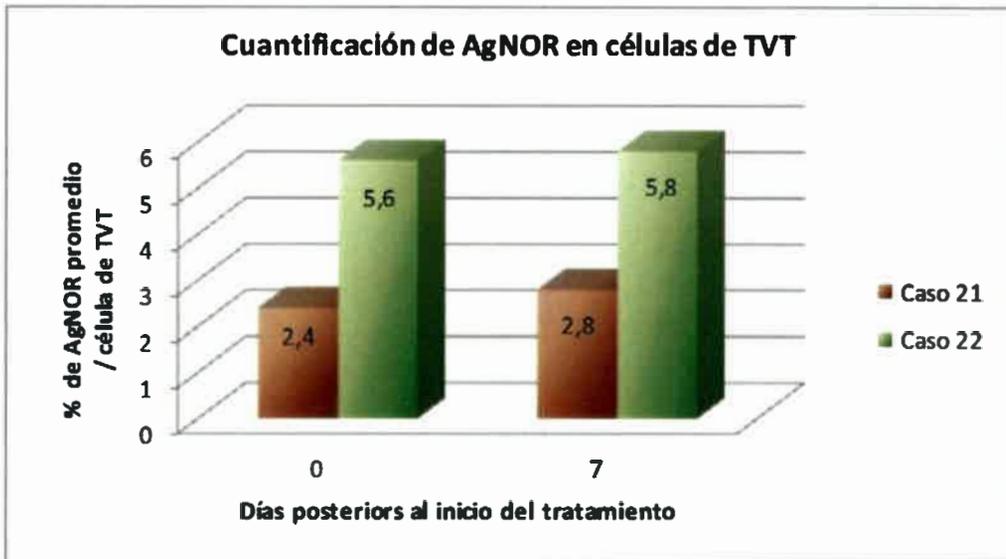


Figura 60. Números promedios de AgNOR por cada núcleo de células de TVT en cortes histológicos de los 2 casos que mostraron resistencia al tratamiento con vincristina.

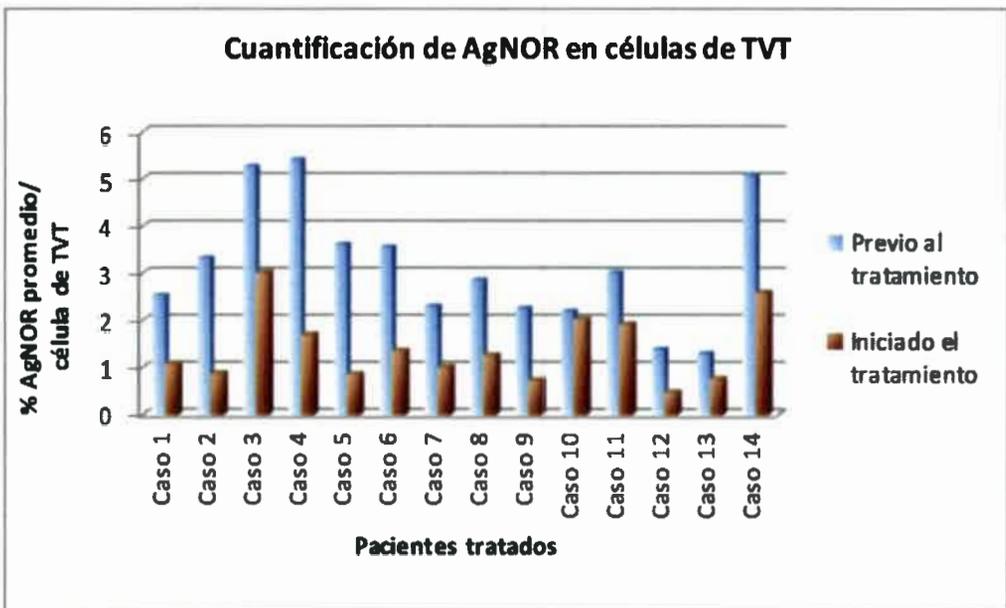


Figura 61. Números promedios de AgNOR en pacientes con buena respuesta al tratamiento con vincristina, en fase progresiva y regresiva inducida por el tratamiento.

Variación de AgNORs en función de los días de tratamiento

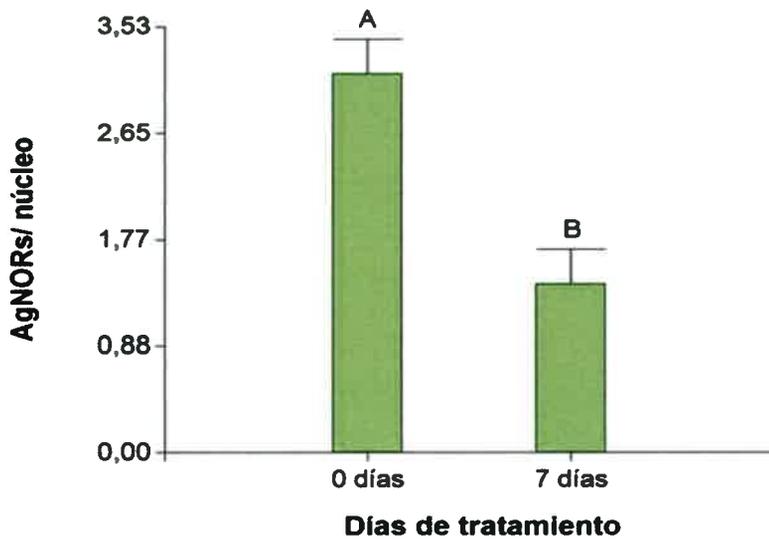


Figura 62. Variación de los puntos AgNORs en tumores en fase progresiva y regresiva. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

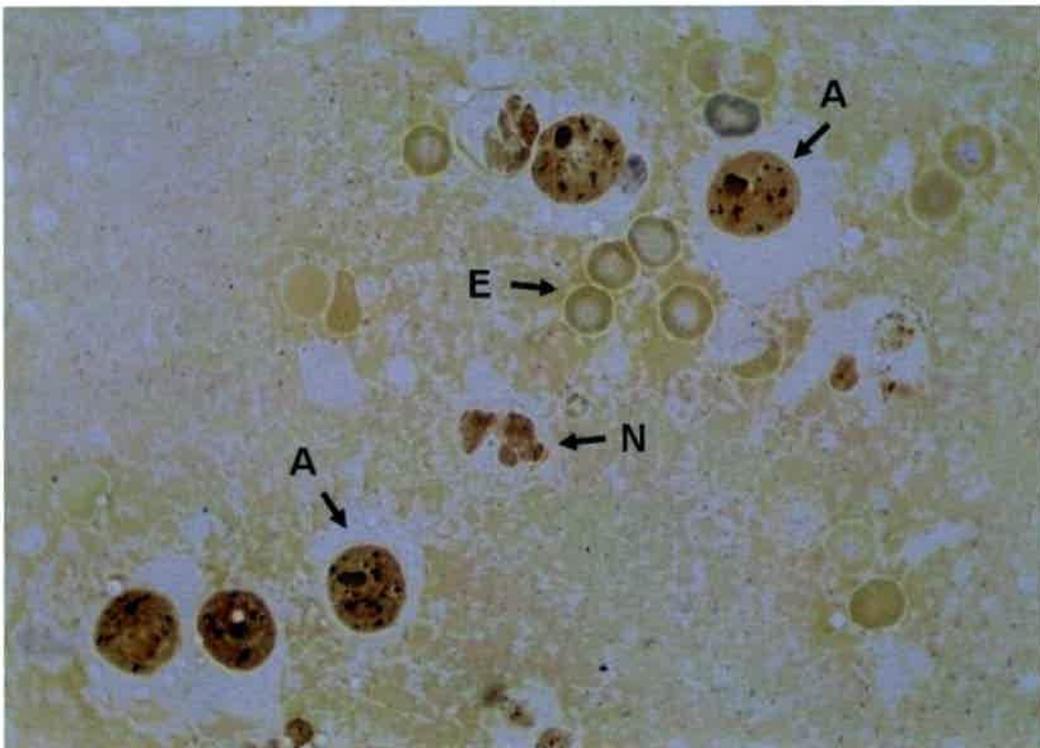


Figura 63. Microfotografía de muestra citológica. (A): se observan puntos marrones en el núcleo y nucléolo de las células de TVT correspondientes a los AgNORs; (E): presencia de eritrocitos y (N): algunos neutrófilos. Extendido hipocelular. Tinción de plata (1000x).

Tabla XVII. Número de puntos AgNOR en muestras citológicas e histológicas.

Nº Caso	Promedio de AgNOR en muestras citológicas	Promedio de AgNOR en muestras histológicas
Caso 6	3.56	2.73
Caso 8	2.85	2.09
Caso 9	2.26	3.32
Caso 10	2.53	2.20
Caso 11	2.45	2.6

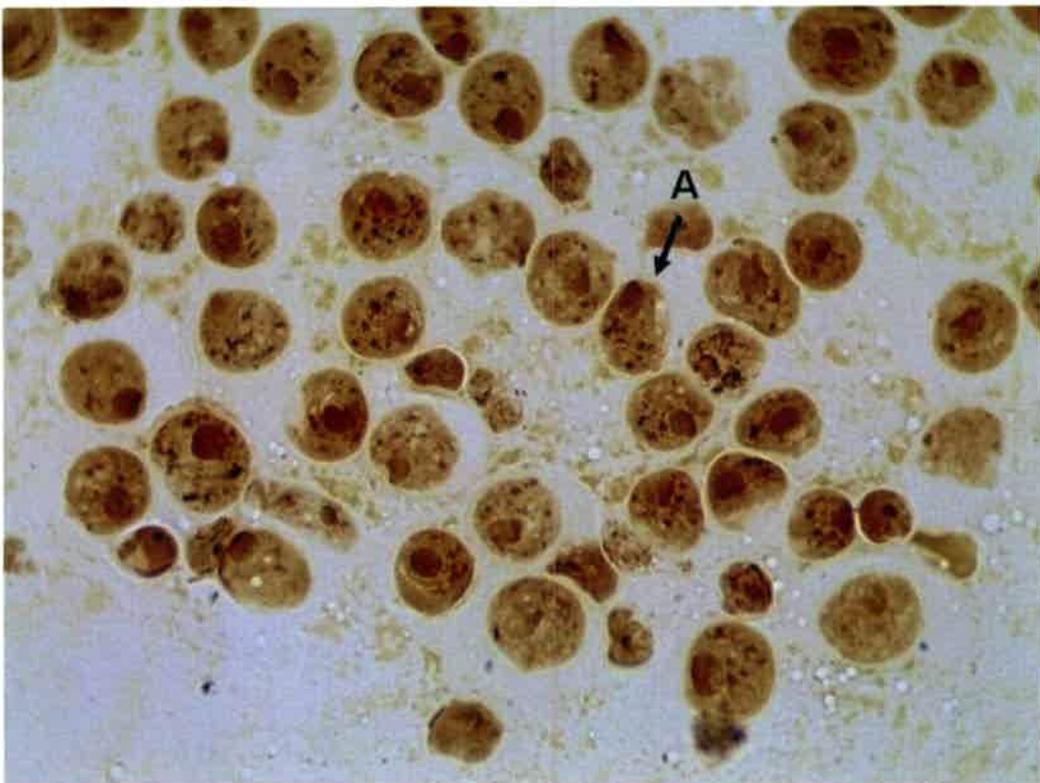


Figura 64. Microfotografía de muestra citológica. (A): se observan puntos marrones en núcleo y nucléolo de las células de TVT, correspondientes a puntos AgNOR. Extendido hipercelular. Tinción de plata (1000x).

Los resultados de inmunohistoquímica mostraron una fuerte intensidad en la marcación para PCNA, expresado con una coloración intensa amarronada en el núcleo de las células tumorales, no observándose diferencias en cuanto a la intensidad de la marcación en las muestras obtenidas previo al tratamiento (Figura 65) y 7 días posteriores a iniciado el mismo (Figura 66).

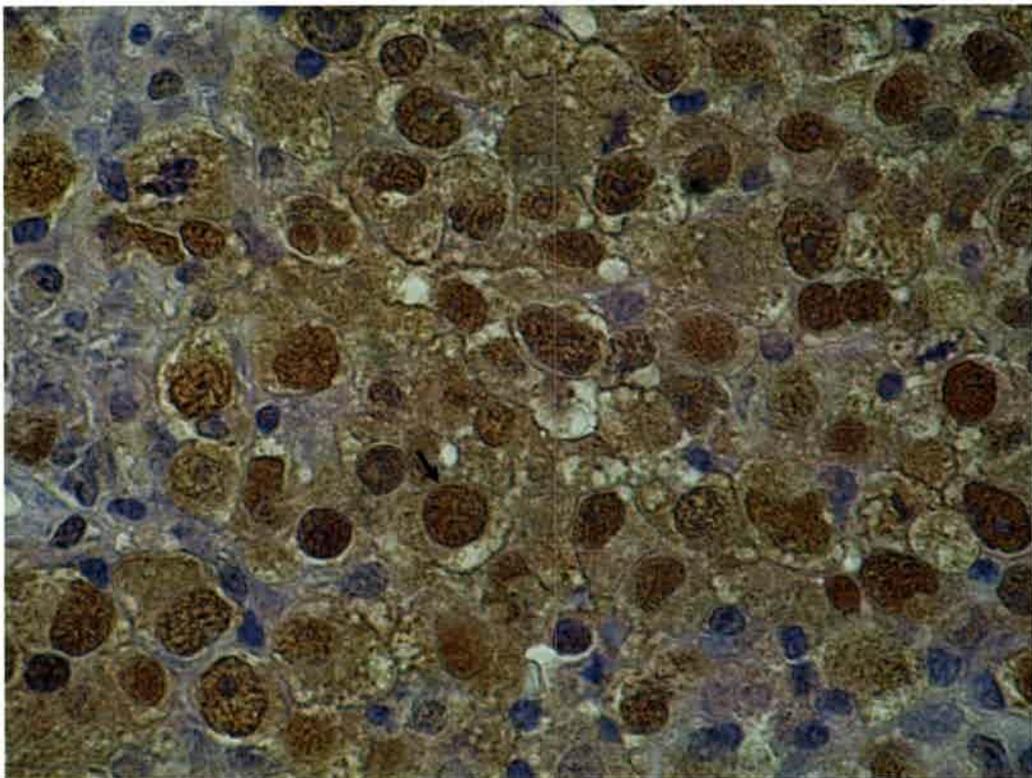


Figura 65. Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para PCNA en muestras histológicas en etapa progresiva del desarrollo tumoral. Día 0 del tratamiento. La flecha indica células con intensa marcación (1000x).

Los porcentajes de marcación para PCNA en los pacientes con TVT que respondieron al tratamiento con vincristina presentaron en la etapa progresiva del tumor (día 0, previo al tratamiento) marcaciones que variaron entre 23,5% y 69,3%, con un promedio de $50,5\% \pm$

15,8% y un C.V. de 31%. En los pacientes con TVT, 7 días después de haber iniciado el tratamiento (etapa regresiva inducida por la vincristina) fué de 0% a 93,4%, con un promedio de $55,2\% \pm 25,4\%$ y un C.V. de 46% (Figura 67).

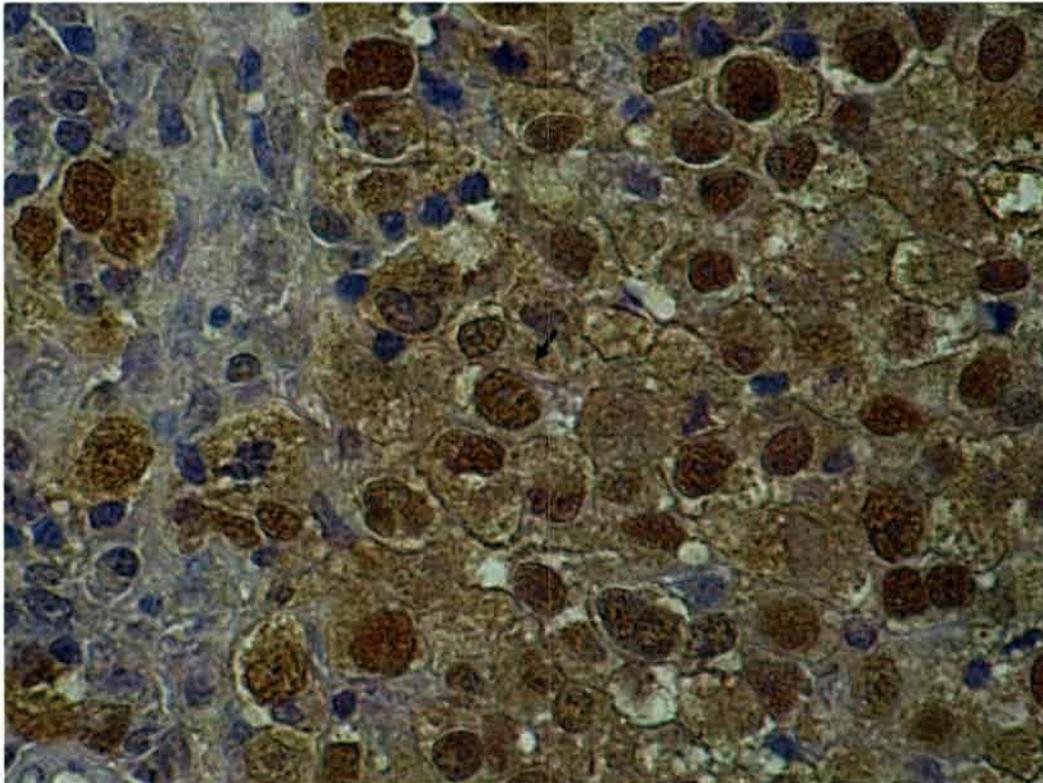


Figura 66. Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para PCNA en muestras histológicas en etapa regresiva del desarrollo tumoral. Día 7 después de iniciado el tratamiento. La flecha indica células que presentaron intensa marcación (1000x).

Luego de 15 días de haber iniciado el tratamiento, en 3 pacientes se obtuvo un porcentaje de marcación para PCNA con una variación entre 27% de mínimo y 72,5% de máximo, con un promedio de $54,8\% \pm 24,4\%$ y un C.V. de 44%.

En el caso 20, que mostró resistencia al tratamiento con vincristina, los resultados de la inmunomarcación para PCNA se muestran en la Figura 68, y en el caso 21, correspondiente al paciente que murió como consecuencia del avance del TVT facial, los porcentajes de marcación para PCNA se presentan en la Figura 69.

Se analizaron los datos de los porcentajes de PCNA y a través del test a *posteriori* LSD-Fisher se determinó que no existieron diferencias significativas ($p \geq 0.1818$) (Figura 70).

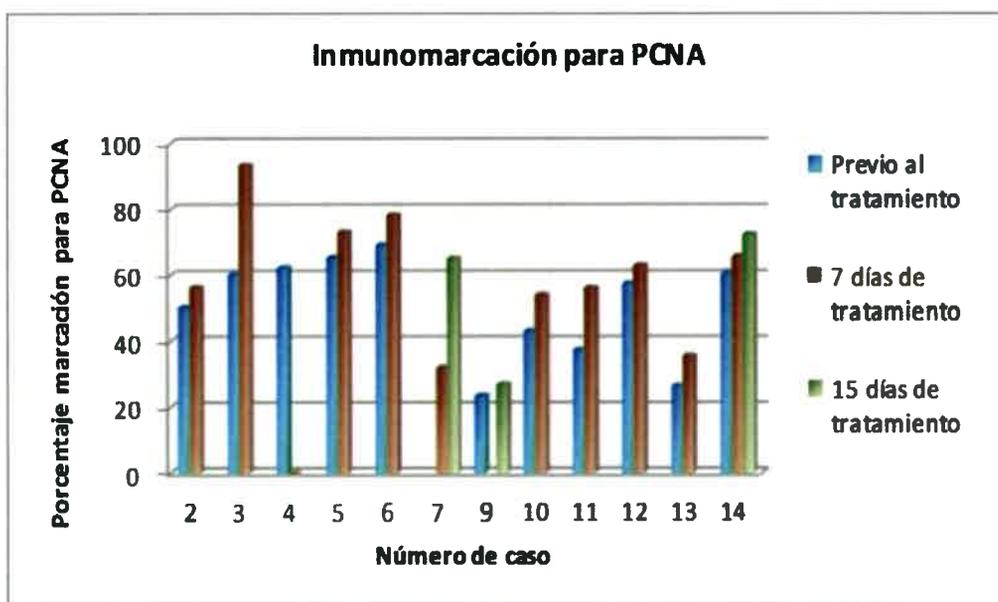


Figura 67. Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en 12 casos de TVT que respondieron al tratamiento con sulfato de vincristina.

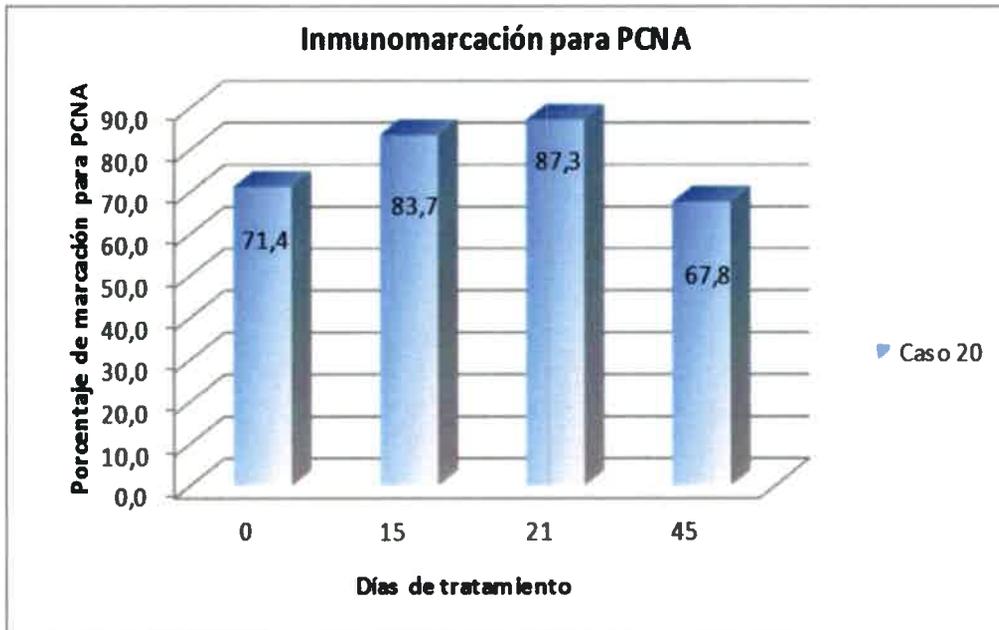


Figura 68. Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en el caso 20, resistente al tratamiento con Vincristina.

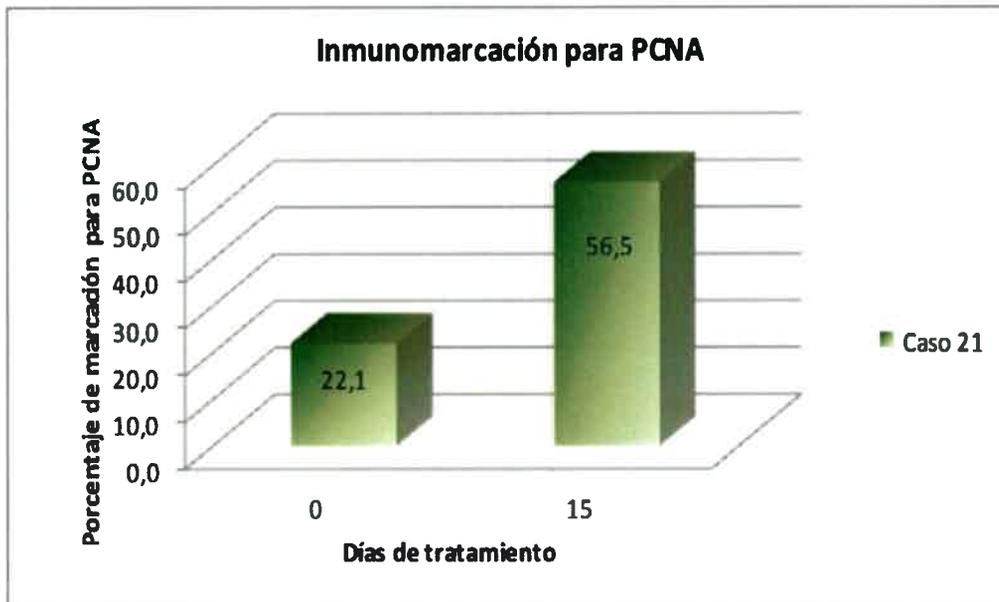


Figura 69. Porcentaje de inmunomarcación para PCNA en el caso 21, resistente al tratamiento con vincristina.

Variación de porcentaje de PCNA en función de los días de tratamiento

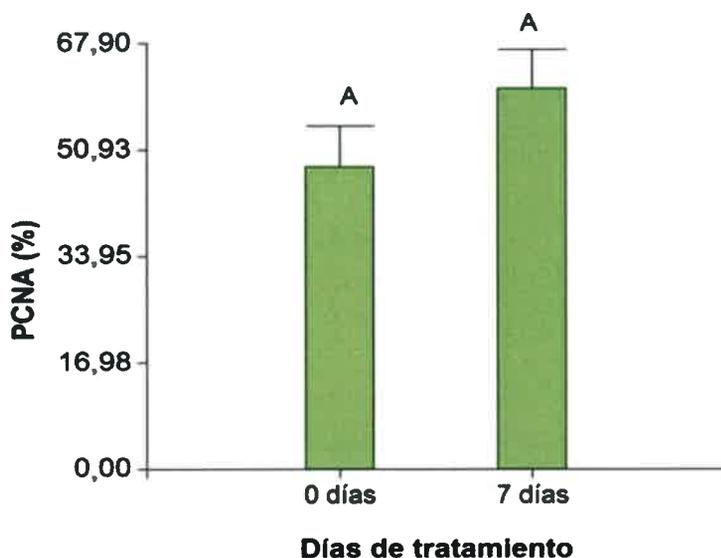


Figura 70. Variación de los porcentajes de marcación para PCNA. Medias con letras iguales, no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

En los tumores de pacientes en que fue realizada la técnica de Ki-67, la inmunomarcación fue positiva en 9 de ellos, en tanto que en 3 casos, la marcación fue negativa (Tabla XVIII). La marcación de Ki-67, se vió confinada al núcleo de la célula y varió entre los casos, aunque no se observó diferencia de intensidad en relación al estadio del tumor (Figuras 71 y 72). Los porcentajes de inmunomarcación para Ki-67 en los caninos previo al tratamiento fueron de 0,2% a 2,7%, con un promedio de 0,81%, $\pm 0,90\%$ y un C.V. de 110% y posterior al tratamiento los porcentajes fueron de 0,2 a 3,6% con un promedio de 0,87% $\pm 1,2\%$ y un C.V. de 138%.

En la Figura 73 se representan los valores de Ki-67 en 6 animales donde se realizó la inmunomarcación previo al tratamiento y luego de 7 días de iniciado el mismo. A pesar de encontrarse un promedio de Ki-67 inferior en los tumores en fase de crecimiento, en el 66,7% de los animales, el número de células marcadas en relación a los de fase regresiva inducida por el tratamiento fue menor.

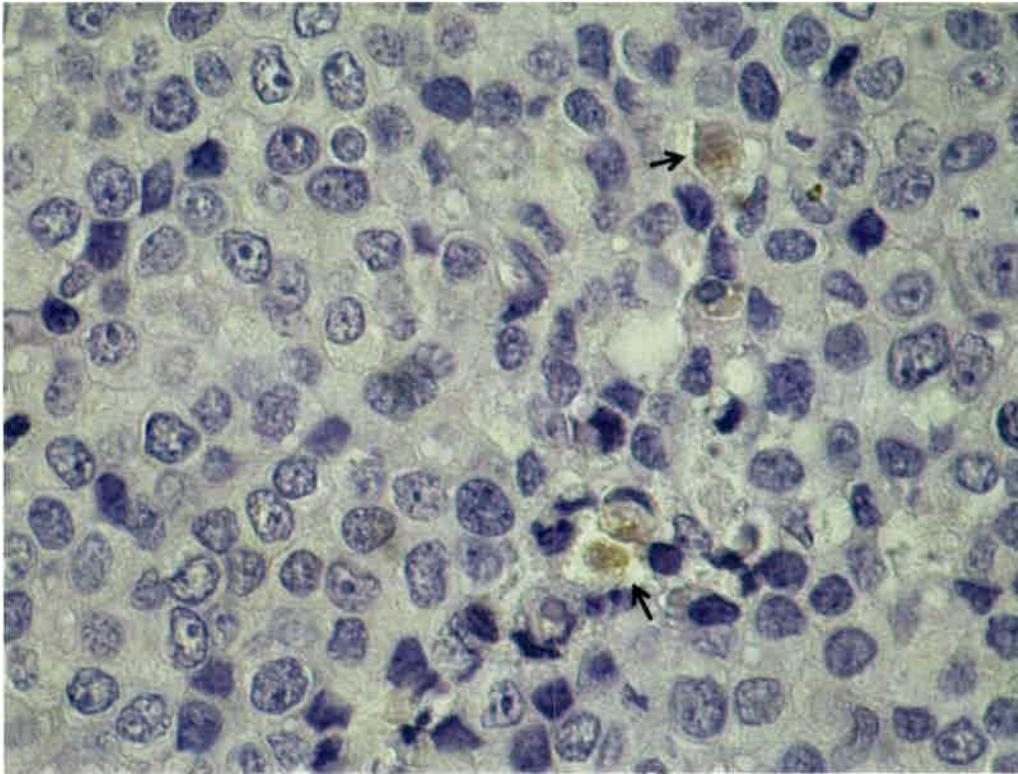


Figura 71. Inmunomarcación con anticuerpos monoclonales para Ki-67 en muestras histológicas en etapa progresiva del desarrollo tumoral. Las flechas indican las células inmunomarcadas a nivel nuclear (1000 x).

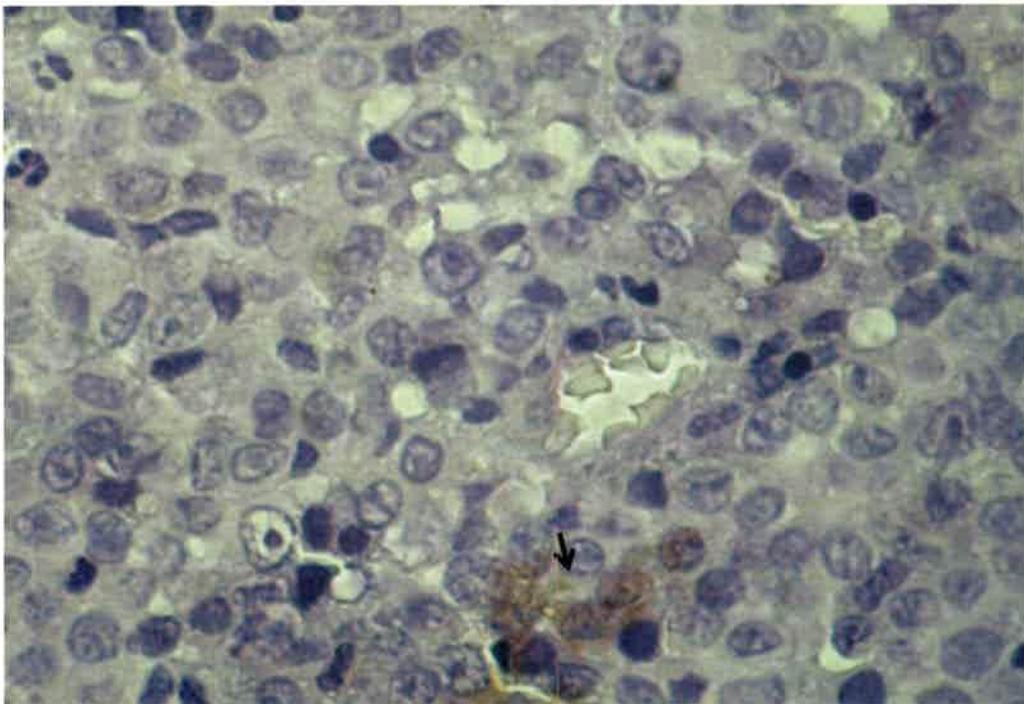


Figura 72. Inmunomarcación para Ki-67 en muestra histológica en etapa regresiva del tumor a los 7 días de iniciado el tratamiento. La flecha indica las células inmunomarcadas. (1000 x).

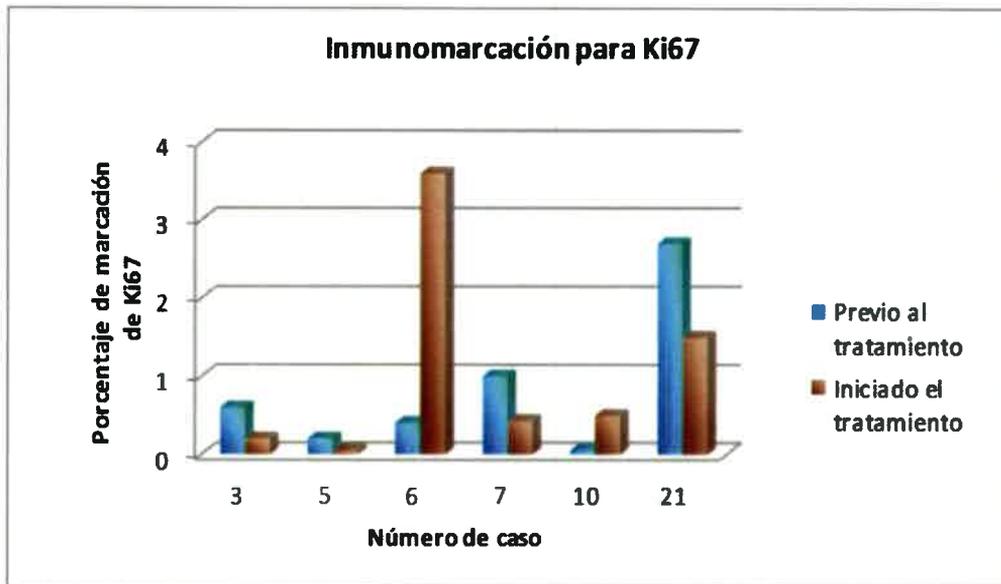


Figura 73. Porcentaje de inmunomarcación para Ki-67 en 6 casos de TVT previo al tratamiento y una semana posterior al inicio del mismo.

La técnica de MOAR pudo realizarse con las muestras que fueron procesadas para microscopia electrónica convencional. Con esta técnica, se observaron cortes histológicos de TVT de los animales previo al tratamiento con una población monomórfica de células redondas, dispuestas en nidos o cordones, con una buena diferenciación entre célula y célula representada por membranas citoplasmáticas delgadas; los núcleos eran redondos, con engrosamiento de la membrana nuclear y nucléolo gigante que caracteriza a las células de TVT. El citoplasma fue abundante y claro (Figura 74).

A medida que se aplicaban las dosis de vincristina, se observó una reducción en la cantidad de células de TVT por campo con un incremento de tejido conectivo, fibroblastos, linfocitos y células que presentaban procesos de picnosis y cariorexis (Figura 75). Esto es coincidente con lo observado con la tinción de H/E.

Tabla XVIII. Porcentaje de inmunomarcación para Ki-67 en muestras histológicas de caninos con TVT, obtenidas previo y posterior al tratamiento con Vincristina.

Caso	Porcentaje de positividad para Ki-67 en tumores en fase progresiva	Porcentaje de positividad para Ki-67 en tumores en fase regresiva
2	0	0
3	0,6	0,2
4	0	0
5	0,2	0
6	0,4	3,6
7	1,0	0,43
8		0,57
9		0,14
10	0	0,5
15	0,8	
20	0	0
21	2,7	1,5

Se procesaron las muestras para microscopía electrónica y se capturaron imágenes microfotográficas. En una visión general a 5000x, se observaron células tumorales grandes con membranas citoplasmáticas que emiten escasas proyecciones de unión interdigital con las células adyacentes, las cuales se hacen más evidentes en zonas donde las células se encuentran menos empaquetadas.

El citoplasma se observó abundante con gran cantidad de organelas y vacuolas pequeñas y grandes. Las mitocondrias eran pleomórficas, algunas pequeñas y otras de mayor tamaño, redondas o ligeramente ovales, se observaron en gran cantidad, con escasas crestas mitocondriales y escasa matriz granular. Los aparatos de Golgi fueron pequeños y cercanos a la membrana nuclear, con una proliferación en algunos casos de abundante retículo

endoplásmico liso y rugoso y ribosomas libres. Algunas células tumorales presentaban abundantes inclusiones de vacuolas lipídicas en el citoplasma (Figura 76).

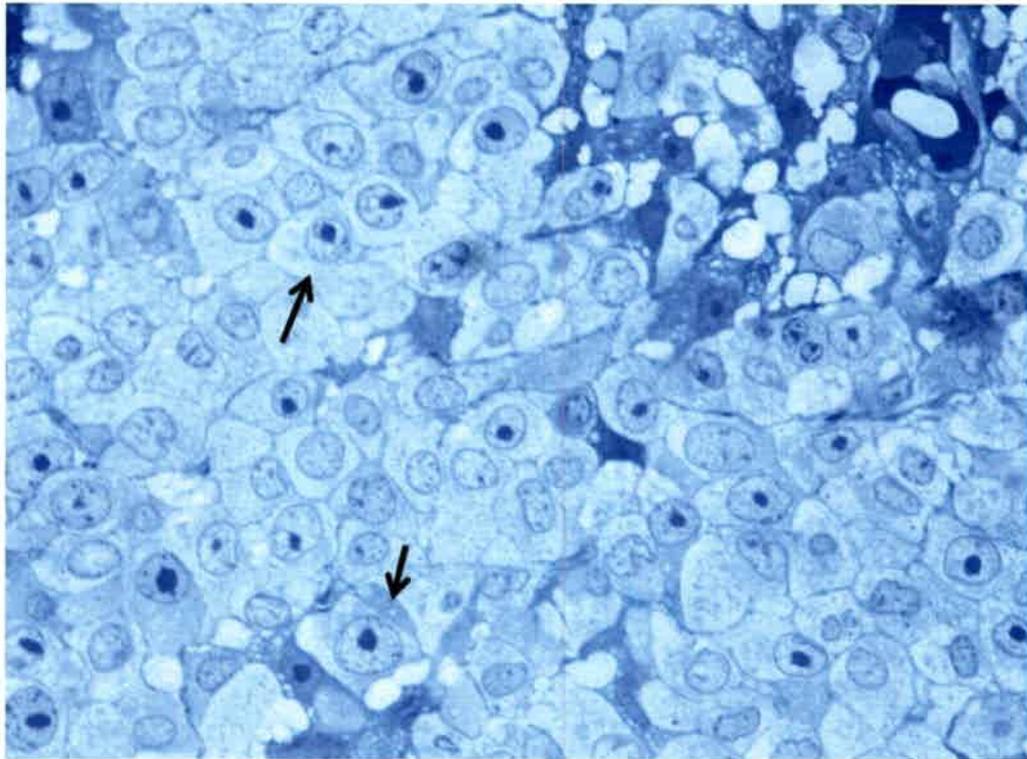


Figura 74. Microfotografía óptica de corte semifino correspondiente a una biopsia en etapa de crecimiento progresivo, previo al tratamiento. Las flechas indican células de TVT que presentan nucléolo único y gigante. (MOAR). (1000x).

Los núcleos se observaron vesiculares, de forma redonda o ligeramente oval, de tamaño grande, la cromatina era en su mayoría homogénea pero con regiones de acúmulos electrodenso distribuidos próximos a la membrana nuclear, la cual presentaba invaginaciones (festoneo en la membrana nuclear externa) con una distensión de la membrana y una separación visible entre la membrana nuclear interna y la externa (Figura 77). Alrededor de la membrana nuclear y adyacente a los ribosomas, se observa en algunas células un material electrodenso.

En los núcleos se observaba un nucléolo grande, prominente, central o desplazado a la periferia, de forma redonda u oval, sin una membrana que lo contenga, caracterizado por tener una estructura homogénea, amorfa, con inclusiones nucleolares en el mismo (Figura 78).

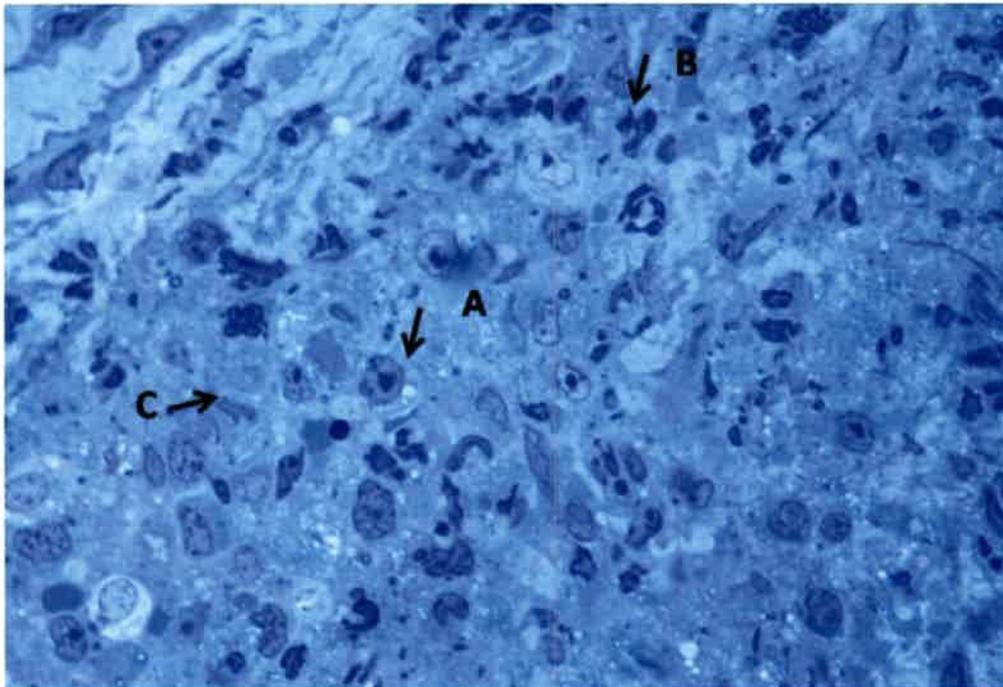


Figura 75. Microfotografía óptica de corte semifino de una biopsia durante el tratamiento con vincristina, Se observa incremento de tejido conectivo (C), picnosis, cariorexis (B) y menor cantidad de células de TVT (A) (MOAR). (1000x).

En la etapa de progresión tumoral y aún después de iniciado el tratamiento, se observaron células en mitosis en grado variable. No se observaron partículas virales.

A medida que avanzaba el tratamiento con vincristina, se incrementaron las células en distintos estadios de degeneración celular. La degeneración celular se caracterizó por cambios inicialmente citoplasmáticos, con reducción del volumen, con incremento de la relación

núcleo citoplasma, donde se observó una disminución de vacuolas y organelas. Aparentemente no se observaron cambios en la cantidad de mitocondrias, presentando menor cantidad de crestas mitocondriales. A medida que progresaba el proceso degenerativo, los cambios se trasladaban también a nivel nuclear. El núcleo de las células tumorales, se presentaba con mayor condensación cromatínica. Las membranas nucleares se encontraban más unidas entre sí, mostrándose a manera de un fuerte cordón nuclear (Figura 79 y 80).

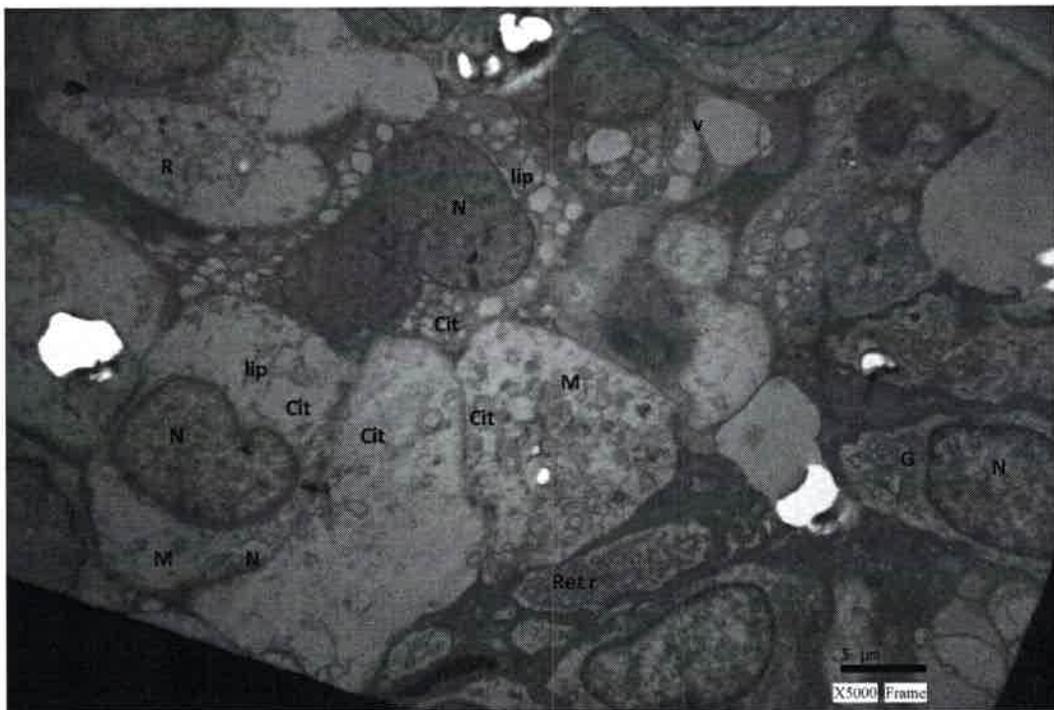


Figura 76. Microfotografía electrónica de células de TVT previo al tratamiento. Se observan células grandes con núcleos grandes (N). En este corte no se observan los nucléolos. Los citoplasmas abundantes (Cit) muestran numerosas organelas: mitocondrias (M), aparato de Golgi (G), retículo endoplásmico rugoso (Ret r), vesículas (v), lípidos (lip). (5000x).



Figura 77. Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT, previo al tratamiento. Se observa un núcleo grande (N); nucléolo prominente (n), algunas mitocondrias (M), abundantes inclusiones lipídicas (lip), ribosomas (R), retículo endoplásmico (Ret). (6000x).

Con el avance del tratamiento, se observó una disminución en la densidad de células neoplásicas morfológicamente íntegras con un incremento de células degeneradas, con tendencia a la transformación en células fusiformes. Presentaron mayor número de linfocitos, que en muchos casos se encontraban en contacto directo con las células de TVT degeneradas; con incremento además de células plasmáticas y neutrófilos (Figura 81), los cuales son más abundantes cerca de las áreas necróticas. Se observa además un incremento marcado en la cantidad de células fibroblásticas y fibrocitos, morfológicamente más elongadas, reemplazando la masa tumoral por tejido conectivo con mayor depósito de colágeno, que va dejando aisladas unas de otras a las células tumorales. En los tumores de rápida regresión solo unas pocas células redondas mantienen su morfología. Estas células degeneradas presentan una retracción en su tamaño, con incremento de la relación núcleo citoplasma, citoplasmas más espumosos, con vacuolas algunas de ellas muy grandes con aspecto de fagolisosomas.

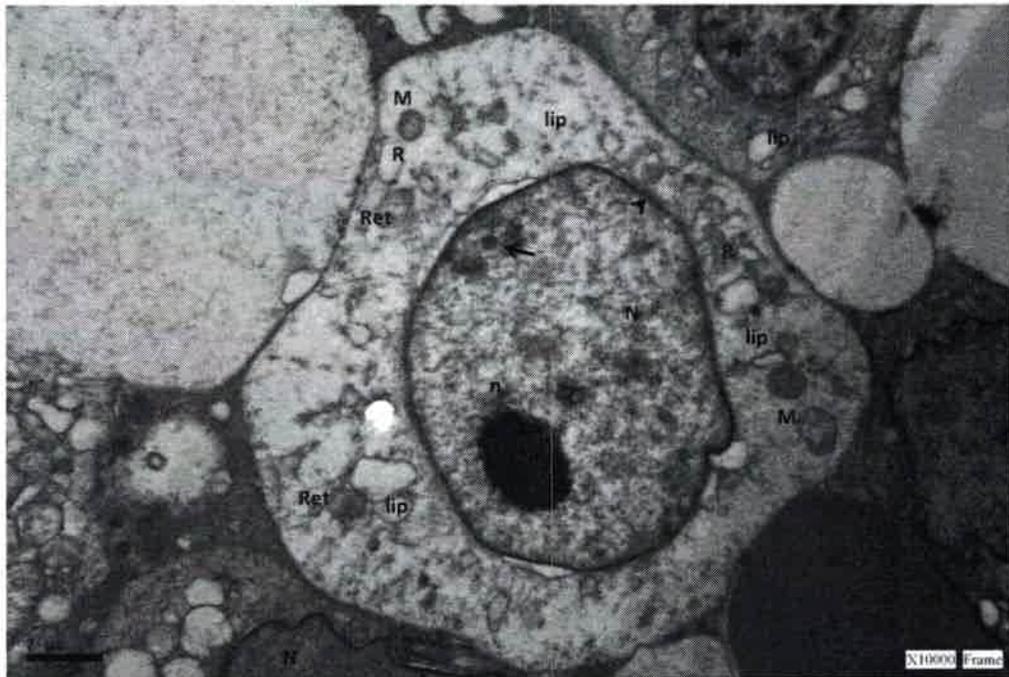


Figura 78. Microfotografía electrónica de células de TVT, previo al tratamiento. Se observa un núcleo grande (N); nucléolo único y prominente (n), condensaciones cromatínicas (flecha), separación entre membrana nuclear interna y externa (punta de flecha), algunas mitocondrias (M), abundantes inclusiones lipídicas (lip), ribosomas (R), retículo endoplásmico (Ret). (10000x).

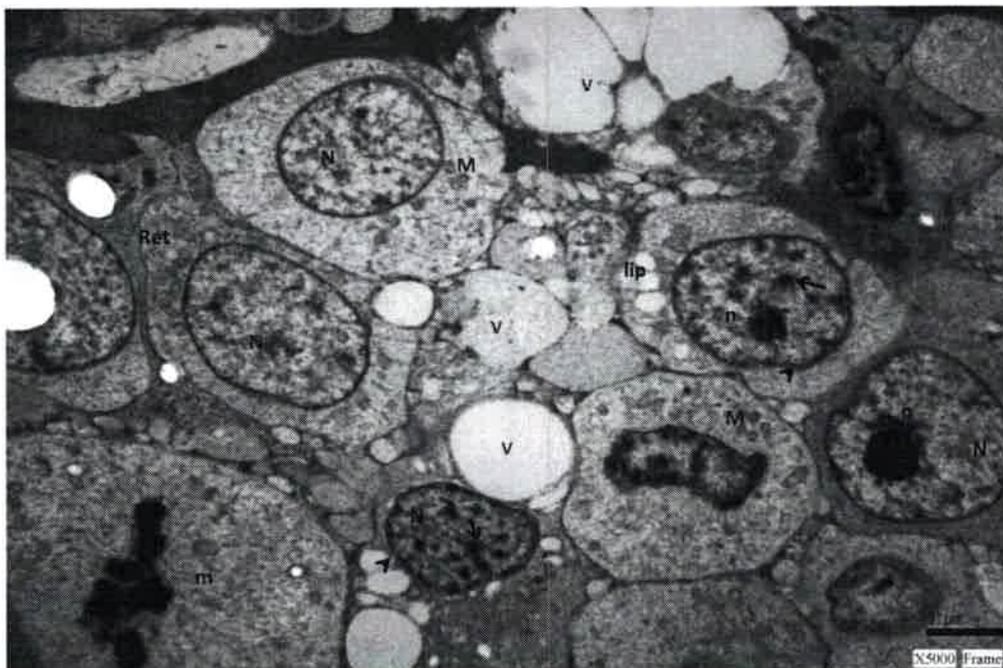


Figura 79. Microfotografía electrónica de células de TVT, en fase regresiva durante el tratamiento. Se observa una célula en mitosis (m), vacuolas (V), engrosamiento de la membrana nuclear (punta de flecha) y mayor condensación de la cromatina (flecha). (5000x)

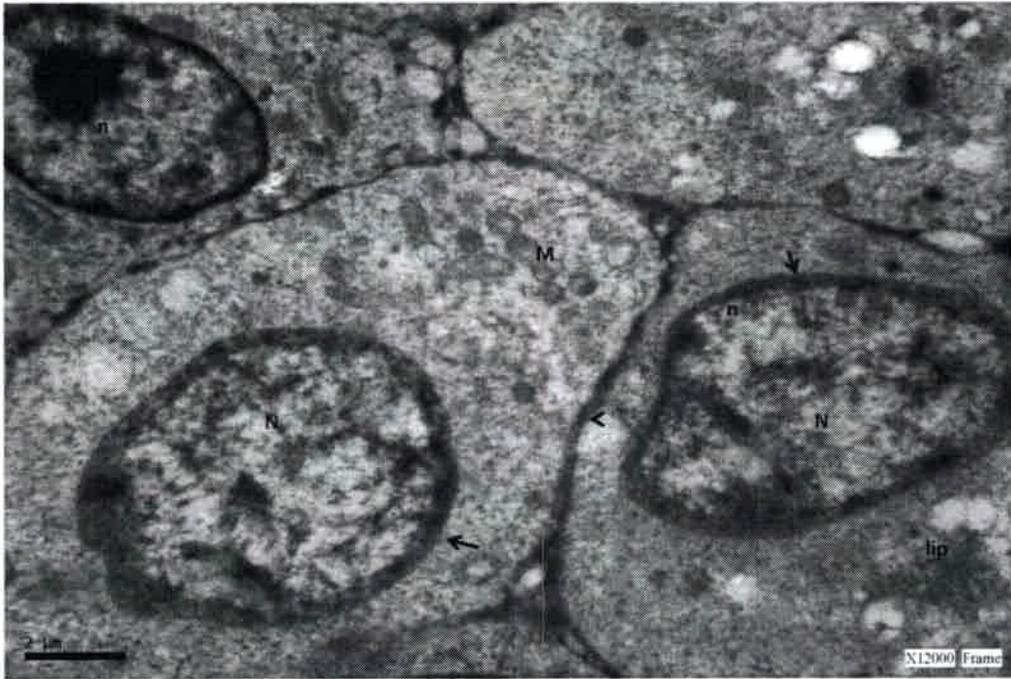


Figura 80. Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT en fase regresiva. Se observa menor cantidad de mitocondrias (M) y lípidos (lip), y engrosamiento de la membrana nuclear (flecha). (12000x)

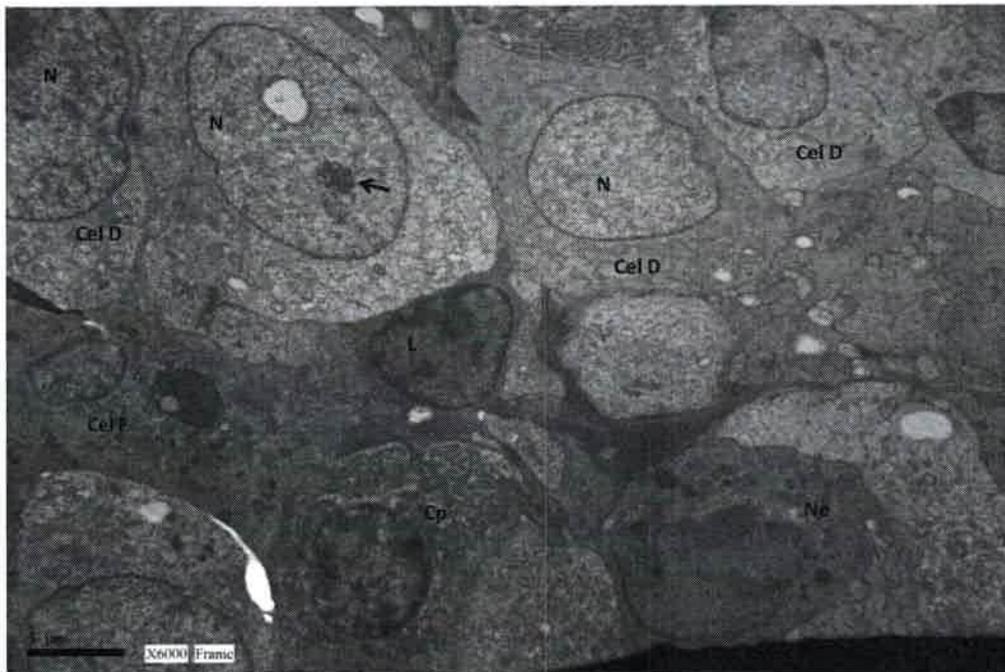


Figura 81. Microfotografía electrónica de células tumorales de TVT, en fase regresiva, durante el tratamiento con vincristina. Remanente nucleolar (flecha), incremento de células degeneradas (Cel D), células fusiformes (Cel F), células plasmáticas (Cp), linfocitos (L) y neutrófilos (Ne). (6000x).

DISCUSIÓN

6-DISCUSIÓN

Del total de caninos ingresados al servicio de Análisis Clínico del Departamento de Clínica Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto, se obtuvo que en el 2,03% de los casos se diagnosticó TVT, resultando este porcentaje menor a la prevalencia presentada por Strakova y Murchison, (2014) en base a la distribución por país presentada en el mapa de la Figura 1.

Los resultados demuestran que en la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba de la República Argentina, la presentación de TVT en relación al sexo, se caracteriza por un predominio en hembras, con un 57,8% en relación a los machos (42,2%), datos que son coincidentes con numerosos autores (Flores *et al.*, 1993; Gurel *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2003 y Alvarez Espinoza, 2010), si bien, Brown *et al.*, (1980); Calvert *et al.*, (1982); Mac Ewen, (1992); Amaral *et al.*, (2004); Murchison (2008) y Strakova *et al.*, (2014), consideran que en estudios realizados de TVT de ocurrencia natural no hay predisposición de raza ni sexo. Si bien ambos sexos sufren lesiones durante el coito, lo que predispone a la transmisión del TVT (Moulton, 1978), coincidimos con Mendoza, (2006) y Ganguly *et al.*, (2013) en que no existe una mayor susceptibilidad ligada al sexo, sino que esta mayor incidencia en hembras podría ser debido, según ciertas protectoras de animales a la existencia de gran número de perras abandonadas respecto a machos en nuestro medio, considerando además que un macho portador puede servir a varias perras.

El intervalo de edad en que se presentaron los casos de TVT (entre 7 meses y 16 años), fue mayor a los reportados por Gurel *et al.*, (2002) que informa un intervalo de 2 a 10 años, Caponi *et al.*, (1999) de 2 a 12 años; Ortega *et al.*, (2003) de 3 a 5 años y Sousa *et al.*, (2000) de 1 a 7 años, aunque se ha publicado un caso en un cachorro de 4,5 meses (Uma Rani y Pazhanivel, 2015). Sin embargo, coincidiendo con la mayoría de los autores, la mayor presentación se da entre los 2 y 5 años y si los dividimos en categoría como púberes, adultos y gerontes, la mayor cantidad de casos de TVT se presentan en animales adultos jóvenes, considerando que éstos son sexualmente activos y como consecuencia de la conducta reproductiva de los caninos se incrementa la probabilidad del contacto con células de TVT de

animales portadores y la implantación de las mismas en mucosas laceradas (Brown *et al.*, 1980; Calvert *et al.*, 1982; Mac Ewen, 1992; Amaral *et al.*, 2004; Murchison, 2008; Strakova *et al.*, 2014).

Respecto a la raza, la presentación fue mayor en animales cruce o mestizos con un porcentaje de 66,7%, siendo superior al publicado por Flores *et al.*, (1993) e inferior al 76,8% informado por Bassani Silva, (2008). Esto probablemente se relacione a la mayor probabilidad de abandono que tienen los caninos mestizos con respecto a los animales de raza pura, transformándolos en un grupo de alto riesgo considerando el hábitat callejero.

No hay antecedentes que relacionen la aparición del TVT a factores hereditarios, sin embargo y coincidiendo con varios autores el 96,7%, de los animales con esta neoplasia, fueron de talla mediana y grande; probablemente por la conducta que presentan los dueños de permitir que los animales de mayor talla salgan solos a la calle (Gurel *et al.*, 2002, Nak *et al.*, 2005 y Pineda Cruz *et al.*, 2010), considerando además que cualquier raza que se imponga como gusto del mercado hace que se reproduzca mas y esto aumenta el riesgo de contraer TVT en estos animales. Coincidimos con Ganguly *et al.*, (2013) en que el TVT es de muy rara presentación en animales de compañía que se encuentren bien supervisados por sus dueños.

El 61,9% de los perros con TVT vivían en la calle o fueron recogidos de la calle por sus actuales dueños. Esto explica la mayor prevalencia del TVT observada en países subdesarrollados, donde las políticas de control de perros callejeros pueden ser insuficientes. En nuestra ciudad hay un escaso control de perros callejeros ya que no existen políticas públicas tendientes a disminuir el número de animales en estado de abandono. Tampoco se educa a la población con prácticas de concientización como: pasear a las mascotas con correas (para limitar el contacto estrecho con caninos de orígenes desconocidos), o mantener a los animales en un ámbito domiciliario sin salida libre a las calles.

La dinámica de la población canina en las distintas regiones, impactaría el resultado del muestreo y de la frecuencia detectada de la enfermedad.

El 73,3% de las neoplasias observadas fueron de localización genital, coincidiendo con Nelson y Couto, (2010). Esto estaría favorecido por el tipo de contacto sexual que tienen los perros, el cual es muy prolongado (hasta de 30 minutos o más), con el característico “abotonamiento” lo que hace que permanezcan en un contacto físico muy estrecho con altas probabilidades de sufrir abrasiones de las mucosas, lo cual contribuye al éxito del trasplante del tumor.

Respecto a lo que plantean Aprea *et al.*, (1994) quienes consideran que la presentación en útero es infrecuente, en este estudio retrospectivo, dos de los casos de localización genital, presentaban tumoraciones a nivel vaginal y uterino, representando el 2% de la población en estudio. Esto demostraría la necesidad de hacer ecografías abdominales y ginecológicas en todas las hembras con presentación de TVT genital.

De la presentación extragenital, se diagnosticaron tumores en mucosa nasal, bucal, paladar, maxilar, ganglios, ano, recto, región peri-anal, piel y cavidad abdominal. La más frecuente fue en mucosa nasal y en machos; estos resultados son concordantes con los hallados por Mendoza Vergaray, (2006), siendo esta diferencia en sexos, significativa estadísticamente. No se puede afirmar si existe susceptibilidad ligada al sexo ya que no se ha establecido ninguna afirmación al respecto, aunque sí se relaciona a la conducta de lamido y olfateo que hacen los machos durante el cortejo.

El comportamiento epidemiológico del tumor es en gran parte similar a lo observado en la bibliografía, por lo que podríamos inferir que estamos frente a un mismo clon celular con cariotipos similares a los hallados en los distintos continentes (Flores *et al.*, 2000; Gurel *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2004; Mendoza Vergaray, 2006; Murchison, 2008; Alvarez Espinoza, 2010; Nelson y Couto, 2010; Pineda Cruz *et al.*, 2010; Strakova *et al.*, 2014).

De los casos estudiados un 35% de los perros presenta anemias al momento de realizarse el diagnóstico de TVT, estos valores son superiores a los informados por Flores *et al.*, (2000) quienes publicaron que un 15% de los animales presenta anemias. En la mayoría de los casos (66,6% de los animales) la anemia se comportó como microcítica normocrómica,

característica de las anemias por pérdida crónica de sangre que se transforman en anemias ferroprivas, que conllevan a una eritropoyesis inefectiva.

En la medida que el tratamiento avanza, la cantidad de animales que presenta anemia, va disminuyendo, a pesar de la quimioterapia datos que no concuerdan con lo expuesto por Arce Visales, (2012) quien expresa que el 92,6% de los pacientes tiene disminución de eritrocitos en la primera semana de tratamiento. Los resultados en este estudio demuestran que, sin que exista en los pacientes un tratamiento estimulador de la hematopoyesis, durante la quimioprofilaxis con vincristina se produce una disminución cuantitativa de los valores del eritrograma, en un 28% de los animales, recuperándose a los 14 días, en tanto que un porcentaje similar de animales que presentaba anemia, se recuperó en la primera semana, por lo que, la recuperación observada permite inferir que el cese de la hemorragia es la causa de la recuperación hematológica y que el efecto mielosupresor de la vincristina no se refleja en la respuesta eritroide con la misma magnitud respecto a otras líneas celulares.

A diferencia de lo que expresan otros autores (Cohen, 1985; Withrow y Mac Ewen, 1989; Purohit, 2009), en este estudio no se presentaron casos de animales que cursen con policitemia por lo que esta variable no podría ser considerada de valor diagnóstico.

Los resultados del leucograma son semejantes a los observados por Flores *et al.*, (2000), donde el cuadro leucocitario predominante en los animales que presentaban leucocitosis fue de neutrofilia, linfopenia, monocitosis y eosinofilia. El 40% de los caninos presentó un leucograma caracterizado por leucocitosis, generalmente moderadas, con desvío a la izquierda regenerativo leve (10%), con neutrofilia (35%), linfopenia (20%), monocitosis (35%), eosinofilia (55%), eosinopenia (5%), lo cual indica que al momento de la consulta los animales estaban respondiendo a diferentes estímulos leucopoyéticos, probablemente, debido a que la mayoría de los perros presentaban un hábitat callejero, lo cual los expone a condiciones sanitarias adversas. La eosinofilia se manifiesta en las etapas previas al tratamiento, resultados concordantes con Flores *et al.*, (2000) y Arce Visales, (2012) y se mantiene sin diferencias significativas durante los 7, 21 y 28 días siguientes al inicio de la quimioterapia, aunque, la cantidad de animales que cursan con eosinofilia tiene una tendencia

a disminuir a medida que avanza el tratamiento con vincristina y que se reducen las células neoplásicas en las biopsias analizadas. El mecanismo responsable de la eosinofilia no es conocido; sin embargo, el persistente incremento de eosinófilos en caninos con TVT, según Hill *et al.*, (1984), podría deberse a un factor eosinofilotáctico asociado al tumor.

La disminución del número de leucocitos en el 100% de los pacientes, observada entre los 7 y 14 días de iniciarse el tratamiento, con una verdadera neutropenia en el 45% de los casos, demuestra el efecto mielosupresor selectivo para la serie neutrofilica producida por la vincristina en pacientes que cursan con TVT.

Los valores promedios de plaquetas de $285,22 \times 10^6/\mu\text{l}$ se encuentran dentro de los valores de referencia en los animales con TVT en fase progresiva, con un porcentaje de animales que cursan trombocitopenia tanto en la etapa progresiva como en la regresiva, porcentajes que son semejantes a los reportados por Flores *et al.*, (2000). Los animales con trombocitopenia, podrían presentar exacerbación de los signos hemorrágicos (Nelson y Couto, 2010). A los 7 días de iniciado el tratamiento se observa un leve incremento en el número promedio de plaquetas con una disminución en la cantidad de pacientes que presentan trombocitopenias, probablemente debido a una estimulación de la vincristina sobre la liberación de plaquetas de los megacariocitos, efecto que es transitorio ya que si bien el número de plaquetas se mantiene a lo largo del tratamiento, la cantidad de pacientes trombocitopénicos vuelve a aumentar en los 14 y 21 días post tratamiento.

El perfil bioquímico básico usado (ALT, urea y creatinina), no presentó alteraciones durante el tratamiento con vincristina, lo que sugiere que la funcionalidad hepática y renal no estaría seriamente comprometida como consecuencia del tratamiento, si bien es necesario el control bioquímico previo a una quimioterapia, para tener una visión de las posibilidades de metabolización, activación y eliminación de los agentes citotóxicos (Flores *et al.*, 2000).

Los valores promedios de PT, Alb, Glob, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$, se encontraron dentro de los valores de referencia para la especie canina, en tanto que, las concentraciones de $\beta 2$ globulinas se observaron en el límite superior del valor de referencia ó ligeramente incrementada. Entre las globulinas que corren en esta fracción, está la $\beta 2$ microglobulina, y

sus valores séricos reflejan el grado de activación del sistema inmune, pudiendo ser utilizados como marcadores en procesos tumorales (Gazapoa *et al.*, 1996). Este incremento de las β -globulinas podría relacionarse a los mecanismos inmunológicos de control del TVT (Cohen *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1987).

En concordancia con estudios previos realizados por Calvet, (1993); Nak *et al.*, (2005); Ramirez Perez *et al.*, (2011); Hantrakul *et al.*, (2014), la respuesta al tratamiento con sulfato de vincristina vía endovenosa a dosis de 0,5 a 1 mg/m² de superficie corporal (0,025 mg/Kg) cada 7 días, fue buena, lográndose en coincidencia con otros autores (Calvet, 1993; Tella *et al.*, 2004; Nak *et al.*, 2005; Ramirez Perez *et al.*, 2011) una recuperación completa en el 85% de los pacientes y una respuesta dispar en cuanto a la cantidad de aplicaciones de quimioterapia necesarias para reducir completamente el tumor, que en este estudio fue de 3 a 7 dosis (con una media de 4,59); no observándose recidiva en el período de uno a dos años siguientes. La respuesta lograda confirma la eficacia del uso del sulfato de vincristina como monodroga en la quimioterapia del TVT, lo que concuerda con los datos reportados por Hantrakul *et al.*, (2014). Al igual que Purohit, (2009), observamos que la involución del tumor post tratamiento es gradual aunque es particularmente notorio al comienzo del mismo.

El 15% de los pacientes en estudio, no tuvieron una buena respuesta al tratamiento. Dos de ellos fueron resistentes al sulfato de vincristina a la dosis programada. Se debe considerar una resistencia a la quimioterapia con vincristina si luego de 6 ciclos de tratamiento, permanece una masa tumoral residual (Da Silva *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos que podrían llevar a esta resistencia estarían relacionados según estudios realizados por Gaspar *et al.*, (2010) y Da Silva *et al.*, (2014) a la sobreexpresión de una glícoproteína, la P-gp (Permeability glycoprotein), pero esta hipótesis no fue testada.

La muerte de la paciente pekinés, con TVT localizado en cara, paladar y metástasis a ganglio regional, cuyo estado de salud al momento del diagnóstico estaba muy comprometido, demuestra que la detección tardía de la neoplasia puede afectar seriamente la respuesta al tratamiento y la recuperación del paciente y valida lo informado por Daleck *et*

al., (1987); Boscos y Ververidis, (2004) en relación a que el tratamiento tiene mayor probabilidad de éxito si se realiza en estadios iniciales de la enfermedad.

La gran cantidad de células neoplásicas observadas en los extendidos citológicos, demuestra que el TVT es un tumor muy exfoliativo. De acuerdo con Cangul (2001), Guvenc *et al.*, (2002), Ulkar *et al.*, (2012) y Kutzler, (2013), observamos que la morfología, tiene algunas características semejantes a otros tumores de células redondas (en particular los histiocitomas y los linfosarcomas), por lo que, el uso de técnicas que expresen con mayor detalle las características morfológicas de las células como la microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y la microscopía electrónica de transmisión, pueden ser muy útiles (Santos *et al.*, 2005).

La observación de un mayor número de neutrófilos y bacterias en los extendidos realizados por improntas, indicarían una tendencia frecuente de infección y contaminación en la superficie de los tumores lo que podría modificar las características macroscópicas del mismo justificando las diversas variables observadas.

Morfológicamente se observaron algunas diferencias entre las células de TVT lo que coincide con las descripciones hechas por Amaral *et al.*, (2004 y 2012) y Flórez *et al.*, (2012), en cuanto a la presencia en los extendidos de células de TVT de aspecto diferente, unas más redondeadas, con un citoplasma finamente granular que contiene escasas vacuolas, con núcleos centrales, redondos, de cromatina gruesa y con uno o 2 nucléolos, caracterizadas como células linfocitoides y otras células algo más ovoides, con mayor cantidad de citoplasma, abundantes vacuolas claras y con un núcleo localizado excéntricamente, clasificadas como plasmocitoides.

La elevada sensibilidad de la citología como prueba complementaria de diagnóstico, hace de la técnica un elemento de gran ayuda, debido a que preserva y resalta mejor las características morfológicas tanto citoplasmáticas como nucleares de la célula neoplásica y de acuerdo con Ulčar *et al.*, (2012) puede servir como prueba diferencial en aquellos casos en que el análisis histopatológico genere dudas respecto a la identificación del tumor particularmente por su semejanza a los histiocitomas (Thangathurai *et al.*, 2008). La

simplicidad de la técnica, la rapidez en la obtención de los resultados y los bajos costos la transforman en la técnica de elección en el primo-diagnóstico, teniendo en cuenta que la historia del paciente y el examen físico tienen un rol fundamental en el diagnóstico.

La presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con basofilia y vacuolización se puede correlacionar según Tella *et al.*, (2004) y Ulčar *et al.*, (2012) con los hallazgos de que este tumor tiene una interacción fuerte con el sistema inmune a través de linfocitos T y células natural killer (NK), también llamados linfocitos que infiltran el tumor (TILs). Es posible que durante la etapa de crecimiento progresivo del tumor, las células de TVT bloqueen la respuesta inmune, pero la misma se reactiva luego de la citorreducción del TVT inducida por la quimioterapia. Coincidimos con Flores *et al.*, (1997) y Santos *et al.*, (2005) en que la vincristina conduce al tumor a una fase de regresión con una marcada respuesta inmune local, donde el porcentaje de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, se incrementa significativamente, siendo esto evidente tanto en el diagnóstico citológico, histopatológico, (MOAR) y microscopía electrónica. Tella *et al.*, (2004) sugieren que al efecto de la vincristina, se le suma el control localizado del TVT mediado por anticuerpos y una respuesta de inmunidad celular mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad asociado a linfocitos T.

Como consecuencia del tratamiento con vincristina, la proliferación de células tumorales se detuvo en el 85% de los casos, y en los estudios histológicos y de ultraestructura aumentaron las células degeneradas, los linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, además, el parénquima tumoral ubicado alrededor de los vasos intratumorales se desorganizó y hubo un incremento significativo de las fibras de colágeno. Estos resultados son coincidentes con Gonzalez *et al.*, (2000) y Vargas Gonzalez, (2003). La gran síntesis de colágeno observada en los tumores en fase regresiva inducida por la vincristina, podría relacionarse a una diferenciación *in situ* de las células tumorales más que a una infiltración de fibroblastos (Hill, 1984). Esto estaría relacionado a las observaciones ultraestructurales de vacuolas de colágeno en el citoplasma de la célula de TVT.

Las frecuentes mitosis observadas tanto en muestras citológicas como histopatológicas, indican la naturaleza progresiva de las células tumorales.

El IM obtenido a partir de las tinciones de H/E de los cortes histológicos de los caninos que no respondieron al tratamiento (0,46%) tuvo un promedio menor aunque semejante respecto al IM de los caninos que respondieron al tratamiento (0,57%), con un coeficiente de variación muy elevado debido a la gran amplitud observada en los porcentajes de las tres muestras.

Los pacientes que respondieron efectivamente al tratamiento con sulfato de vincristina presentaron un IM superior al basal a los siete días de iniciado el tratamiento, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, a pesar de observarse una disminución en el tamaño de la masa tumoral en la mayoría de los animales y la reducción importante y estadísticamente significativa del IM se produjo recién, con la 2da dosis de vincristina coincidiendo con los trabajos de Santos *et al.*, (2011) que obtuvieron IM más bajos en tumores en fase regresiva y de Tella *et al.*, (2004), quienes observaron que en la cuarta administración de vincristina (día 28) las células tumorales se vuelven más compactas con una considerable fibroplasia y sin figuras mitóticas.

Sin embargo, hay que considerar que el IM detecta sólo las células que están en mitosis, y no permite observar el resto de las fases del ciclo celular. Su principal defecto es la falta de estandarización y la baja capacidad para reproducir esta prueba (Hall y Levison, 1990; Linden *et al.*, 1992; Madewell, 1997).

Con el fin de evaluar el pronóstico del TVT tanto por su presentación como por su respuesta al tratamiento se realizó el recuento de partículas de AgNOR en forma manual e individual, similar a lo realizado por autores como Palomo González *et al.*, (2002), Rocher *et al.*, (2000) y Vargas Gonzalez, (2008). El método del AgNOR tiene algunas limitaciones originados en factores propios de la técnica y en la lectura de los resultados. La técnica tiene puntos críticos como son el tipo de fijador usado y el tiempo de la reacción que es dependiente de la temperatura y que oscila entre 20 y 60 min, con un tiempo medio de 25

min, coincidiendo con Derenzini, (2000); Rocher *et al.*, (2000); Trerè, (2000). En la lectura de los resultados, influye la agrupación extrema de partículas cuya superposición dificulta el recuento diferencial y también influyen los depósitos inespecíficos de Ag (fondo o “background”), producidos como consecuencia del fijador empleado (formol tamponado al 10%), que en muchos casos forman agregados inespecíficos como puntos pequeños dispersos en la zona nuclear que no presentaban las características propias del AgNOR (Trerè, 2000), que pueden confundir al operador y que según Rocher *et al.*, (2000) pueden reducirse recurriendo al lavado con tiosulfato de sodio al 1% durante 5 min. El criterio elegido para la determinación del número de partículas es fundamental y debe insistirse en un método que permita la estandarización, ya que la técnica es sencilla pero rigurosa. El observador debe ser meticuloso, contando solo las partículas discernibles aunque se encuentren agrupadas para poder obtener resultados reproducibles y comparables (Rocher *et al.*, 2000) ya que la técnica es accesible para ser usada de manera rutinaria y paralela a técnicas histopatológicas y citológicas.

En los animales que mostraron resistencia al tratamiento, el número de AgNOR promedio por célula de TVT (de $4,1 \pm 1,6$), fue superior respecto al observado en los animales con buena respuesta al tratamiento ($3,1 \pm 1,3$) y en ambos casos fue superior al observado por Rodriguez *et al.*, (2010) quien obtuvo un promedio de $1,53 \pm 0,87$ y Vargas Gonzalez, (2008), que obtuvo $2,07 \pm 0,3$. Las diferencias encontradas en cuanto al número de partículas AgNOR / célula de TVT con otros autores (Rodriguez *et al.*, 2010) estaría relacionado a los criterios usados en cuanto al recuento de los grupos compactos como una sola partícula, obteniendo diferencias mucho menores.

El número de partículas de AgNOR se redujo a los 7 días de iniciado el tratamiento en los animales que presentaron buena respuesta a la vincristina, en tanto que, en los pacientes que no respondieron correctamente al tratamiento se observaron leves incrementos de los mismos, por lo que, la caracterización en base a parámetros de cuantificación de los AgNORs en la célula del TVT canino permitiría establecer pautas para poder evaluar el pronóstico y evolución del TVT canino, como se realiza en otras neoplasias (Santos *et al.*, 1998; Pich, 2000; Rodriguez *et al.*, 2010).

Sin embargo, el número de AgNOR observado en células de TVT es superior a los encontrados en muchas neoplasias malignas por lo que coincidimos con Vargas Gonzalez, (2008), en que el número de AgNOR estaría mas asociado a una mayor tasa de proliferación celular que a un comportamiento maligno. Se podría postular, que la alta presencia de proteínas argirófilas en el TVT, se asociaría a células en proliferación celular con una cinética más corta del ciclo celular, que produciría mayor cantidad de ribosomas, proteínas y AgNORs por unidad de tiempo durante la interfase (Santos *et al.*, 2011), ya que según expresa Derenzini, (2000), el número de los AgNORs en interfase está estrictamente relacionado a la actividad transcripcional del ARNr y en las células en constante proliferación está relacionado a la velocidad de la proliferación celular.

Considerando la distribución de los puntos argirófilos en la célula de TVT, tal cual lo detalla Santos *et al.*, (2005), no se observaron patrones que permitan sospechar la naturaleza de mayor o menor agresividad del tumor. En la mayoría de los casos se observaron todos los casos posibles de distribución de las partículas de AgNOR con predominio de la distribución aislada y difusa y cubriendo todo el nucléolo, según los caracteriza Santos *et al.*, (2011), excepto en uno de los tumores resistentes que presentó una distribución en cadena y en la periferia del núcleo.

Los resultados obtenidos en las tinciones citológicas, logrando extendidos de buena calidad, permitieron hacer un análisis de los agregados, resultando una técnica más rápida que trabajar con cortes histológicos y permitirían usar la técnica de tinción de plata para la evaluación de los AgNORs en la evaluación del paciente. Tienen como desventaja que con el avance del tratamiento el número de células neoplásicas en los extendidos, se reduce al punto de dificultar un contaje celular representativo.

Los valores de porcentajes de Ki-67 fueron similares a los obtenidos con los porcentajes de mitosis, aunque el antígeno de Ki-67 tiene una vida media corta, siendo degradado una hora después de la mitosis. Esto garantiza que las células que han salido del ciclo celular ya no presenten el antígeno (Alves, 1999; Santos *et al.*, 2005).

En 3 de los pacientes no se obtuvieron inmunomarcaciones positivas para Ki-67. El porcentaje de inmunomarcación para Ki-67 de los animales previo al tratamiento fue de $0,81\% \pm 0,9\%$ y posterior al tratamiento fue de $0,87\% \pm 1,2\%$; en ambos casos fueron inferiores a los publicados por otros autores (Guvenc, 2002; Greatti *et al.*, 2004; Bassani Silva, 2008; Santos *et al.*, 2011).

A pesar de encontrarse un promedio de Ki-67 inferior en los tumores en fase de crecimiento, en relación a la etapa regresiva del tumor, en el 66,7% de los animales tratados, el número de células marcadas en la fase regresiva inducida por el tratamiento (a los 7 días de iniciado) fue menor, sugiriendo que en esta etapa del crecimiento tumoral, la actividad de proliferación celular está disminuida.

En nuestra observación, el método inmunohistoquímico con PCNA presentó porcentajes de inmunomarcación de $50,5\% \pm 15,8\%$ en los tumores en fase progresiva, coincidiendo con lo expresado por Ganguly *et al.*, (2013) y de $55,2\% \pm 25,4\%$ en los tumores en fase regresiva inducida por la vincristina. Las imágenes observadas respecto a la inmunomarcación para PCNA en las muestras tanto previo como posterior al tratamiento, fueron comparables con las publicadas por Gupta y Sood, (2012) quienes realizaron un estudio inmunohistoquímico en dos casos de TVT primario extragenital donde observaron una inmunoexpresión de fuerte intensidad, aunque, el porcentaje de inmunomarcación obtenido en este estudio, fue inferior a los observados por dichos autores, quienes publicaron un 60 y 80-90% para cada caso.

De acuerdo con Griffey *et al.*, (1999) y Vargas Gonzalez, (2008), la elevada marcación para PCNA y esta variabilidad en los resultados, podría deberse a su larga vida media (20 hrs) que podría sobreestimar el índice de proliferación de la neoplasia inmunomarcando células que han dejado recientemente el ciclo celular y en las cuales aún se podría detectar la presencia de PCNA no degradado (Linden *et al.*, 1992).

Además, debería considerarse que si bien el PCNA juega un rol fundamental en la replicación del ADN y por ello es considerado un marcador de proliferación celular, también está involucrado en los mecanismos de reparación del ADN y en menor grado, en generar

señales negativas para la detención de la progresión del ciclo celular (Maga y Hübscher, 2003; Gupta y Sood, 2012), estos dos últimos procesos podrían estar activos en la fase regresiva del tumor, lo cual justificaría los porcentajes obtenidos posterior al inicio del tratamiento.

La técnica de MOAR permitió observar la estructura tumoral con mayor detalle y definición si lo comparamos con la técnica histopatológica convencional de H/E. Con dicho procedimiento se logró una mayor resolución de cada una de las estructuras analizadas, donde se resalta con mayor definición el engrosamiento de la membrana nuclear y el característico nucléolo. Coincidente con lo observado con la tinción de H/E, a medida que se aplican las dosis de vincristina, se reduce la cantidad de células de TVT por campo y se incrementan los linfocitos, fibroblastos con abundante tejido conectivo y células que presentaban procesos de picnosis y cariorexis.

Las características ultra estructurales de la célula de TVT son semejantes a las descritas por otros autores, mostrando cambios citoplasmáticos y nucleares por efecto de la vincristina.

Coincidiendo con Hill *et al.*, (1984), en la etapa progresiva del crecimiento tumoral, la ultra estructura observada en la mayoría de las células es compatible con un metabolismo activo y un incremento de la actividad de síntesis proteica, lo suficientemente importante como para involucrar a los ribosomas, gránulos, material electrodensito perinuclear y membrana nuclear, que se distiende.

Los tumores en fase regresiva, muestran células tumorales más fusiformes con vacuolas de colágeno, sugiriendo una diferenciación hacia células fibroblásticas (Hill *et al.*, 1984; Yang, 1988).

CONCLUSIÓN

7-CONCLUSIÓN

En nuestra región el TVT es un tumor de localización principalmente genital con una mayor presentación en hembras, entre los 2 y 5 años de edad, siendo poco frecuente en cachorros y gerontes. La raza más afectada es la mestiza, por ser un grupo de mayor riesgo si lo relacionamos a que la mayoría de los animales con TVT son perros vagabundos que han sido rescatados de la calle.

Se comporta como una neoplasia benigna debido al bajo porcentaje de metástasis pero localmente es muy agresiva. En general presenta una buena respuesta al tratamiento con sulfato de vincristina, pero la detección tardía de la neoplasia, cuando se encuentra en un estado avanzado con metástasis ganglionar, pone en riesgo la vida del animal.

Del perfil hematológico, los cuadros de anemia, leucocitosis, neutrofilia, monocitosis y eosinofilia se relacionan con el TVT. La eosinofilia, al ser la variable más frecuentemente observada, puede considerarse como un signo paraneoplásico en el TVT.

El tratamiento con vincristina afecta selectivamente la serie neutrofilica produciendo leucopenias con neutropenias severas. Los valores hematológicos basales y los controles durante el tratamiento son elementos de juicio importantes para las decisiones terapéuticas y para el control post tratamiento.

La citología como herramienta de diagnóstico permite aplicarla con un amplio margen de seguridad debido a su alta sensibilidad, transformándola en una herramienta en el diagnóstico de rutina. La histopatología y la microscopía óptica de alta resolución permiten realizar el diagnóstico del TVT, aunque a través de MOAR se obtienen imágenes de mayor definición.

Las células de TVT sufren cambios ultraestructurales como consecuencia del tratamiento con tendencia a la transformación en células fusiformes, una retracción en su tamaño, con incremento de la relación núcleo citoplasma, citoplasmas más espumosos, con incremento de vacuolas, sugiriendo una diferenciación hacia células fibroblásticas.

La vincristina produce una reducción del tumor con una fuerte respuesta inmune local, con células neoplásicas degeneradas y un reemplazo de la masa tumoral por tejido conectivo. Estos cambios son observados tanto a nivel histológico como ultraestructural.

El conteo de células en mitosis (IM) puede ser una herramienta útil en el diagnóstico y pronóstico del TVT y más aún si se usa junto a otros marcadores de proliferación celular.

La cuantificación de AgNOR estaría más asociado a una mayor velocidad de proliferación celular que a un comportamiento maligno y su determinación tempranamente, luego de iniciada la quimioterapia, es de utilidad pronóstica para seguir el tratamiento y evolución del TVT, permitiendo al clínico tomar decisiones tempranas en relación a modificaciones en la terapia o uso de terapias alternativas. Sin embargo, es fundamental encontrar un método de determinación de AgNOR que permita la estandarización, para poder obtener resultados comparables.

El mayor número de AgNORs observados en fase progresiva de TVT comparado con algunos tumores malignos, indicaría que está relacionado a la velocidad del ciclo celular más que al comportamiento biológico.

El uso de este marcador de proliferación celular en muestras citológicas abre la posibilidad de obtener diagnósticos más rápidos y realizar el seguimiento del tumor. Debe ser considerada una técnica complementaria al diagnóstico citológico.

Los porcentajes de Ki-67, descienden en la mayoría de los animales tratados con vincristina en la fase regresiva del tumor, luego de la primer semana de tratamiento. Junto con AgNOR, son marcadores de proliferación celular capaces de distinguir la fase de crecimiento progresivo y regresivo del TVT.

PCNA podría sobrestimar el índice de proliferación del TVT debido a su larga vida media, siendo además un indicador de reparación del ADN.

Las herramientas metodológicas empleadas en este trabajo permiten presentar resultados epidemiológicos, en tanto que, las técnicas inmunohistoquímicas aportan datos cuantitativos para el diagnóstico de TVT y el pronóstico de la terapéutica utilizada.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abukhdeir, A., Park, B. (2008). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert. Rev. Mol. Med.*: 10: 19.
- Adams, E., Slaughter, L. (1970). A canine venereal tumour with metastasis to the brain. *Path. Vet.*: 7: 498-502.
- Alcoba, A. (2001). Estudio antigénico comparativo de células purificadas de Tumor Venéreo Transmisible espontáneo canino provenientes de Chile y Argentina. (Tesis de Maestría). Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Alcoba, A., Maffrand, C., Morilla, G., Benzoni, A., Gonzalez, G. (Mayo 2014). Presentación intrauterina del Tumor Venéreo Transmisible Canino. Trabajo presentado en la XXIII Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales. Buenos Aires.
- Alvarez Espinoza, J. (2010). Prevalencia, diagnóstico y tratamiento del tumor venéreo transmisible (TVT) en perros de la calle en Morelia, Michoacán. (Tesis de grado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Alves, V., Bacchi, C., Vassalo, J. (1999). *Manual de imuno-histoquímica*. Sao Paulo, Brasil: Sociedade Brasileira de Patologia.
- Amaral, A., Gaspar, L., Silva, S., Rocha, N. (2004). Diagnostico citologico do tumor venereo transmissivel na regio de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). *RPCV*: 99(551): 167-171.
- Amber, E., Henderson, R. (1982). Canine transmissible venereal tumour: evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*: 18: 350-352.
- Amber, E., Henderson, R., Adeyanju, J., Gyang, E. (1990). Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumour with cyclophosphamide, methotrexate, or vincristine. *J. Vet. Intern. Med.*: 4: 144-147.
- Amber, E., Isitor, G., Adeyanju, J. (1985). Viral like particles associated with naturally occurring transmissible venereal tumor in two dogs: preliminary report. *Am. J. Vet. Res.*: 46(12): 2 613 - 2 615.
- Aprea, A., Allende M., Idiard R. (1994). Tumor Venéreo Transmisible Intrauterino: descripción de un caso. *Vet. Argentina*: XI. 103: 192-194.

- Arce Visales, D. (2012). Evaluación hematológica de pacientes presentados en terapéutica quirúrgica para tratamiento de tumor venéreo transmisible en el período 2011-2012. (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Sonora. Obregón, Sonora.
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., Robledo, C. (2008). *Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bassani Silva, S. (2008). Imunoexpressão e citogenética do tumor venéreo transmissível natural no cão. (Tesis doctoral). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Botucatu.
- Bastan, A., Bukiacar, D., Gengiz, M. (2008). Uterine and Ovarian Metastasis of Transmissible Venereal Tumor in a Bitch. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*: 32(1): 65-66.
- Batamuzi, E., Kristensen, F. (1996). Urinary tract infection: The role of canine transmissible venereal tumour. *J. Small Anim. Pract.*: 37(6): 276 - 279.
- Bautista Gomez, L., Martínez Castañeda, S., Córdoba Alarcón, E., Vázquez Chagoyán, J. (2011). Analysis of canine transmissible venereal tumor genotypes using the D-loop region of mitochondrial DNA. *Genes Genet. Syst.*: 86: 351-355.
- Boscos, C., Ververidis, H. (2004). Canine TVT: Clinical findings, diagnosis and treatment. *Sci.Proc WSWA-FECAVA-HVMS World Congress, Rhodes, Greece*, (2): 758-761.
- Boyiadziz, M., Frame, J., Kohler, D., Fojo, T. (2014). *Hematology-Oncology therapy*. (2da ed). United States of America. McGraw-Hill Education.
- Bostock, D., Moriarty, J., Crocker, J. (1992). Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*: 29(5): 381-385.
- Bratulic, M., Grabarevic, Z., Artukovic, B., Capak, D. (1996). Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleus and nucleolus--prognostic value in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*: 33(5): 527-532.
- Brown, N., Calvert, C., Mac Ewen, E. (1980). Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*: 176(10): 983-986.
- Calvert, C., Leifer, C., Mac Ewen, E. (1982). Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*: 181(2): 163-164.

- Calvet, C. (1993). Transmissible venereal tumor in dog. En: R.W., Kirk. *Current Veterinary therapy VIII*. Philadelphia: WB Saunders Co. (pp. 413-415).
- Caponi, O., Vitale, S., Sallúa. (1999). Tumores en la especie canina. *Bol SICLIVET*: Montevideo 2(6): 1-3.
- Clark, G. (1981). Methods for general tissue. In: *Staining procedures*. (4 ed). USA: Williams and Wilkins. (pp. 105-112).
- Cockrill, J., Beasley, J. (1975). Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor various stages of growth and regression. *Am. J. Vet. Res.*: 36(5): 677-681.
- Cockrill, J., Beasley. J. (1979). Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. *Am. J. Vet. Res.*: 40: 409-410.
- Cohen D. (1973). The biological behavior of TVT in immunosuppressed dogs. *Eur. J. Cancer*: 3: 163-164.
- Cohen, D. (1985). The canine transmissible venereal tumor. A unique result of tumor progression. En: *Advances in Cancer Research*. (pp. 75-112). Academic Press, Inc. Orlando, Florida 32887.
- Cohen, D., Shalev, A., Krup, M. (1984). Lack of beta 2 micro globulin on the surface of canine transmissible venereal tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*: 72(2): 395-401.
- Comité de Ética de la Investigación, reglamentación. (Coedi) (Resolución C.S.N° 253/10) <https://www.unrc.edu.ar/unrc/coedi/index.html>. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Comité de Ética de la Investigación. (Coedi) (Expediente 11/11) Universidad Nacional de Río Cuarto, 2012, 28 Febrero.
- Cooper, G. (2002). *La célula*. (2ª ed). Marbán Libros. Madrid, España.
- Coppoc, G. (2009). Chemotherapy of neoplastic diseases. En: J.E. Riviere y M.G. Papich *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. (9na ed.). (pp. 1205-1231). Ames, Iowa: Willey-Balckwell.
- Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J., DeNicola, D. (2009). *Citología y Hematología Diagnóstica en el Perro y el Gato*. (3 ed.) Multimédica, Barcelona. Mosby Elsevier Inc.
- Cullen, J., Page, R., Misdorp, W. (2002). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. En: D. Meuten. *Tumors in Domestic Animals*. (4ta ed.). (pp. 3-44). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.

- Da Silva, D., Reusing, M., Franciosi, A., Belo, C., Goncalves, K., De Souza, R., Guérios, S. (2014). Treatment of canine transmissible venereal tumor using L-asparaginase, prednisone, and surgery in a clinical chemotherapy-resistant case. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*: 38: 220-223.
- Daleck, C., Ferreira, H. (1987). Novos estudos sobre o tratamento do tumor venéreo transmissível canino. *Ars. Vet.*: 3(2): 203-209.
- Das, U., Das, A. (2000). Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet. Res. Commun.*: 24(8): 545-556.
- de Buen de Argüero, N., Guzman Becerril, M. (2014). Citología de la piel y los tejidos blandos. En: N. de Buen de Argüero. *Atlas de citopatología veterinaria*. (pp. 105-157). CABA.: Inter-Médica.
- De la Sota, P., D'Amico G., Adagio, L., Noia, M., Gobello, C. (2004). Tumor Venéreo Transmisible. *Ciencia Veterinaria*: 6(1): 42-49.
- De Mombreum W., Goodpasture. E. (1934). An experimental investigation concerning the nature of contagious lymphosarcoma in dogs. *Amer.J. Cancer.*: 21: 295-321.
- Derenzini M. (2000). The AgNORs. *Micron*: 31: 117-120.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. (2008). *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Egan, M., Crocker, J. (1992). Nucleolar organiser regions in pathology. Review. *Br. J. Cancer*: 65: 1-7.
- Elston, C., Ellis, I. (1993). Method for grading breast cancer. *J. Clin. Pathol.*: 13: 13-17.
- Ferreira, A., Jaggy, A., Varejão, A., Ferreira, M., Correia, J., Mulas, J., 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.
- Ferreira, G. (2003). *Patología Veterinaria*. Colombia. Universidad de Antioquia.
- Flores P. (1986). Epidemiología del cáncer en perro y gato. *Monografías de Medicina Veterinaria*: 8(2).
- Flores, E., Gonzalez, C., Cattaneo, G., Diez, X. (1997). Chemotherapy in transmissible venereal tumor (TVT) in dogs. En: A. Survey. *Spontaneous Animal Tumors*. (pp. 399-402). Italy. Lorenzo Rossi, Ralph Richardson, Jhon Harshbarger.

- Flores, E., Cattaneo, G., Gonzalez, C., Cepeda, R. (2000). Tumor venéreo transmisible. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. *Monografías de Medicina Veterinaria*: 20(1).
- Flórez, M., Pedraza, F., Grandi, F., Rocha, N. (2012). Cytologic Subtypes of canine transmissible venereal tumor. *Vet. Clin. Pathol.*: 41(1): 3-5.
- Fujinaga, T., Yamashita, M., Yoshida, M.C., Mizuno, S., Tajima, M., Okamoto, Y., Otomo, K. (1989). The banding patterns of normal canine chromosomes. *Jpn. J. Vet. Sci.*: 51: 294-299.
- Fujinaga, T., Yamashita, M., Yoshida, M., Mizuno, S., Okamoto, Y., Tajima, M., Otomo, K. (1989). Chromosome analysis of canine transmissible sarcoma cells. *J. Vet. Med.*: A. 36: 481-489.
- Ganguly, B., Das, U., Das, A. (2013). Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet. Com. Oncol.*: 14(1): 1-12. DOI: 10.1111/vco.12060.
- Gaspar L., Ferreira, I., Colodel, M., Brandão, C., Rocha, N. (2010). Spontaneous canine transmissible venereal tumor: cell morphology and influence on P-glycoprotein expression. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*: 34: 447-45.
- Gazapoa, E., Gazapob, R., Caturlab, A. (1996). Utilidad clínica de la determinación de beta-2-microglobulina. *Med. Clin.*: 106(19): 751-755.
- George P., Journey, L., Goldstein, M. (1965). Effect of vincristine of the fine structure of HeLa cells during mitosis. *J. Natl. Cancer Inst.*: 35(2): 355-375.
- Gidding, C., Kellie, S., Kamps, W., de Graaf, S. (1999). A Vincristine revisited. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*: 29, 267-287.
- Giraldo, G., Aranzazu, D., Rodríguez, B., Pérez, Ramírez, M. (2003). Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares coloreadas con plata (AgNORs) en tumores mamarios caninos. *Rev. Col. Cienc. Pec.*: 16(1): 33-39.
- Goldschmidt, M., Hendrick, M. (2002). Tumors of the skin and soft tissue. En: D. Meuten. *Tumors in Domestic Animals*. (4ta ed.). (pp. 45-117). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Gonzalez, C., Griffey, S., Naydan, D., Flores, E., Cepeda, R., Cattaneo, G., Madewell, B. (2000). Canine transmissible venereal tumour: a morphologic and immunohistochemical study of 11 tumors in growth phase and during regression following chemotherapy. *J. Comp. Pathol.*: 122(4): 241-248.

- Greatti, W., Amaral, A., Silva, S., Gaspar, L., Barbisan, L., Rocha, N. (2004). Indices proliferativos do tumor venereo transmissivel canino pelas tecnicas do CEC e Ki-67 na citologia aspirativa com agulha fina. *Arch. Vet. Sci.*: 9(1): 53-59.
- Griffey, S., Kraegel, S., Madewell, B. (1999). Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), ki-67 (MIB-1) and mitotics counts. *J. Comp. Pathol.*: 120: 321-332.
- Griffits, H., Lumsden, J., Vallt V. (1984). Fine nidle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Vet. Clin. Pathol.*: 13: 13-17.
- Gross, T., Irhke, P., Walder, E., Affolter, V. (2005). *Skin diseases of the dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis*. (2da ed.). Ames, Iowa, USA: Blackwell Science, UK.
- Gulbis, J., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*: 87: 297-306.
- Gupta, K., Sood, N. (2012). Pathological and immunohistochemical studies on rare cases of primary extra-genital transmissible venereal tumours in the mammary gland. *Vet. Med. Czech.*: 57 (4): 198-206.
- Gurel, A., Kuscu, B., Gulanber, E., Arun, S. (2002). Transmissible venereal tumors detected in the extragenital organs of dogs. *Isr. J. Vet. Med.*: 7(2).
- Guvenc, T., Haligur, M., Orman, M., Hazirolu, R. (2002). Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Vet. Hung.* 50(3): 315-321.
- Hall, P., Levison, D. (1990). Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*: 43: 184-192.
- Hantrakul, S., Klangkaew, N., Kunakornsawat, S., Tansatit, T., Poapolathep, A., Kumagai, S., Poapolathep, S. (2014). Clinical pharmacokinetics and effects of vincristine sulfate in dogs with transmissible venereal tumor (TVT). *J. Vet. Med. Sci.*: 76(12): 1549-1553.
- Hawkins, C., Baars, C., Hesterman, H., Hocking, G., Jones, M., Lazenby, B., Mann, D., Mooney, N., Pemberton, D., Pyecroft, S., Restani, M., Wiersma, J. (2006). Emerging disease and population decline of an island endemic, the Tasmanian devil *Sarcophilus harrisii*. *Biol. Conserv.*: 131: 307-324.
- Hermanek, P., Hutter, R., Sobin, L., Wagner, G., Wittekind, Ch. (1997). *Atlas TNM. Guía ilustrada de la clasificación TNM/pTNM de los tumores malignos*. (4ta ed.). España. Springer.

- Hess, A., Cunningham, B., Taylor, B., Epstein, R. (1975). *In vitro* correlates of the *in vivo* course of the canine transmissible venereal tumor studied by mixed lymphocyte-tumor cultures. *Transplant Proc.*: 7(4): 507-511.
- Hill, D., Yang, T., Wachtel, A. (1984). Canine transmissible venereal sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. *Vet. Pathol.*: 21: 39-45.
- Howell, W., Black, D. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experimentia*: 36: 1014-1015.
- Hsiao, Y., Liao, K., , Chu, R. (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.
- Jones, M., Paetkau, D., Geffen, E., Moritz, C. (2004). Genetic diversity and population structure of Tasmanian devils, the largest marsupial carnivore. *Mol. Ecol.*: 13: 2197-2209.
- Joseph, M. (1993). *Técnicas actuales en cirugía de animales pequeños*. (3ra ed.). Buenos Aires, Argentina. Intermédica.
- Klopfleisch, R., Gruber, A, (2009). Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. *Res. Vet. Sci.*: 87: 91-96.
- Kisani, I., Adamu, S. (2009). A case of transmissible venereal tumor in a castrated dog in Benue state, Nigeria. *J. Anim. Plant. Sci.*: 5(2): 527-530.
- Kutzler, M. (2013). Overview of canine transmissible venereal tumor. *The Merck Veterinary Manual*. Recuperado en Mayo de 2013 de <http://www.merckvetmanual.com>.
- Leyva Huerta, E., Flores Flores, G., Gaitán Cepeda, L. (2008). ¿Son los AgNOR's una herramienta útil como marcadores pronósticos del cáncer? *Av. Odontostomatol.*: 24(3): 211-218.
- Li, H., Byeon, I., Ju, Y., Tsai, M. (2004). Structure of human Ki67 FHA domain and its binding to a phosphoprotein fragment from hNIFK reveal unique recognition sites and new views to the structural basis of FHA domain functions. *J. Mol. Biol.*: 335: 371-381.

- Hung, S., Hsiao, Y., Bennett, M., Chu, R. (2003). Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Lind. Vet. Immunol. Immunopathol.*: 92(3-4): 149-62.
- Linden, M., Torres, F., Kubus, M., Zarbo, R. (1992). Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. *Am. J. Clin. Pathol.*: 97(1): S4-S13.
- Lorimier, L., Fan, T. (2007). Canine transmissible venereal tumor. En: S.J. Withrow, D.M. Vail, editors. *Small Animal Clinical Oncology*. (4ta ed.). (pp. 799-803). St. Louis, MO, USA: Elsevier.
- Lyman, G., Cassidy, J., Bissett, D., Spence, R., Payne, M. (2015). *Oxford American Handbook of Oncology*. (2da ed.). United States of America: Oxford University Press.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2008). *Molecular Cell Biology*. (6ta ed.). W.H. New York: W. H. Freeman.
- Lombard, C., Cabanie, P. (1968). Le sarcome de Sticker. *Rev. Med. Vet.*: 119(6): 565-586.
- López Muñiz, A., Treviño, A., Hernández, L., Herrero, A. (2001). Valoración de las regiones organizadoras nucleares en lesiones melánicas benignas y malignas de piel. *Rev. Cubana Med.*: 40(1): 17-23.
- Lu, K., Yap, H., Loo, T. (1983). Clinical pharmacokinetics of vinblastine by continuous intravenous infusion 1. En: *Vincristine revisited. Critical Reviews in Oncology: Hematology* 29: 267-287.
- Mac Ewen, E. (1992). Tumor venéreo transmisible. En: J. Barlough. *Manual de las Enfermedades Infecciosas en Pequeños Animales*. (pp. 358). Buenos Aires: Editorial Panamericana.
- MacEwen, E. (2001). Transmissible venereal tumor. En: S.J. Withrow y E.G. MacEwen. *Small animal clinical oncology*. (3ª ed.). (pp. 651-656). Filadélfia: Saunders.
- MacLachlan, N., Kennedy, P. (2002). Tumors of the genital systems. En: D. J. Meuten. *Tumors in domestic animals*. (4ta ed.). (Cap. 11; pp.547-573). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Maffrand, C., Babini, S., Morilla, G., Benzoni, A., Galetto, M. (2012). *Manual de hábitos y procedimientos de trabajo seguro en el laboratorio de análisis clínico: información, la mejor prevención*. Río Cuarto: UniRío Editora.
- Maga, G., Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell. Sci.*: 116: 3051-3060.

- Marchal, T., Chabanne, L., Kaplanski, C., Rigal, D., Magnol, J. (1997). Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Vet. Immunol. Immunopathol.*: 57(1-2): 1-11.
- Mascarenhas, M., Peixoto, P., Ramadinha, R., Yamasaki, E., Costa, S., Driemeier, D., Sonne, L., França, N. (2014). Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*: 34(3): 250-254.
- Meinkoth, J., Cowell, R., Tyler, R., Morton, R. (2009). Recogida y preparación de muestras. En: R. Cowell, R. Tyler, J. Meinkoth, D. DeNicola. *Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato*. (3^a ed.). (pp 1-19). Barcelona: Elsevier Mosby.
- Mello Martins, M., Ferreira de Souza, F., Gobello, C. (2005). Canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. En: P. W. Concannon, G. England, J. I. Verstegen, C. Linde-Forsberg. *Recent advances in small animal reproduction*. Ithaca: NY: International Veterinary Information Service. Recuperado el 25 de Abril de 2005 en www.ivis.org.
- Mendoza Vergaray, N. (2006). Frecuencia del tumor venéreo transmisible en caninos: casuística del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (periodo 1998-2004). Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, E.A.P.de Medicina Veterinaria, Lima, Perú.
- Moulton, J. E. (1990). *Tumors of domestic animals*. (3^{ra} ed.). Berkley and Los Angeles: University of California Press.
- Mozos, E., Méndez, A., Gómez Villamandos, J., Martín De Las Mulas, J., Pérez, J. (1996). Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumour. *Vet. Pathol.*: 33: 257-263.
- Mukaratirwa, S., Gruys, E. (2004). Canine transmissible venereal tumor: cytogenetic origin, immunophenotype and immunobiology. *Vet. Quarterly.*: 25: 101- 111.
- Murchison, E. (2009). Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*. 27: 19-30. DOI:10.1038/onc.2009.350.
- Murgia, C., Pritchard, J., Kim, S., Fassati, A., Weiss, R. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*. 126: 477.

- Murray, M., James, H., Martin, W. (1969). A study of the cytology and kariotype of the canine transmissible venereal tumour. *Res. Vet. Sci.*: 10: 565.
- Nak, D., Nak, Y., Cangul, I., Tuna, B. (2005). A clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumor in the dog. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin Med*: 52(7): 366-370.
- Nelson, R., Couto, G. (2010). *Medicina interna de pequeños animales*. (4ta ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Nielsen, S. (1983). Classification of tumors in dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*: 19(1): 13-44.
- Nielsen, S., Kennedy, P. (1990). Tumors of the genital system. En: J. Moulton. *Tumors in domestic animals*. (3ra ed.). (pp. 498-502). Berkeley: University of California.
- Noda, C. (2008). Neoplasias bucales, breve reseña en perros y gatos. *Red. Vet.*: 9(2).
- Novinsky, M. (1876). Zur Frage ueber die Impfung der krebsigen Geschwuelste. *Zentralbl. Med. Wissensch.* 14: 790-791.
- Novinsky, M., Voprosu, O. Prívivanii zlokachestvennich nvoobrazovanií experimentalĭ noĭ ssledovanie. (Tesis) St. Petersburg. (1877). En: Flores, E.; Cattaneo, G.; Gonzalez, C.; Cepeda, R. (2000). Tumor venéreo transmisible. Aspectos históricos, epidemiológicos y terapéuticos. *Monografías de Medicina Veterinaria*: 20(1).
- Ortega, P., Acebedo, A., Sauri, A., Bolio G., Gutierrez, B. (2003). Prevalencia de tumor venéreo transmisible en perros callejeros en la ciudad de Mérida, Yucatán, México. *Rev. Biomédica*: 14(2): 83-87.
- Ostrander, E.; Davis, B.; Ostrander, G. (2015). Review transmissible tumors: breaking the cancer paradigm. *Trends Genet.*: 1-15 Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.001>
- Palomo Gonzalez, M., Pérez Requena, M., Rego González, M., López Nieto, Cañizares Benítez, C. (2002). Evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNORs) en neoplasias foliculares tiroideas. *Rev. Esp. Patol.*: 35(1): 95-100.
- Papazoglou, L., Koutinas, A., Plevraki, A., Tontis, D. (2001). Primary intranasal transmissible venereal tumour in the dog: A retrospective study of six spontaneous cases. *J. Vet. Med A.*: 48: 391-400.

- Park, M., Kim, Y., Kang, M., Oh, S., Cho, D., Shim, N., Kim, D. (2006). Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest.*: (18): 130-133.
- Perez, M., Itoiz, M. (2004). Marcadores histoquímicos de cancerización de campo en la mucosa bucal. *Revista de la Facultad de Odontología (UBA)*: 19(47): 9-13.
- Pich, A., Chiusa, L., Margaria, E. (2000). Relevancia pronóstica de AgNORs en patología tumoral. *Micron.*: 31(2): 133-41.
- Pineda, J., Romero, C., Mendoza, G., García, C., Plata, F., Martínez, A., Ramírez, N. (2010). Tumor venéreo transmisible en caninos del área metropolitana de la ciudad de México. *FCV-LUZ*: XX, (4): 362-366.
- Ploton, D., Bendayan, M., Adnet, J. (1983). Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins and nucleic acids in reticulated nucleoli. *Biol. Cell.*: 49: 29-34.
- Purohit, G. (2009). Canine transmissible venereal tumor. A review. *Int. J. Vet. Med.* 6(1).
- Ramirez Perez, Y., Reyes Avila, I., Rodriguez Valera, Y., Cuesta Guillén, A., Pérez Castro, L. (2011). Tumor venéreo transmisible en un perro mestizo y su respuesta a la quimioterapia citostática. *Redvet*: 12(6). Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060611.html>.
- Ramírez Bonilla, F., Sotto Gasca, L., Manjarres Gomez, N., Artunduaga Mellizo, L., Garcia Trujillo, R. (2015). Reporte de caso: tumor venereo transmisible en perro mestizo. *Red. Vet.*: 16(01). Recuperado de: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115.html>
- Raskin, R. (2010). Piel y tejido subcutáneo. En: *Citología canina y felina. Atlas en color y guía de interpretación*. (Cap 3, pp. 29-83). Barcelona: Gráfica In-Multimédica.
- Raskin, R., Meyer, D. (2010). Canine and feline cytology: A color atlas and interpretation guide. (2da ed.). United States: Saunders Elsevier.
- Rebbeck, C., Thomas, R., Breen, M., Leroi, A., Burt, A. (2009). Origins and evolution of a transmissible cancer. *Evolution*: 6: 2340-2349.
- Richardson, R. (1981). Canine transmissible venereal tumor. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*: 3: 951-956.
- Rocha, N., Tremori, T., Carneiro, J. (2014). Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of canine cutaneous transmissible venereal tumor. Case report. *Open J. Vet. Med.*: 4: 204-209.

- Rocher, A., Blanco, A., Palaoro, M. (2000). Utilidad de la técnica de AgNOR en la interpretación de los derrames de cavidades serosas. *Rev. Méd. Chile*: 128(9): 963-968.
- Rodríguez, L., Perales, R., Chavera, A., Gavidia, C., Díaz, D. (2010). Caracterización de las regiones organizadoras nucleolares en las células del tumor venéreo transmisible en caninos: estudio histoquímico. *Rev. Inv. Vet. Perú*: 21(1): 48-53.
- Rosciari, A., Merlo, W., Guaimás Moya, L., Báez, A., López, J., Macció, O. (2005). Graduación nuclear y determinación de regiones organizadoras de nucléolos en muestras citológicas de tumores mamarios caninos. *Red. Vet.*: 16(2): 65-68.
- Rogers, K. (1997). Transmissible venereal tumour. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*: 19(9): 1036-1045.
- Rogers, K., Walker, M., Dillon, H. (1998). Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Asso.*: 34(6): 463-470.
- Rowinsky, E., Donehower, R. (1996). Antimicrotubule agents. En: Gidding, C.; Kellie, S.; Kamps, W.; de Graaf, S. (1999). A Vincristine revisited. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*: 29: 267-287.
- Ruiz F., Alessi, A., Chagas, C., Pinto, G., Vassallo, J. (2005). Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41(4): 263-270.
- Said, R., Silva, L., Albuquerque, A., Sousa-Neta, E., Lavinsky, M. (2009). Efficacy and side effects of vincristine sulfate treatment on canine transmissible venereal tumor. En: Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress. (pp. 438). São Paulo, Brazil: WSAVC.
- Sain, M., Sharma, V. (2013). *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant). A review of potential therapeutic properties. *Int. J. Pure App. Biosci.*: 1(6): 139-142.
- Sanchis, G., Cristofolini, A., Taglialegna, A., Merkis, C. (2011). Porcine uterine extracellular matrix molecules throughout pregnancy. *Int. J. Morphol.*: 29(4): 1438-1443.
- Santos do Amaral, A., Bassani-Silva, S., Ferreira, I., Santos da Fonseca, L., Evangelista de Andrade, F., Jantzen Gaspar, L., Sousa Rocha, N. (2007). Cytomorphological characterization of transmissible canine venereal tumor. *RPCV.*: 102(563-564): 253-260.
- Santos, F., Guedes, R., Cassali, G. (1998). Nucleolar organizing regions (AgNORs) in genital and extra genital canine transmissible venereal tumor: P characterization and quantification. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*: 50(6).

- Santos, F., Moro, L., Cassali, G., Paixão, T., Campos, P., Silva, S., Vasconcelos, A. (2011). Marcadores de proliferação celular no tumor venéreo transmissível canino transplantado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*: 63(6).
- Santos, F., Vasconcelos, A., Moro, L., Nunes, J., Paixão, T. (2001). Apoptose no tumor venéreo transmissível canino: características morfológicas e evidência bioquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*: 53(5): 557-562.
- Santos, F., Vasconcelos, A., Nunes, J., Cassali, G., Paixão, T., Moro, L. (2005). O tumor venéreo transmissível canino. Aspectos gerais e abordagens moleculares (Revisão de literatura). *Bisci. J. Uberlândia*: 21(3): 41-45.
- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.*: Mar; 182(3): 311-22.
- Scott, W., Miller, H., Griffin, E. (2002). Tumores neoplásicos y no neoplásicos. En: Muller & Kirk. *Dermatología en pequeños animales*. (6ta ed.). (pp. 1409-1413). Buenos Aires, Argentina: Inter- Médica.
- Silva, M., Daleck, C., Ramos, R., De Nardi, A., Martins, M., Calazan, S., Eurides, D. (2007). Primary intranasal transmissible venereal tumor with bone lysis of the maxilla and metastasis. Case report. *Ars. Veterinaria*: 23(1): 054-058.
- Sirri, V., Roussel, P., Hernández, V. (2000). The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*: 31: 121-126.
- Sousa, J., Saito, A., Nardi, S., Rodaski, S., Guérios; Bacila, M. (2000). Características e incidência do tumor venéreo transmissível (TVT) em cães e eficiência da quimioterapia e outros tratamentos. *Archis. Vet. Sci. Brasil*: 5: 41-48.
- Stephens, F., Aigner, K. (2009). *Basics of oncology*. Springer-Verlag, Berlin: Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-92925-3_1.
- Sticker, A. (1906). Transplantables Rundzellensarkom des Hundes. *Z Krebsforsch*: 4: 227-314.
- Strakova, A., Murchison, E. (2014). The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC. Vet. Res.*: 3(10): 168.
- Sudjaidee, P., Theewasutrakul, P., Techarungchaikul, S., Ponglowhapan, S., Chatdarong, K. (2012). Treatment of canine transmissible venereal tumor using vincristine sulfate combined with L-

- asparaginase in clinical vincristine-resistant cases: a case report. *Thai. J. Vet. Med.*: 42: 117-122.
- Takahashi, M. (1985). *Atlas color citologia del cáncer*. (2da Ed). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Takano, Y., Okudaira, M., Harmon, B. (1993). Apoptosis induced by microtubule distupting drugs in cultured human lymphoma cells; inhibitory effects of phorbol ester and zinc sulphate. *Path. Res. Pract.*: 189: 197-203.
- Taussing, M. (1989). *Processes in Pathology and Microbiology*. (2da ed.). London: Blackwell Scientific Publications.
- Tella, M., Ajala, O., Taiwo, V. (2004). Complete regression of transmissible venereal tumor (TVT) in Nigerian Mondrel dogs with vincristine sulphate chemotherapy. *Afr. J. Biomed. Res.*: 7: 133-138.
- Thangathurai, R., Balasubramaniam, G., Dharmaceelan, S., Balachandran, P., Srinivasan, P., Sivaseelan, S., Manohar, B. (2008). Cytological diagnosis and its histological correlation in canine transmissible venereal tumour. *Veterinarski. Arhiv.*: 78(5): 369-376.
- Trerè D. (2000). AgNOR staining and quantification. Review. *Micron*: Apr; 31(2): 127-31.
- Trigo, F. (1993). *Patología general veterinaria*. (2da ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Trigo, F. (1998). *Patología sistémica veterinaria*. (3ra ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Tyler, R., Cowell, R., Baldwin, C., Morton R. (1999). Introducción: biopsia de masas con aguja fina. En R., Cowell, R., Tyler, J. Meinskoth. *Citología y hematología diagnóstica en el perro y el gato*. (2 ed). (pp. 1-19). Barcelona: Multimédica, Mosby Inc.
- Ulčar, I., Celeska, I., Ilievska, K., Atanaskova, E., Nikolovski, G., Trojačanec, P. (2012). Cytological diagnostic of canine transmissible venereal tumor. Case report. *Mac. Vet. Rev.*: 35(2): 91-96.
- Uma Rani, R., Pazhanivel, N. (2015). Rare Cases of Primary Canine Extragenital Transmissible Venereal Tumours. *Int. J. Adv. Vet. Sci. Technol.*: 4(1): 149-152.
- Unek, G., Ozmen, A., Kipmen Korgun, D., Turkay Korgun, E. (2011). Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochem.*: DOI:10.1016/j.acthis.2011.02.002.

- Varela, Y., Queiroz, G., Filgueira, K., Costa Reis, P., Reis Lima, R. (2013). Transmissible extragenital venereal tumor in impuberal canine. *Braz. J. Vet. Pathol.*: 6(3): 123-127.
- Vargas Gonzalez, D. (2008). Regiones organizadoras nucleolares como indicadores de pronóstico en tumores de células redondas del canino. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; Escuela de Ciencias Veterinarias. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131276/Regiones-organizadoras-nucleolares-como-indicadores-depron%C3%B3stico-en-tumores-%20de-c%C3%A9lulas-redondas-del-canino.pdf?sequence=1>
- Vermooten, M. (1987). Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. *S. Afr. Vet. Assoc.*: 58(3): 147-150.
- Vicente, F., Larrinaga, B., Soriano, P., Gómez, M., Lera, J. (1998). Estudio de factores pronósticos en carcinoma mamario en dos grupos de pacientes: Estadio 0 -21 casos- y Estadio II (con ganglios positivos) 42 casos. *Anales Sis. San Navarra*: 21(3): 139-146.
- Weir, E., Pond, M., Duncan, J. (1987). Extragenital located TVT tumor in the dog. Literature review and case reports. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*: 14: 532-536.
- Willis, R. A. (1952). *The spread of tumours in the human body*. Recuperado de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Neoplasia>.
- Withrow, S., Mac Ewen, E. (1996). *Small animal clinical oncology*. (2 ed.). Philadelphia: WB Saunders Co. USA.
- Yang, T. (1988). Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma (Review). *Anticancer Res.*: 8: 93-96.
- Yang, T., Chandler, J., Dunne Anway, S. (1987). Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. *Br. J. Cancer*: 55: 131-134.
- Yasdi, I., Taghavi, N. (2005). The assessment of AgNORs in grading of head and neck non-Hodgkin's lymphoma. *Arch. Iranian Med.*: 4: 282-285.
- Zaldívar Quintero N., Puebla Domínguez H., Ferrales Zaldívar Y., Almaguer Pérez Y., Vaillant Valiente, Y. (2002). Importancia de las neoplasias en los animales domésticos. Neoplasias diagnosticadas en los centros de epizootiología y diagnóstico veterinario de Guantánamo y Granma, Cuba. *Rev. Prod. Anim.*: 14(1): 51-53.