

## APOPTOSIS EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE DEL CANINO EN FASE DE CRECIMIENTO PROGRESIVO Y DURANTE REGRESIÓN INDUCIDA POR VINCRISTINA

### APOPTOSIS IN CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN PROGRESSIVE GROWTH PHASE AND DURING REGRESSION INDUCED BY VINCRISTINE

CARLOS GONZÁLEZ<sup>1</sup>, RAQUEL CEPEDA<sup>2</sup>, ESTEFANÍA FLORES<sup>3</sup>, GINO CATTANEO<sup>3</sup>, SUSANA REYES<sup>1</sup>

#### SUMMARY

*Apoptosis or programmed cell death is a mechanism of cell elimination when they are unnecessary or genetically damaged. It is controlled by a variety of genes, many of which present mutation or dysfunction associated to cancer. When this occurs patients have more aggressive tumors. A characteristic DNA fragmentation occurs during apoptosis which can be traced and enzymatically revealed by TUNEL (terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling) technique. This allows early apoptosis detection even before the first morphologic nuclear changes take place. In this work 10 adult canine with genital TVT were selected to undergo one single dose (0.03mg/Kg) Vincristine sulphate treatment, in order to induce tumor regression. Histological samples were obtained and processed for TUNEL immune staining. Images were digitalized and analyzed by a morphometric software (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). The mean area obtained for apoptotic cells was  $51.3 \pm 37.9 \mu\text{m}^2$  and  $1396 \pm 828.6 \mu\text{m}^2/200X$  field, for progressive and regressive growth, respectively. This indicates a significant difference between both phases ( $p < 0.0001$ ). The main cell type for both tumor stages corresponded to tumor cells with 80,7% for progressive and 89,4% for regressive growth, resulting in a significant augmentation for this latter tumor stage ( $p < 0.001$ ). This results indicate that vincristine induces TVT to collapse through apoptosis. The exact underlying mechanism remains to be demonstrated, however in other neoplasms caspases 9 and 3 activation has been described suggesting that the mitochondrial way is involved, through oxygen derived radical production and Bcl-2 gene overexpression.*

**KEY WORDS:** Apoptosis, TVT, Vincristine, Morphometric analysis, TUNEL.

**PALABRAS CLAVE:** Apoptosis, TVT, Vincristina, Análisis morfométrico, TUNEL.

#### INTRODUCCIÓN

Las células del cáncer se diferencian de las normales por su crecimiento incontrolable, capacidad

de producir metástasis, pérdida de la diferenciación celular y resistencia farmacológica.

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

El objetivo de la apoptosis o muerte celular programada es la eliminación de células del huésped, que ya no son necesarias, a través de la activación de una serie coordinada y programada de acontecimientos internos (Cotran *et al.*,

<sup>1</sup> Dpto. Patología Animal, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile. dcgonzal@uchile.cl.

<sup>2</sup> Dpto. Cs. Básicas, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile. Casilla 2, Correo 15, La Pintana.

<sup>3</sup> Dpto. Cs. Clínicas, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, U. de Chile. Casilla 2, Correo 15, La Pintana.

2000) y puede ser gatillada por una gran variedad de estímulos externos.

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

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

La vía mitocondrial o intrínseca es gobernada por la familia Bcl-2 de proteína (Reed, 2000), que juega un importante rol en la apoptosis ésta incluye a miembros proapoptóticos y antiapoptóticos (homólogos de los genes de muerte celular en nematodos). Los miembros proapoptóticos de Bcl-2 se componen por Bcl-2, Bcl XI, Bcl-w, Bfl-1, Bra-1, A1, los miembros antiapoptóticos son Bax, Bak, Bcl-xs, Ba, bid, Bik, Hrk (Hockenbery DM, 1994; Yang y Korsmeyer, 1996; White E, 1996; Middleton *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2003).

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

dañan el ADN, hipoxia y activación de oncogenes. Esta respuesta protege a la célula de la transformación neoplásica (Burns y El-Deiry, 1999).

No es sorprendente entonces que la pérdida de p53 se describa en casi todos los tumores o que el gen esté mutado en sobre el 50% de los tumores (Holstein *et al.*, 1991). Los pacientes que presentan mutación en p53, usualmente, tienen peor pronóstico en términos de respuesta a la terapia antitumoral (Brown y Wouters, 1999). Tumores con mutación en p53 pueden ser más anaplásicos, tener una mayor proporción de células en proliferación, pueden ser más metastásicos y en general son más agresivos fenotípicamente (Elledge, 1996).

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

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

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

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

Con esta técnica se pueden detectar estados tempranos de apoptosis, incluso antes que el núcleo experimente los primeros cambios morfoló-

gicos (Atanasio y Schiffer, 1995; Chapman *et al.*, 1995).

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

El T.V.T. se caracteriza por presentar una fase de crecimiento progresivo muy acelerado con la formación de una masa tumoral importante y gran destrucción tisular local asociada. Sin embargo, el tratamiento quimioterapéutico con sulfato de Vincristina, a diferencia de lo que ocurre en otras neoplasias, logra no sólo detener el crecimiento, sino que además induce la regresión de la masa tumoral hasta su completa desaparición (Mozos, 1996). La Vincristina es un alcaloide derivado de la Vinca, que inhibe la etapa de metafase de la mitosis (Booth, 1994).

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

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### *Animales*

Se obtuvieron muestras de tumores venéreos transmisibles de ubicación genital de 10 caninos adultos de entre 1 a 10 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, que presentaron una masa tumoral

detectada clínicamente en el Servicio de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Tabla 1).

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

#### *Tratamiento*

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

#### *Inmunohistoquímica*

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

Los componentes que provee el kit ApopTag han sido diseñados para marcar los extremos libres 3-OH del ADN, con nucleótidos marcados. Estos nucleótidos son adheridos al ADN por medio de una enzima denominada, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Schmitz *et al.*, 1991; Gavrieli *et al.*, 1992), TdT cataliza, independiente de la temperatura, la adición de un nucleótido trifosfato al extremo 3-OH de una hebra doble o simple de ADN. La incorporación de nucleótidos forma un oligómero compuesto de nucleótidos marcados con

TABLA 1  
DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES EN ESTUDIO

N° del caso	Sexo	Edad	Raza	Curso de la enfermedad	Ubicación
Caso 1	H	+ de 2ª	Mestizo	+/- 3m	Vulva
Caso 2	H	1 a 2m	Mestizo	+/- 20 días	Vulva
Caso 3	M	3 A	Mestizo	+/-1 m	Pene
Caso 4	H	6 A	Mestizo	+/-2 m	Vulva y Vagina
Caso 5	H	2 A	Mestizo	+/- 1 m	Vagina
Caso 6	M	1 a 3 m	Mestizo	+/- 5 m	Pene y Prepucio
Caso 7	H	10 A	Cocker	+/- 3 m	Vagina
Caso 8	M	8 A	Mestizo	+/- 6 m	Prepucio y Pene
Caso 9	M	6 A	Siberiano	+/-4 m	Pene y Prepucio
Caso 10	H	5 A	Mestizo	5 días	Vaginal y Vulvar

digoxigenina y nucleótidos no marcados, en una secuencia al azar. La relación de nucleótidos marcados con no marcados en ApopTag es optimizada para promover la posterior unión al anticuerpo antidigoxigenina.

El anticuerpo antidigoxigenina usado en este kit, es un anticuerpo policlonal de oveja purificado, este anticuerpo exhibe menos del 1% de reactividad cruzada. La porción Fc del anticuerpo ha sido removida por medio de digestión proteolítica para eliminar cualquier unión no específica de los receptores celulares Fc.

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

## 2. Métodos

### *Obtención de muestra*

Se obtuvieron de todos los pacientes biopsias que se fijaron en formalina y que se procesaron para el estudio histológico descriptivo y morfométrico en TVT progresivo y regresivo.

### *Diagnóstico citológico*

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

### *Biopsias tumorales*

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

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

### **Evaluación de los resultados**

Este estudio consideró un análisis cuantitativo de los cambios regresivos en células neoplásicas a ni-

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

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

### **Análisis estadístico**

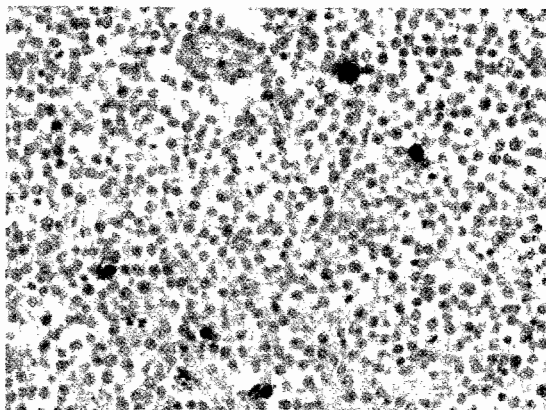
Los valores obtenidos en la fase progresiva del tumor fueron comparados con los de la fase regresiva mediante el empleo de la prueba de t para muestras asociadas para las variables de áreas de apoptosis (inmunomarcadas) y distribución celular.

## RESULTADOS

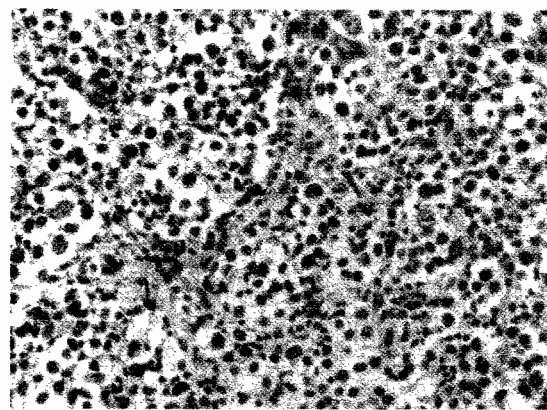
### ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE TVT EN FASES PROGRESIVA Y REGRESIVA

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

La morfología nuclear y citoplasmática de las células, en el tejido tumoral, fue cuidadosamente observada a diferentes magnificaciones (200X a 1.000X). En células en estados tempranos de apoptosis, se observó marginación de la cromatina nuclear. En células en estados más avanzados se apreció condensación del núcleo junto a encogi-



**Figura 1a.** TVT en fase progresiva de crecimiento tumoral. Inmunotinción para apoptosis con ApopTag®. 200X.



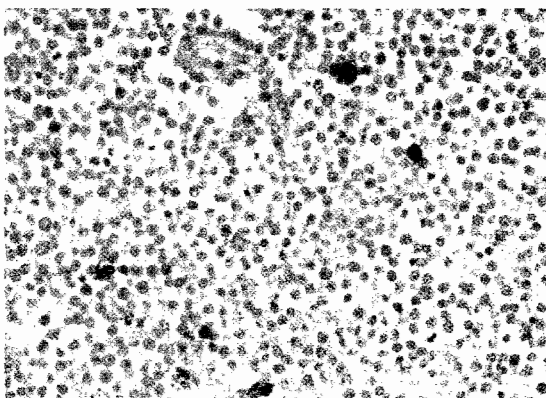
**Figura 2a.** TVT en fase regresiva inducida por tratamiento con Vincristina. Inmunotinción para apoptosis con kit ApopTag®. 200X.

miento citoplasmático, indicado por un claro espacio que rodea a la célula. Finalmente, se observó la presencia de cuerpos apoptóticos, en el espacio extracelular o dentro de células fagocíticas. La mayor parte de estos hallazgos morfológicos coincidió con inmunoreactividad positiva, observándose en forma muy ocasional, algunos cuerpos apoptóticos sin inmunotinción. Por otro lado, es interesante destacar que se observó gran cantidad de núcleos inmunoteñidos, sin evidencias de alteraciones morfológicas.

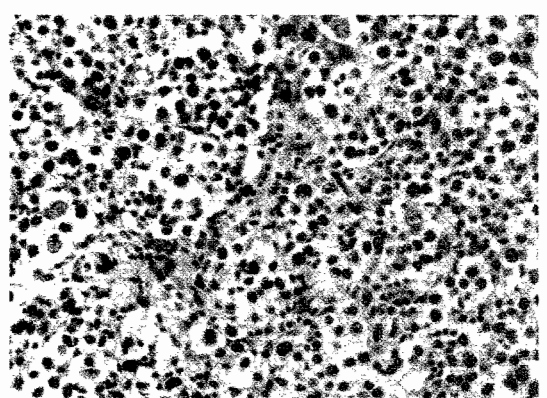
Con ayuda de la inmunomarcación se realizó un recuento del área correspondiente a la población celular en apoptosis. Para cumplir este objetivo

se digitalizaron las imágenes de 5 campos de 200X por muestra, obteniendo un valor promedio para el área inmunoteñida, previa marcación morfométrica (ver Figs 1b y 2b).

En general se observó una inmunomarcación, para apoptosis, más bien ocasional, de células aisladas, en la fase de crecimiento progresivo (Fig. 1a), contrastando con una intensa inmunotinción en tejidos de TVT en fase regresiva, involucrando muchas células que no presentaban aun cambios morfológicos asociados a apoptosis (Fig 2a). La Figura 3 muestra el área promedio correspondiente a la fracción de células apoptóticas, la que fue de  $51.3 \pm 37.9 \text{ mm}^2$  y  $1396 \pm 828.6 \text{ mm}^2$ , por campo de



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



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

FIGURA 3  
APOPTOSIS EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE

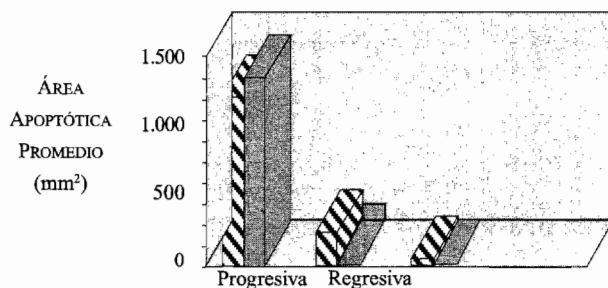
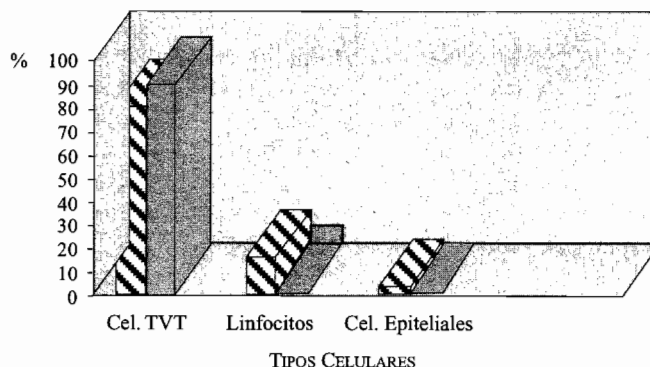


FIGURA 4  
DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS SEGÚN TIPO CELULAR Y FASE DE CRECIMIENTO CELULAR



200X, para fase progresiva y regresiva respectivamente, indicando que estadísticamente existe una diferencia significativa entre ambas fases ( $p < 0.0001$ ).

#### DISTRIBUCIÓN CELULAR

En la Figura 4 se muestra la distribución porcentual, según tipo celular, dentro de la población apoptótica. Se estudiaron 10 muestras de TVT en su fase de crecimiento progresivo y luego durante la regresión inducida con sulfato de Vincristina. El tipo celular principal dentro de la población apoptótica, en ambas fases correspondió a células tumorales con un 80.7% para fase progresiva y 89.4% para fase regresiva. Mientras, que los linfocitos representaban un 16.1% y 8.4%, en las fases progresiva y regresiva, respectivamente. Las epiteliales constituían sólo un 3.2% en fase progresiva y 2.2% en fase regresiva.

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

#### DISCUSIÓN

En este estudio se observó, como cambios morfológicos apoptóticos tempranos, la marginación de la cromatina nuclear. Como cambios intermedios apareció condensación del núcleo junto a encogimiento citoplasmático, indicado por un espacio claro que rodea a la célula. Como estados más avanzados aparecieron los cuerpos apoptóticos que se encontraron en el espacio extracelular o dentro de células fagocíticas.

TABLE 2  
DISTRIBUCIÓN DE TIPOS CELULARES APOPTÓTICOS EN TVT  
EN FASE PROGRESIVA DE CRECIMIENTO Y EN REGRESIÓN

<i>Fase tumoral</i>	<i>% Progresiva</i>	<i>% Regresiva</i>
n =	10	10
Células TVT	80.7 <sup>a*</sup>	89.4 <sup>b</sup>
Linfocitos	16.1 <sup>a</sup>	8.4 <sup>b</sup>
Células epiteliales	3.2 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>

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

\*= letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes.

Estos cambios morfológicos concuerdan con los descritos por otros autores para apoptosis (Kerr y Harmon, 1991; Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Además, estos cambios coincidieron con inmunorreactividad positiva para la técnica ApopTag.

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

ApopTag® distingue apoptosis de necrosis por una detección específica de fragmentos de ADN y condensación de la cromatina asociados con apoptosis (Gold, 1994). En algunos casos, aunque morfológicamente es posible distinguir estructuras celulares como cuerpos apoptóticos, estos puede que no se tiñan, debido a que algunos no contienen material nuclear (Perry, *et al.* 1997). Sin embargo, esta subestimación es pequeña y no parece ser importante, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó sólo en forma ocasional la presencia de cuerpos apoptóticos negativos a la inmunotinción. De todos modos, es

importante evaluar las tinciones en conjunto con criterios morfológicos, para considerar este tipo de situaciones.

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

Se ha visto que el TVT en fase de crecimiento progresivo presenta mayor índice apoptótico que otras neoplasias del canino (Guvenc *et al.*, 2002). En este estudio, el marcado aumento de apoptosis observado en relación a la regresión tumoral inducida por Vincristina, es concordante con la dramática y exitosa desaparición de la masa tumoral observada a nivel clínico con este tratamiento. Se destaca una diferencia notoria con otros tipos de neoplasia que, en general, presentan una respuesta parcial frente al tratamiento con quimioterapia. Esto sugiere que en TVT probablemente no se encuentren afectados los genes involucrados en la inducción de apoptosis, lo cual difiere de otras neoplasias donde, generalmente, se encuentran afectados miembros de la familia Bcl-2 y el gen supresor tumoral p53 (Holstein *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1996). Sin embargo, recientemente se ha informado de una mutación

puntual del nucleótido 964 (T-C) resultando en el cambio de aminoácidos (Phe-Ser) de la proteína supresora tumoral p53 (Choi y Kim, 2002). Esto difiere de las observaciones clínicas que indican que los pacientes que presentan mutación en p53, usualmente, tienen peor pronóstico en términos de respuesta a la terapia en una gran variedad de tumores (Brown y Wouters, 1999). Tumores con mutación en p53 pueden ser más anaplásicos, tener una mayor proporción de células en proliferación, ser más metastásicos y, en general, son más agresivos fenotípicamente (Elledge, 1996).

Este estudio indica que durante la fase regresiva del TVT, inducida por Vincristina, las células tumorales entrarían en apoptosis llevando al colapso de la masa tumoral, quedando sólo una matriz fibrosa (González *et al.*, 2000). Algunos estudios han sugerido que al menos algunas células del TVT presentarían una suerte de transformación fibroblástica en la fase regresiva del TVT. Sin embargo estudios recientes (Liao *et al.*, 2003) han utilizado la técnica de PCR *in situ* para marcar células de TVT a través de la detección del elemento nuclear denominado LINE (A long interspersed nuclear element) que se inserta constante y exclusivamente en el terminal 5' del gen c-myc de las células de TVT, por fuera del primer exon. Como el largo total del gen LINE insertado no es constante, se han usado primers para cubrir sólo un segmento estable de 0.55kb. Ninguna célula de morfología fibroblástica tanto de fase progresiva como regresiva reaccionó con esta sonda genética específica para células de TVT.

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

## REFERENCIAS

- ALNEMRI ES, LIVINGSTON DJ, NICHOLSON DW, SALVESEN G, THORNBERRY NA, WONG WW, YUAN J. 1996 Human ICE/ CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87:171.
- AOUDJIT F; VUORI K 2001. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 16;20(36):4995-5004.
- ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WYLLIE, A.H., 1990. Apoptosis: the role of endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136:593-608.
- ATTANASIO, A., SHIFFER, D., 1995. Ultrastructural detection of DNA strands breaks by in situ end- labelling techniques. *Journal of Pathology*, 176:27-35.
- BELHOSSINE R; MORJANI H; GILLET R; PALISSOT V; MANFAIT M., 1999. Two distinct modes of oncoprotein expression during apoptosis resistance in vincristine and daunorubicin multidrug-resistant HL60 cells. *Adv Exp Med Biol* 457:365-81.
- BOOTH M. J., 1994. Canine transmissible venereal tumour and ovarian papillary cystadeno-carcinoma in a bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 35: 39-42.
- BROWN JM, WOUTERS BG. 1999. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Research*, 59: 1391-1399.
- BURNS T Y EL-DEIRY W.1999. The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular Physiology*, 181: 231-239.
- BURSCHE, W., KLEINE, L., TENNISWOOD, M., 1990. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, (London) 11:847-853.
- CHAPMAN, R.S, CHERSTA, C.M, HERBERG, A.A, BEERE, H.M., WHETTON, A.D., HICKMAN, J.A., DIVE, C., 1995. Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. *Cytometry*, 20:245-256.
- CHOI YK; KIM CJ., 2002. Sequence analysis of canine LINE-1 elements and p53 gene in canine transmissible venereal tumor. *J Vet Sci* 3(4):285-92
- COTRAN R., KUMAR V., COLLINS T., 2000 Patología estructural y funcional. 6ª Edición Mc Graw Hill, págs. 19-27.
- DARZYNKIEWICZ, Z., JUAN, G., LI, X., GORCZYCA, W.MURAKAMI, T., TRAGANOS, F., 1997. Cytometry in cell microbiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27: 1-20.
- ELLEDGE R. M., 1996. Assessing p53 status in breast cancer prognosis: where should you put the thermometer if you think your p53 sick?. *J Natl Cancer Inst* 88:141-143.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501.
- GONZÁLEZ CM; GRIFFEY SM; NAYDAN DK; FLORES E; CEPEDA R; CATTANEO G; MADEWELL BR., 2000. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J Comp Pathol* 122(4):241-8.
- GONZALEZ C; CEPEDA R; FLORES E; CATTANEO G; COLARTE, K., 2002. Separación y purificación de células del tumor venéreo transmisible canino espontáneo, en gradiente de densidad de polisucrosa y diatrizoato de sodio. *Av Cs Vet* 17:18-23.
- GORCZYCA, W., GONG, J., DARZYNKIEWICZ, Z., 1993. Detection of DNA strandsbreaks in individual apoptotic cells by in situ



- terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Research*, 53: 1-7.
- GRONINGER E; MEEUWSEN-DE BOER GJ; DE GRAAF SS; KAMPS WA; DE BONT ES., 2002. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int J Oncol* 21(6):1339-45.
- GREEN DR, REED JC., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281:1309-1312.
- GUVENC T; HALIGUR M; ORMAN MN; HAZIROGLU R., 2002. Mitosis and apoptosis in canine cutaneous histiocytoma and transmissible venereal tumour. *Acta Vet Hung* 50(3):315-21.
- HILL D, YANG T, WATCHEL A., 1984. Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. *Veterinary Pathology*, 21: 39-45.
- Hockenbery DM 1994. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci*, 18(Suppl):51-55
- HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOLGESTEIN B, HARRIS CC., 1991. p. 53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49-53.
- HOU Q; CYMBALYUK E; HSU SC; XU M; HSU YT., 2003. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: Roles in cytochrome c release and Bax regulation. *Apoptosis* 8(6):617-29.
- KERR, J.F.R., HARMON, B.V., 1991. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. Apoptosis: molecular basis of cell death, chapt. 1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 5-29.
- KORSMEYER, S ; ZINKEL, S., 2001. Molecular biology of cancer: apoptosis. *Cancer Principles & Practice of Oncology* 6<sup>o</sup> Ed; 7: 111.
- LIAO KW; LIN ZY; PAO HN; KAM SY; WANG FI; CHU RM., 2003. Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element. *J Vet Diagn Invest* 15(5):399-406.
- LOMBARDI C., 1995. Evaluación del tratamiento quimioterapéutico con vincristina en la regresión del tumor venéreo transmisible canino espontáneo y su efecto sobre la respuesta inmune antitumoral. *Tesis Magister, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile*: 48- 50.
- LÓPEZ M., LEYGTHON C., GRAF M. (1982). Técnicas de laboratorio para citología e histopatología. Edit. Dpto. Biología celular y genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2ª edición. Pág 104-111.
- MC GILL G., FISHER D., 1997. Apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy. *Frontiers in bioscience*, 2: 353-379
- MIDDLETON G; COX SW; KORSMEYER S; DAVIES AM., 2000. Differences in bcl-2- and bax-independent function in regulating apoptosis in sensory neuron populations. *Eur J Neurosci* 12(3):819-27.
- MIGHELLI, A.M., BISSONNETTE, R. SCHIFFER, D. 1995. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by in situ end labelling techniques. *Journal of Pathology*, 176: 27-35.
- MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ- VILLAMANDOS, J. C.; MARTÍN DE LASMULAS, J. & PÉREZ, J. (1996). Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Vet. Pathol.* 33: 257- 263.
- OLTRA, O. (1999). Respuesta inmune celular frente al tumor venéreo transmisible del canino en fase progresiva y regresiva. Memoria de título. Santiago-Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 70 p.
- PERRY, S.W., EPSTEIN, L.G., GELBARD, H.A., 1997. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Bio Techniques*. 22:1102-1106.
- REED J.C, MIYASHITA T, TAKAMAYA S, WANG H.G, SATO T, KRAJEWSKI S, AIME-SEMPE C, BODRUG S, KITADA S, HANADA M., 1996. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem*, 60: 23-32.
- REED, J., 2000 Mechanism of apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157:1415-1430.
- RUDIN C M, THOMPSON C B., 1997. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med*. 48: 267-281.
- SALVESEN GS, DIXIT VM. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- SCHMITZ, G.G., WALTER, T., SEIBL, R., KESSLER, C., 1991. Nonradioactive labelling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.*192: 222-231.
- SEKI K; YOSHIKAWA H; SHIKI K; HAMADA Y; AKAMATSU N; TASAKA K., 2000. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 45(3):199-206.
- SIÖSTRÖM, JY BERGH, J. 2001 How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ*; 322: 1538-1539.
- SOINI Y; PAAKKO P., 1999. Apoptosis and expression of caspases 3, 6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *APMIS* 107(11): 1043-50.
- THIRY, M., 1992. Highly sensitive immunodetection of DNA on sections with exogenous terminal deoxynucleotidyl transferase and non-isotopic nucleotide analogs. *Journal of Histochem Cytochem*. 40: 411-419.
- WANG LG; LIU XM; KREIS W; BUDMAN DR., 1999. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 44(5):355-61.
- WEINBERG, 1996. Así se produce el cáncer: las bases moleculares del cáncer salen a la luz y sugieren nuevas aproximaciones terapéuticas. *Investigación y ciencia* 242: 10-18.
- WHITE E., 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development*, 10: 1-15.
- WISMAN, J.H., JONKER, R.R., KEIJZER, R., VAN DE VELDE, C.J.H., CORNELISSE, C.J., VAN DIERENDONK, J.H., 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem*. 41: 7-12.
- YANG E, KORSMEYER SJ., 1996: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88:386-401.
- YUAN J., 1997. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 9: 247-251.