

UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUIMICA DE SUBPOBLACIONES
LINFOCITARIAS EN LA REGRESION TUMORAL DE PACIENTES SOMETIDOS
A QUIMIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO DEL TUMOR VENEREO
TRANSMISIBLE CANINO**

JUAN CARLOS RAMIREZ ANTE

Tesis presentada a la Universidad de
Caldas como parte de los requisitos del
programa de Maestría en Ciencias
Veterinarias para la obtención del título de
Magister

Orientador: Prof. Francisco Javier
Pedraza Ordoñez

Manizales-Caldas

2021

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios que me permitió recorrer este camino y desarrollar con la mayor fortaleza esta meta académica.

A mis dos madres Rosa y Odilia por tanto apoyo y ejemplo, sin ellas nada de esto sería posible.

A mis familiares, hermano y hermana que siempre están alentándome en todo momento de cerca o a la distancia.

A mi novia Luisa Fernanda que siempre está a mi lado en las luchas, los retos y metas trazadas.

Al Dr. Francisco Javier Pedraza por el gran apoyo en mi proceso de formación profesional, no solo en su figura de director de este trabajo sino como mi mentor académico a quien agradezco toda su colaboración y enseñanzas constantes.

A la Dra. Mirela Tinucci Costa por sus excelentes aportes e ideas, además de toda la colaboración con el procesamiento inmunohistoquímico de las muestras.

A la Dra. Elizabeth Proby Murchison, Andrea Strakova y los demás integrantes del grupo de Cáncer Trasmisible en Cambridge/UK, por su inmenso apoyo en la confirmación diagnóstica que permitió ampliar mis conocimientos en este tema, además de hacer posible mi sueño de realizar una pasantía y conocer más de cerca sus increíbles trabajos de investigación. Gracias por tan inolvidable experiencia.

A mis compañeros de maestría Andres fernandez Riomalo, Carolina Mejía y Juliana Álzate por tantos consejos y aportes en las diferentes etapas de la ejecución de este trabajo.

A los estudiantes integrantes del semillero de patología, por el cuidado constante de los pacientes que hicieron parte de este proyecto garantizando su bienestar.

A Diana Chica y Orlando Castro personal de apoyo del laboratorio de Patología animal de la Universidad de Caldas quienes ayudaron a garantizar el procesamiento y preservación de las diferentes muestras.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCION.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3. JUSTIFICACION.....	12
4. MARCO TEORICO.....	13
4.1 Tumor venéreo trasmisible canino.....	13
4.2 TVTC y la búsqueda de su origen.....	14
4.3 Distribución del TVTC.....	15
4.4 Diagnóstico del TVTC	16
4.4.1 Citología.....	16
4.4.2 Histopatología.....	17
4.4.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	18
4.5 Inmunohistoquímica.....	19
4.6 Tratamiento.....	20
4.7 Respuesta inmune contra el TVTC.....	20
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo General.....	23
5.2 Objetivos Específicos.....	23
6. MATERIALES Y METODOS.....	24
6.1 Comité de Ética.....	24
6.2 Procedimientos y Manejo de Animales.....	24
6.3 Diagnostico TVTC.....	25
6.4 Colecta y procesamiento de muestras.....	27
6.5 Análisis histopatológico.....	27
6.6 Análisis Molecular	29
6.6.1 Extracción de ADN.....	29
6.6.2 PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).....	29
6.7 Inmunohistoquímica CD3, CD8 y CD79.....	31
6.7.1 Validación de la marcación.....	32
6.8 Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Datos epidemiológicos, clínicos y respuesta al tratamiento.....	36
7.2 Examen citológico.....	38
7.3 Respuesta al tratamiento.....	38
7.4 Clasificación histopatológica.....	38

7.5 Análisis molecular qPCR.....	39
7.5.1 Detección LINE-1/c-myc.....	39
7.5.2 Detección CDKN2A.....	39
7.6 Expresión Inmunohistoquímica.....	42
7.6.1 Marcación porcentual CD3, CD8 y CD79.....	42
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIONES.....	51
10.REFERENCIAS.....	52
11.ANEXOS.....	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos iniciadores utilizados en la qPCR para LINE-1/c-myc y CDKN2A.....	30
Tabla 2. Panel anticuerpos marcación Inmunohistoquímica.....	32
Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes de TVTC tratados e incluidos en este estudio.....	37
Tabla 4. Promedios de porcentaje de marcación CD3, CD8 y CD79.....	43
Tabla 5. Comparación fases histopatológicas y marcación inmunohistoquímica.....	44
Tabla 6. Comparación respuesta al tratamiento y marcación inmunohistoquímica.....	45
Tabla 7. Comparación respuesta lenta y marcación inmunohistoquímica.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto macroscópico del TVTC genital.....	14
Figura 2. Respuesta quimioterapéutica usando vincristina del TVTC en una hembra canina.....	25
Figura 3. Características citomorfológicas del TVTC.....	26
Figura 4. Clasificación histopatología del TVTC.....	28
Figura 5. Diagnóstico de TVTC usando qPCR.....	31
Figura 6. Marcación Inmunohistoquímica CD3, CD8 Y CD79.....	34

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1. Número de casos por fases de clasificación histopatológica.....	39
Gráfico 2. Graficas de la detección de reordenamiento LINE-1/c-myc del gDNA de las diferentes muestras procesadas por la técnica qPCR.....	40
Gráfico 3. Graficas de la detección de CDKN2A del gDNA de las diferentes muestras procesadas por la técnica qPCR.....	41
Gráfico 4. Distribución promedios porcentuales de marcación inmunohistoquímica de los anticuerpos CD3, CD8 y CD79 antes y durante el tratamiento quimioterapéutico.....	42

RESUMEN

El tumor venéreo transmisible canino es uno de los tres cánceres transmisibles observados en mamíferos, siendo un cáncer contagioso que se transmite naturalmente entre perros mediante una transferencia alogénica de células neoplásicas vivas principalmente en el momento del coito. Se ha estimado que este tumor transmisible surgió hace 11.000 años y a partir de ese momento empezó su viaje a colonizar el mundo, hasta el día de hoy mostrando una distribución mundial sustentada en reportes de caso en los cinco continentes. Estas células al momento de implantarse pueden evitar la respuesta inmune del hospedero escapándose de la barrera del complejo mayor de histocompatibilidad. Mostrando una actividad inmunológica diferente en sus fases de progresión y regresión. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones linfocitarias en la regresión tumoral de pacientes sometidos a quimioterapia como tratamiento del tumor venéreo transmisible canino, la relación que pueda existir con la respuesta al tratamiento y la fase histopatológica en que se encuentre antes y durante la tercera semana de tratamiento. Para el presente estudio se utilizaron fragmentos de TVTC 24 caninos antes de iniciar quimioterapia con sulfato de Vincristina, igualmente se tomaron 15 fragmentos durante la tercera semana posterior inicio de tratamiento antes de la aplicación de la cuarta sesión de quimioterapia. Se realizó inmunohistoquímica para la expresión de anticuerpos CD3, CD8 y CD79 de las muestras de TVTC obtenidas. CD3 y CD8 mostraron aumento en la expresión en comparación con CD79, principalmente en los pacientes que requirieron un número más elevado de sesiones de quimioterapia, además, se observó mayor expresión de CD8 en las muestras en la fase de regresión y disminución significativa en la marcación de CD3 y CD8 durante el tratamiento sugiriendo que el uso de sulfato de vincristina puede afectar la respuesta inmunológica intratumoral del TVTC. Desde su primer reporte hace cerca de 140 años el TVTC ha despertado el interés de científicos convirtiéndolo en un modelo de estudio de comportamiento, desarrollo, inmunología y origen del cáncer en animales.

Palabras claves: Cáncer transmisible; Perro; Alogénico; Complejo Mayor de Histocompatibilidad; Reordenamiento genómico; Neoplasia, Quimioterapia.

1. INTRODUCCION

El tumor venéreo transmisible canino (TVTC), Tumor Facial del Demonio de Tasmania (DFTD por sus siglas en Ingles) y sarcoma del Hámster Sirio Dorado son los únicos ejemplos actuales de tumores transmisibles que afectan mamíferos. TVTC y DFTD se propaga como un aloinjerto trasmisible de manera natural a través de transferencia directa de las células cancerígenas (Ostrander, Davis, and Ostrander 2016), mientras que el sarcoma del Hámster Sirio Dorado se transmite por inoculación experimental de colonias de laboratorio y por medio de picaduras de mosquito que cumple la función de vector (Banfield, W. G., Woke, P. A., MacKay, C. M., & Cooper 1965). TVTC tuvo sus primeras descripciones y reportes en el siglo XIX, documentándose en la ciudad de Londres como uno de los dos únicos tipos de cáncer que afectaba al perro (Blaine, 1810) y el primer trasplante experimental exitoso fue en 1876 realizado por (Nowinsky, 1876), quien además lo definió como un tumor histiocítico. Este cáncer contagioso se transmite de manera horizontal por el contacto directo entre las células neoplásicas presentes en el tumor y las mucosas erosionadas de otro individuo de la misma especie (Ganguly, Das, and Das 2013), evadiendo la respuesta inmunológica linfocitaria y la barrera del complejo mayor de histocompatibilidad, quien es el encargado de reconocer lo propio como propio y lo extraño como extraño (Belov 2011). Los principales momentos en que el contagio puede llegar a darse son el coito, lamido y olfateo (Das and Das 2000). Este tumor transmisible también es conocido como sarcoma venéreo, tumor de sticker, granuloma venéreo o sarcoma infeccioso. Afecta a caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) de ambos sexos sin importar la raza, además de algunos perros salvajes sociales como el lobo gris (*Canis lupus*) y el coyote (*Canis latrans*) (vonHoldt and Ostrander 2006), mostrando una alta incidencia en la población canina callejera por falta de control reproductivo. TVTC es uno de los tumores de células redondas cuyo diagnóstico final se realiza a partir de los hallazgos citológicos, clínicos e histológicos (Duncan and Prasse 1979), la citología al ser una técnica rápida y poco invasiva es el método de elección en el diagnóstico de casos sospechosos (Amaral et al. 2007), la evaluación histológica no

solo permite mayor precisión diagnóstica en algunos pacientes sino que además para el caso del TVTC ha permitido clasificar las fases de su desarrollo tumoral en progresión, regresión temprana y regresión tardía (Mukaratirwa and Gruys 2003), igualmente en algunos casos atípicos donde se dificulta el diagnóstico se pueden utilizar pruebas moleculares como el PCR (reacción en cadena de polimerasa) amplificando un reordenamiento genómico que solo existe en las células de TVTC llamado LINE-MYC, considerándose una herramienta útil de confirmación diagnóstica (Castro et al. 2017). Algunos autores han propuesto diferentes orígenes celulares para esta neoplasia coincidiendo principalmente en las células histiocíticas al encontrar expresión de marcadores inmunohistoquímicos para macrófagos, aunque se resalta igualmente que estos marcadores no fueron totalmente confiables para todos los casos estudiados (Marchal et al. 1997; Mozos et al. 1996; Pérez, Day, and Mozos 1998). Un estudio más reciente ha mostrado negatividad con similares marcadores descartando cualquier relación con el origen histiocítico (Mascarenhas et al. 2017). Durante mucho tiempo se mantuvo la hipótesis que la transmisión natural de este tumor se debía a que se comportaba como un aloinjerto, hace cerca de 16 años esta hipótesis fue puesta a prueba en un estudio usando diferentes marcadores genéticos, concluyendo que en el caso del TVTC el agente etiológico responsable son las mismas células tumorales proveniente de una célula somática que logra evolucionar y comportarse como un parásito transmisible (Murgia et al. 2006). Mostrando que en el caso del TVTC se trata de la misma célula neoplásica originada en un individuo hace miles de años con la capacidad de propagarse entre los caninos como una línea celular contagiosa (Murchison et al. 2014; Murgia et al. 2006; Rebbeck et al. 2009). Esta neoplasia presenta un comportamiento muy particular en la respuesta inmunológica del huésped, donde algunas citoquinas, el infiltrado linfocitario y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad varían su participación y acción en el microambiente tumoral en las fases de desarrollo del TVTC (Belov 2011; Hsiao et al. 2004, 2008; Siddle and Kaufman 2015). Análisis adicionales sobre las subpoblaciones linfocitarias que infiltran el tumor han mostrado porcentajes mayores de linfocitos T y B en la fase de regresión en comparación con la fase de progresión, es en este punto cuando el

tumor se vuelve vulnerable a la respuesta antitumoral por parte del huésped (Chandler and Yang 1981; Hsiao et al. 2002). Aunque el fenómeno de evasión inmunológica se ha estudiado al menos en cinco modelos de cáncer animal (Fassati and Mitchison 2010), TVTC es considerado por algunos autores como el tumor modelo animal ideal para el estudio de las diferentes interacciones entre la respuesta inmune del individuo afectado y las células cancerígenas (Chou et al. 2009). De esta forma, evaluar la respuesta de subpoblaciones linfocitarias antes y durante el tratamiento quimioterapéutico usando el medicamento elección como es sulfato de vincristina puede proporcionar datos importantes sobre como la terapia puede afectar o potencializar la respuesta inmunológica por parte del huésped afectado, además si esta tiene alguna relación con la evolución, el tiempo y pronóstico en pacientes que alcanzan la regresión tumoral completa, contribuyendo a la ampliación de la información en lo que respecta a la patogenicidad del TVTC.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe alguna relación entre la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones linfocitarias CD3, CD8 y CD79 con la regresión del tumor venéreo transmisible canino en pacientes sometidos a quimioterapia con sulfato de Vincristina? ¿Cómo se relacionan o se alteran estas expresiones con las fases del tumor venéreo transmisible canino durante la quimioterapia?

3. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune en las diferentes enfermedades es clave para la recuperación y salud de los animales. En el caso del cáncer transmisible se observa un comportamiento particular de esta respuesta que permite la transmisión entre individuos de la misma especie, los mecanismos por lo que esto se da han sido estudiados desde diferentes puntos de vista, siendo uno de los más importantes la respuesta linfocitaria y como las diferentes subpoblaciones de esta línea celular infiltran la neoplasia ayudando en el proceso de regresión tumoral. Es así como en el presente proyecto se investigó sobre la expresión inmunohistoquímica de marcadores para linfocitos T y B en tejidos de TVTC antes y durante el tratamiento con Vincristina de acuerdo al tiempo de recuperación que haya mostrado cada uno de los pacientes tratados. Igualmente, si esta marcación tiene una relación con las fases de clasificación histopatológica y los tiempos de duración del tratamiento hasta observar una regresión tumoral total. La utilidad de este estudio investigativo radica en el hecho que permite indagar la relación que tiene la quimioterapia con sulfato de vincristina y la respuesta inmune que desarrolla el individuo contribuyendo a profundizar de esta forma en el tratamiento del TVTC.

4. MARCO TEORICO

4.1 Tumor venéreo transmisible canino

El tumor venéreo transmisible canino también conocido como sarcoma venéreo transmisible, sarcoma de Sticker, granuloma venéreo y sarcoma infeccioso (Ganguly et al. 2013), es una neoplasia contagiosa que afecta perros domésticos (*canis lupus familiaris*) y algunos miembros con comportamiento social de la familia de los canidos (vonHoldt and Ostrander 2006), Incluyendo lobos, zorros y coyotes (Mukaratirwa and Gruys 2003). La epidemiología sugiere que el TVTC no presenta preferencia sexual (Strakova and Murchison 2014) y puede afectar indistintamente cualquier raza canina (Murchison 2009). La transmisión del TVTC se da como un aloinjerto natural por transferencia física de las células cancerígenas principalmente durante el coito (Murgia et al. 2006). Convirtiéndolo en un cáncer de transmisión sexual que se manifiesta principalmente en la región genital de machos y hembras (Strakova and Murchison 2015). Se observan dos tipos clínicos de TVTC el genital y extragenital, este último varía de acuerdo a su ubicación anatómica presentándose en piel, cavidad oral, cavidad nasal y mucosa conjuntival(Ganguly et al. 2013; Rogers, Walker, and Dillon 1998), El TVTC genital es relativamente simple de diagnosticar por sus sitios de localización principales en las hembras el vestíbulo vaginal y en los machos bulbo del pene (Boscos and Ververidis 2004), mientras que el diagnostico extragenital es un poco más ambiguo debido a la forma variable que este puede presentar en la piel, mucosa nasal y oral (Setthawongsin et al. 2016). Esta neoplasia presenta un aspecto macroscópico semejante a una coliflor, con diversas características de crecimiento que pueden observarse de manera pedunculado, nodular, papilar o multilobulada con rangos de tamaño que varían desde 5-15cms y una textura que puede ser firme o friable (Das and Das 2000; Ganguly et al. 2013) (figura 1), además su superficie externa frecuentemente se encuentra ulcerada e inflamada con presencia de sangrado genital como un signo característico, siendo este último el principal motivo de consulta medico veterinaria. Este tumor no muestra usualmente un comportamiento maligno, pero podría presentar metástasis a linfonodos regionales, bazo, hígado, riñón, pulmones y cerebro hasta en un 5% de los casos (Kabuusu, Stroup, and Fernandez 2010; Park et al. 2006; Placke, Hill, and Yang 1987).

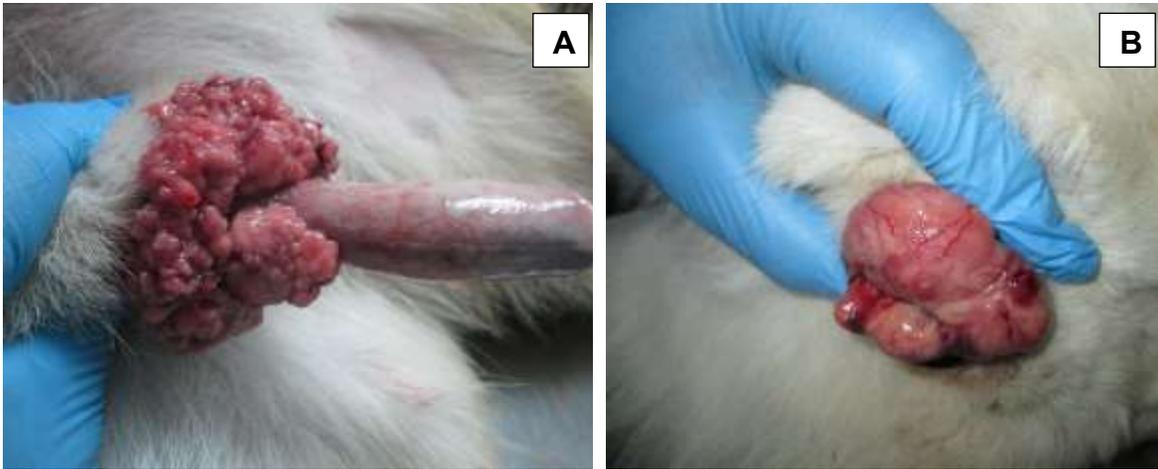


Figura 1. Aspecto macroscópico del TVTC genital. (A) Macho canino, forma de coliflor textura friable (B) Hembra canina, forma nodular textura firme. Fotografías del autor.

4.2 TVTC y la búsqueda de su origen.

La transmisión clonal del TVTC fue sugerida por primera por los investigadores Nowinsky (1876) y Sticker (1906) debido al éxito de sus experimentos al trasplantar células neoplásicas. Fue hasta entonces donde se comprobó que el TVTC podía ser transmitido entre perros no emparentados mediante la transferencia directa de células cancerígenas o tejido tumoral (Cohen 1985; Murchison 2009). Aunque el origen celular del TVTC no ha sido del todo definido, estudios inmunohistoquímicos sugieren que este tumor es de origen histiocito debido a la expresión encontrada en marcadores para macrófagos (Mozos et al. 1996; Pérez et al. 1998), igualmente, se han reportado hallazgos de formas amastigote de *Leishmania* en el citoplasma de las células de TVTC sugiriendo aún más el origen histiocítico al encontrarse la presencia de este parásito (Albanese et al. 2002; Catone et al. 2003; Kegler et al. 2013). El primer reporte clínico de TVTC conocido, fue realizado por un médico veterinario en Londres, quien logro describirlo como una masa ulcerada acompañada de una infección fúngica, ubicada en los órganos reproductivos (Murchison et al. 2014). Mucho tiempo después diferentes trabajos de investigación genética sobre el TVTC mostraron variables características que si se analizan en conjunto sugieren que el tumor presenta un origen común y como algunas de estas mismas le permitieron propagarse alrededor del mundo y mantenerse a través del tiempo. Un estudio comparativo entre las células de TVTC y las células somáticas aisladas de caninos domésticos afectados de cinco diferentes continentes mostraron que existe una estrecha relación genética entre estas células neoplásicas, y al mismo tiempo estas difieren completamente de las células

normales de sus hospederos (Murgia et al. 2006). Además, se han encontrado particulares características que han ayudado a entender cada vez mejor este tumor y como se pudo mantener transmitiendo durante el tiempo. Dentro de estas podemos mencionar, primero, El cariotipo normal del perro domestico está formado de 78 cromosomas, de los cuales 76 son acrocéntricos y un par sexual metacéntrico (Weber, Nowell, and Hare 1965). En el cariotipo de las células de TVTC el número de cromosomas se redujo consistentemente y oscila entre 57 y 59, de los cuales de 16-18 son sub metacéntricos (Fujinaga et al. 1989; Rebbeck et al. 2009; Vermooten 1987). Segundo, las células de TVTC de diversos orígenes geográficos coinciden todas en mostrar la inserción de un elemento de reordenamiento en el gen c-myc, conocido como LINE/c-myc, este no se encuentra en el genoma normal del perro y que podría explicar la aparición, mantenimiento y propagación de esta neoplasia (Amariglio et al. 1991; Fonseca et al. 2012; Liao, Lin, et al. 2003b). Se especula que el LINE/c-myc haya sido la causa de origen del TVTC, pero esto no ha sido probado (Rebbeck et al. 2009). Finalmente, las evidencias genéticas sugieren que el TVTC se originó por primera vez hace miles de años. Estudios de variación de longitud de microsatélites indican un origen común, estimando que el tiempo donde existió un ancestro común puede ser de alrededor de 250-2500 años (Murgia et al. 2006). Aunque la secuencia del genoma revelo que durante el tiempo de existencia el TVTC ha adquirido 1.9 millones de mutaciones y ha perdido 646 de sus genes, estimando un surgimiento de 11.000 años (Strakova and Murchison 2014). Convirtiendo en el linaje tumoral más antiguo que se conoce en la naturaleza, y en lugar de morir con su primer huésped de origen, las células de este cáncer continúan transmitiéndose entre los perros en la actualidad (Strakova and Murchison 2015).

4.3 Distribución del TVTC

TVTC ha sido reportado en muchas regiones del mundo, presentándose casos en todos los continentes a excepción de la Antártida durante el siglo XX (Boscos and Ververidis 2004; Das and Das 2000). Estos reportes son poco frecuentes en el norte y centro de Europa, al igual que en Norteamérica debido a las políticas de control de las poblaciones de perros callejeros implementadas en estas áreas (Ganguly et al. 2013). En un estudio realizado por (Strakova and Murchison 2014) a través de encuesta electrónicas a médicos veterinarios y trabajadores relacionados con la salud animal alrededor del mundo, ha mostrado una prevalencia general estimada de entre el 0-10% en la mayoría de países de América del sur y central, así como en partes de Asia y África. Paradójicamente, Colombia aparece como uno de los países que no registra datos en este estudio. Por el contrario, países como Canadá, Republica Checa, Finlandia, Holanda, Nueva Zelanda, Suecia, Suiza y el Reino

Unido. Fueron reportados como libres de TVTC. Igualmente, este estudio señala que existe una relación entre la prevalencia y distribución mundial de la enfermedad con el grado del desarrollo socioeconómico de los diferentes países, Siendo mayor la prevalencia en aquellos con menor desarrollo.

El TVTC es endémico en al menos 90 países alrededor del mundo (Strakova and Murchison 2014). Aunque Colombia no hizo parte de los anteriores países. Algunos reportes de casos TVTC de pacientes recuperados exitosamente con sulfato de vincristina han sido documentados en nuestro país (Martínez, Ballut, and Cardona 2002; Ramírez Bonilla et al. 2015), como también reporte de metástasis atípica de TVTC al tejido pulmonar (Salamanca S et al. 2008). Igualmente, algunos estudios epidemiológicos indicando que la enfermedad está presente a nivel local, siendo importante en la casuística medico veterinaria. Un análisis retrospectivo sobre prevalencia de las neoplasias diagnosticadas en caninos en el laboratorio de patología de la universidad de los Llanos, determino que el 15% de la totalidad se trataban de casos de TVTC, considerándose la neoplasia genital más común tanto en machos como hembras caninas (Bravo T, Cruz-Casallas, and Ochoa A 2010). En una investigación realizada por (Arcila-villa, Dussan-lubert, and Pedraza 2017) se estimó la distribución y prevalencia del TVTC a nivel de todas las regiones de Colombia, obteniendo resultados muy similares a los hechos a nivel mundial y confirmando que esta enfermedad es endémica en el país, además de identificar como principal reservorio de infección la población de perros callejeros. A pesar del origen antiguo del TVTC, la transmisión global se diversificó solo dentro de los últimos cientos de años, sugiriendo que su propagación y distribución alrededor del mundo es relativamente reciente (Strakova and Murchison 2014; vonHoldt and Ostrander 2006).

4.4 Diagnóstico del TVTC

4.4.1 Citología

El examen citológico es un método de colecta de muestras celulares que se ha usado tanto en investigación científica como en diagnóstico médico veterinario, teniendo ventajas por ser una técnica simple, poco invasiva, relativamente rápida y de muy bajo costo, además de permitir observar adecuadamente la morfología celular (Amaral et al. 2007; Cowell and Tyler 1989; Gaspar et al. 2010). Mostrando un alto nivel de eficacia para el diagnóstico de lesiones inflamatorias o neoplásicas, entre las cuales se encuentra el TVTC (Amaral et al. 2004). Este examen es usado ampliamente en el diagnóstico del TVTC, en el estudio retrospectivo de (Brandão et al. 2002) de 127 casos el 94,6% fueron diagnosticados a través de citología. En otro

estudio similar (Amaral et al. 2004) de 3369 casos de neoplasias diagnosticadas mediante citología, el 17,1% se trataban de TVTC.

El TVTC es una neoplasia de células redondas, que necesita diferenciarse de otros tumores dentro de esta mismo grupo como el mastocitoma, histiocitoma, linfoma, plasmocitoma y melanoma, al igual que los carcinomas pobremente diferenciados (Kabuusu et al. 2010; Setthawongsin et al. 2016). Las muestras citológicas de TVTC pueden ser colectadas a través de las técnicas de punción con o sin aspirado. Dentro de las características microscópicas presenta una alta celularidad, con una morfología redonda u oval, con variación de tamaño entre 14 y 30 μ y bordes bien delimitados. Con núcleos redondos u ovales, tamaños variables, frecuentemente excéntricos, cromatina granular, dos nucleolos prominentes y la relación núcleo:citoplasma es relativamente alta (Amaral et al. 2007). También puede observarse mitosis típicas o atípicas que pueden indicar proliferación de células tumorales (Stockmann et al. 2011b), acompañado de células inflamatorias como neutrófilos, linfocitos, plasmocitos y algunos macrófagos (Duncan and Prasse 1979). La característica citológica más destacada del TVTC es la presencia de múltiples vacuolas intra-citoplasmáticas claras (Santos et al. 2005; Thangathurai et al. 2008), aunque cabe aclarar que no es única de esta neoplasia.

La morfología de las células de TVTC durante el examen citológico han mostrado similitud con Linfocitos y Plasmocitos, esto ha permitido clasificarlas en subtipos citomorfologicos como linfocitoide y plasmocitoide respectivamente, cuando predomina una de estos subtipos mencionados. y en el caso de no haber predominio morfológico se considera mixto al ser una mezcla de ambas formas (Amaral et al. 2007; Montoya et al. 2012). El subtipo plasmocitoide ha sido relacionado por algunos autores como una neoplasia de TVTC de más difícil manejo clínico que requiere mayor número de quimioterapias y en algunos casos mostrar resistencia a medicamentos usados en el tratamiento o presentación de metástasis (Gaspar et al. 2009; Setthawongsin, Tangkawattana, and Rungsipipat 2018; Valençola et al. 2015).

4.4.2 Histopatología

El examen histopatológico puede ser usado en aquellos casos donde la citología no sea posible de realizar o no confirme el diagnóstico del TVTC. En la histopatología del TVTC se observan células redondas, organizadas en masas compactas, agrupadas en cuerda intercaladas separadas por tejido conectivo (Stockman et al. 2011a), las células tienen un núcleo grande, hipercromático, redondo, cromatina clara, nucleolo prominente y citoplasma ligeramente eosinofílico. Se observan

frecuentemente figuras mitóticas (HAMIR 1985; Islam et al. 2017; OTOMO et al. 1981). Como también se pueden observar células inflamatorias como Neutrófilos, Linfocitos, Macrófagos y plasmocitos (Girma and Chanie 2015; Tella, Ajala, and Taiwo 2004).

Aparte de ser una ayuda diagnóstica, la histopatología ha permitido a partir de sus características microscópicas clasificar las fases de desarrollo del TVTC que pueden ser reconocidas de manera general como fase de progresión y regresión. Algunos autores han incluido una fase corta en medio de progresión y regresión nombrándola como fase estable donde el crecimiento y los cambios se detienen (Chu et al. 2001; Frampton et al. 2018). Otros han diferenciado dos fases de regresión dentro de un orden secuencial donde se identifican cambios histopatológicos concretos llamando a estas regresión temprana y regresión tardía (Mukaratirwa et al. 2004; Stockmann et al. 2011b). La fase de progresión se caracteriza por un elevado número de células, altas tasas de mitosis y escaso tejido conectivo, la regresión temprana menor número de células neoplásicas y presencia de infiltrado linfocitario y la regresión tardía donde se pierde el parénquima tumoral aumentando el tejido de fibroso de reemplazo (Stockman et al. 2011a). Tanto las características como las fases histopatológicas se relacionan directamente con la respuesta inmune intratumoral del TVTC. Convirtiendo esta neoplasia en un excelente modelo para evaluar la interacción entre la respuesta inmune del hospedero y la fase de crecimiento tumoral (Liao, Hung, et al. 2003a).

4.4.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

El cáncer es considerado una enfermedad genética, en la cual a través del tiempo se han descubierto muchos genes responsables de la oncogénesis de diferentes tipos de tumores. Además de encontrarse con precisión sus mutaciones y la vía como estos actúan (Vogelstein and Kinzler 2004). Existen muchos genes que al sufrir alteraciones favorecen la formación de tumores, esto debido a que ellos mismo son los encargados de la reparación del ADN, el control del ciclo celular y la apoptosis. El proto-oncogen c-MYC regula otros genes principalmente encargados de la proliferación y la apoptosis celular, pero cuando este tiene alteraciones como una mutación puede desencadenar un proceso carcinogénico a partir de la codificación de proteínas que favorecen la pérdida de control de la división celular dando como resultado la formación de una neoplasia (Adachi et al. 2001; Gartel and Shchors 2003). Se ha descubierto que el proto-oncogen c-MYC se activa en varios tumores animales y humanos (Cole 1986; Dang 1999). En el genoma de las células de TVTC se presenta un elemento de transposición independiente en la región del extremo 5' del primer exón del oncogen c-MYC conocido como LINE-1/c-MYC

(Amariglio et al. 1991; Liao, Lin, et al. 2003). Diferentes estudios apoyados en técnicas moleculares, han logrado verificar la presencia de este reordenamiento de transposición en todas las muestras analizadas de TVTC provenientes de diferentes partes del mundo, además, de verificar la no presencia del mismo en las demás células normales del perro (Amariglio et al. 1991; Choi et al. 1999; Katzir et al. 1985; Mukaratirwa et al. 2004; Murgia et al. 2006). Esta particularidad genómica del TVTC permite realizar confirmación diagnóstica mediante ensayos cuantitativos de PCR al detectar el reordenamiento LINE-1/c-MYC específico para esta neoplasia (Castro et al. 2017; Fonseca et al. 2012; Setthawongsin et al. 2016; Strakova et al. 2020). Siendo esta una excelente herramienta diagnóstica para diferentes trabajos de investigación como también para aquellos casos donde se dificulte el diagnóstico definitivo.

4.5 Inmunohistoquímica

La marcación de células por anticuerpos específicos para la identificación y clasificación tumoral se ha realizado tanto en tejidos en congelación, como en tejidos fijados en parafina (Caniatti et al. 1996). Algunos estudios mostraron que anticuerpos usados contra antígenos en humanos, pueden ser usados en el reconocimiento de tumores en perros y gatos (Williamson and Middleton 1998), favoreciendo el uso de esta técnica como una herramienta útil que ayuda en la identificación, clasificación y pronóstico de aquellas neoplasias que muestran difícil reconocimiento morfológico (Shi, Cote, and Taylor 1997). Mediante esta técnica se han detectado una alta inmunoreactividad para vimentina, lisozima y antitripsina en TVTC (Mozos et al. 1996), al igual que negatividad para desmina. CD3 y CD79 en un reporte de caso donde el paciente presente metástasis generando dificultad diagnóstica que se podría confundir con linfoma (Park et al. 2006). Siendo esta última neoplasia diferenciada por la inmunohistoquímica cuando es marcada por anticuerpos CD3 para tipo T y anticuerpo CD79 para linfoma tipo B (Fernandez et al. 2015), Estos y otros anticuerpos CD pueden ser usados para conocer el comportamiento biológico y la respuesta inmune intratumoral en el TVTC. En diferentes estudios experimentales se han descrito el uso de marcadores para identificar poblaciones linfocitarias tipo T y B que junto con marcadores para determinar tipos de células estromales han caracterizado histológicamente las etapas de progresión y regresión en el TVTC (Gonzalez et al. 2000; Mozos et al. 1996; Mukaratirwa et al. 2004; Pérez et al. 1998; Trompieri-Silveira et al. 2009).

4.6 Tratamiento

El TVTC ha mostrado respuesta favorable a diferentes tipos de tratamientos como cirugía, radioterapia o quimioterapia, siendo esta última considerada la más efectiva (Rogers et al. 1998), La recesión quirúrgica fue por mucho tiempo la terapia de elección, pero la localización anatómica y la mala delimitación de los bordes hacían que se presentara recurrencia del TVTC (Batamuzi and Kessy 1993; Idowu 1984). La terapia de radiación muestra efectividad en caso de tumores focales o como solución a casos de resistencia a la quimioterapia, aunque su limitante es el uso de un equipo especializado (Rogers et al. 1998). Existen diferentes medicamentos que han sido reportados como único agente terapéutico para el tratamiento del TVTC entre estos se encuentra la vincristina, vinblastina, ciclofosfamida, doxorubicina y metotrexato (Amber et al. 1990; Cizmeci et al. 2012; Ganguly et al. 2013; Paranzini et al. 2015; Regmi et al. 2020; Scarpelli, Valladão, and Metze 2010; Singh et al. 1996). Igualmente algunas quimioterapias combinan con otros medicamentos como la ivermectina mostrando regresión total tumoral y minimizando efectos adversos (Ferreira et al. 2020) y el uso intratumoral de interferón alfa-2a humano recombinante que mostro reducir los tiempos de tratamiento (Kanca et al. 2018). De todos los tratamiento usados y analizados experimentalmente la vincristina usado como único medicamento semanalmente a dosis de 0.025mg/kg o 0.5-0.7 mg/m² ha mostrado buenos resultados de respuesta y efectos secundarios mínimos (De la cruz et al. 2015; Vermooten 1987), los cuales pueden ser mielosupresión leve, anorexia, vomito, diarrea y neutropenia (Tomiyasu et al. 2010). La vincristina es un vinca alcaloide de origen vegetal usado como un importante agente anticancerígeno cuyo mecanismo de acción es disminuir la dinámica y el ensamblaje de los microtúbulos, provocando una interrupción de la división celular en la metafase (Lobert, Vulevic, and Correia 1996), este medicamento debe administrarse exclusivamente por vía intravenosa de lo contrario causa irritación perivascular y necrosis (Booth 1994). En aquellos casos donde se han presentado respuesta nula o parcial al tratamiento indicando algún tipo de resistencia a la vincristina, se ha usado doxorubicina como el quimioterapéutico alternativo (Rogers et al. 1998; Stettner et al. 2005), en dosis de 30mg/m² cada 3 semanas ha mostrado buenos resultados con entre 2-3 sesiones (Cizmeci et al. 2012).

4.7 Respuesta Inmune TVTC

La respuesta inmune de los caninos frente al TVTC presenta dentro de sus principales características la infiltración tumoral de Linfocitos T, Linfocitos B y macrófagos, los cuales muestran variable comportamiento durante el crecimiento y la regresión tumoral, destacándose un aumento de estas células infiltrantes durante

la fase de regresión (Chandler and Yang 1981; Chu et al. 2001; Gonzalez et al. 2000; Mukaratirwa et al. 2004). Los linfocitos T CD8 en el infiltrado tumoral tienen un comportamiento particularmente transicional desde la fase crecimiento hasta la regresión (Chandler and Yang 1981; Pérez et al. 1998; Placke et al. 1987), Aunque este comportamiento todavía no está del todo claro debido a los mecanismos subyacentes, muestra que para el objetivo de evitar la respuesta inmune contra el TVTC, el hospedero usa una variedad de estrategias que incluyen la pérdida de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y la liberación de citocinas inmunosupresoras (Siddle and Kaufman 2015). Se ha observado en las células de TVTC que cambian la expresión de su CMH en las diferentes fases de este tumor, mostrando que en la fase de progresión no se expresa el CMH contrario a la fase de regresión donde se expresa el CMH (Hsiao et al. 2002; Pérez et al. 1998; Yang, Chandler, and Dunne-Anway 1987). Durante la fase progresión, menos del 5% de las células de CTVT expresan moléculas CMH tipo I o CMH tipo II; se cree que la regulación de la baja en la expresión de genes CMH se debe a mecanismos epigenéticos, y que probablemente esto conlleve a la evasión de la respuesta inmune por parte de los linfocitos T (Hsiao et al. 2002, 2008; Murgia et al. 2006; Pérez et al. 1998; Yang et al. 1987). Por el contrario, alrededor del 40% de las células de TVTC expresan moléculas de CMH durante la fase de regresión; este efecto probablemente sea por acción del interferón gamma (INF- γ), proveniente de los linfocitos que infiltran el tumor (Hsiao et al. 2002, 2008; Pérez et al. 1998; Yang et al. 1987). Sin embargo, la secreción del factor de crecimiento transformante de citocinas beta (TGF- β) por parte de las células de CTVT logra inhibir el efecto del INF- γ suprimiendo la expresión de CMH, favoreciendo la inmunosupresión de los linfocitos y las células asesinas naturales (Hsiao et al. 2002, 2004, 2008). Igualmente, el TVTC parece necesitar mantener en su microambiente local un efecto inmunosupresor en la fase de progresión; esto es coherente con las dinámicas clínicas que muestra con respecto a la metástasis, una situación poco frecuente, observándose en animales inmunosuprimidos (Cohen 1985; Park et al. 2006; Placke et al. 1987). Además, se ha demostrado que la liberación de interleuquina 6 (IL6) por parte de los Linfocitos que infiltran el TVTC bloquean el TGF- β , lo que permite que el INF- γ estimule la expresión de CMH favoreciendo la respuesta inmunológica intratumoral y la regresión tumoral (Hsiao et al. 2004, 2008; Liao, Hung, et al. 2003).

Sin embargo, es muy importante resaltar que algunos de estos estudios que buscan crear la base de la respuesta inmunológica para el caso del TVTC, usan metodologías aplicadas en otras especies animales o cuando lo realizan en caninos son contagios inducidos bajo experimentación (Chou et al. 2009; Harmelin et al. 2002; Mizuno et al. 1989), Lo que podría generar diferencias en comparación con

infecciones naturales que implica muchas más variables que podrían afectar el desarrollo del TVTC.

Finalmente, se ha especulado que aquellos casos de regresión espontánea de TVTC donde el hospedero no se le realiza ningún tipo de terapia, es debido a la recuperación de la expresión del CMH. Puede que lo anterior no sea solo una estrategia de evasión del sistema inmune, sino una adaptación desarrollada para garantizar un margen de tiempo suficiente para la transmisión tumoral, manteniendo una población de hospederos viables (Belov 2011; Fassati and Mitchison 2010; Murgia et al. 2006; vonHoldt and Ostrander 2006).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones linfocitarias en la regresión tumoral de pacientes sometidos a quimioterapia como tratamiento del tumor venéreo transmisible canino.

5.2 Objetivos específicos

Determinar el estado de infiltración de subpoblaciones linfocitarias durante la fase de progresión o regresión en tumor venéreo transmisible canino.

Medir el nivel de expresión inmunohistoquímica de las subpoblaciones linfocitaria CD3, CD8 y CD79 antes y durante el tratamiento quimioterapéutico contra el tumor venéreo transmisible canino.

Correlacionar la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones de Linfocitos B y T con la respuesta al tratamiento en el tumor venéreo transmisible canino.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 comité de ética

La metodología aplicada en este estudio es de tipo descriptivo, longitudinal, prospectivo, aprobado por el comité de ética y bienestar animal de la facultad de ciencias agropecuarias (código 1065017).

6.2 Procedimiento y manejo de animales

Se realizó seguimiento clínico durante el tiempo de tratamiento a 24 caninos afectados de forma natural con TVTC que hicieron parte del presente estudio, en todos los pacientes se desconocía el tiempo exacto de evolución de la enfermedad. Esto último debido a que se trataba de perros en condición de calle que habían sido rescatados en diferentes albergues. Se mantuvieron alojados en el bioterio de la universidad de Caldas entre los meses de Julio 2016 a Octubre de 2017, con alimento y agua de acuerdo a sus respectivos requerimientos nutricionales, salvaguardando la salud de los mismos. A cada uno de los pacientes tratados se le realizó examen físico general y evaluación específica del área afectada por el tumor, determinando las medidas de su tamaño como referencia de involución tumoral durante el tratamiento (figura 2), además semanalmente se realizaron exámenes sanguíneos para hemoleucogramas y algunas químicas sanguíneas para evaluación renal y hepática. Los resultados de estos se tomaron como guía paraclínica para el inicio y continuación del tratamiento quimioterapéutico y como perfil prequirúrgico previo al momento de la toma de las muestras a través de biopsia incisional.

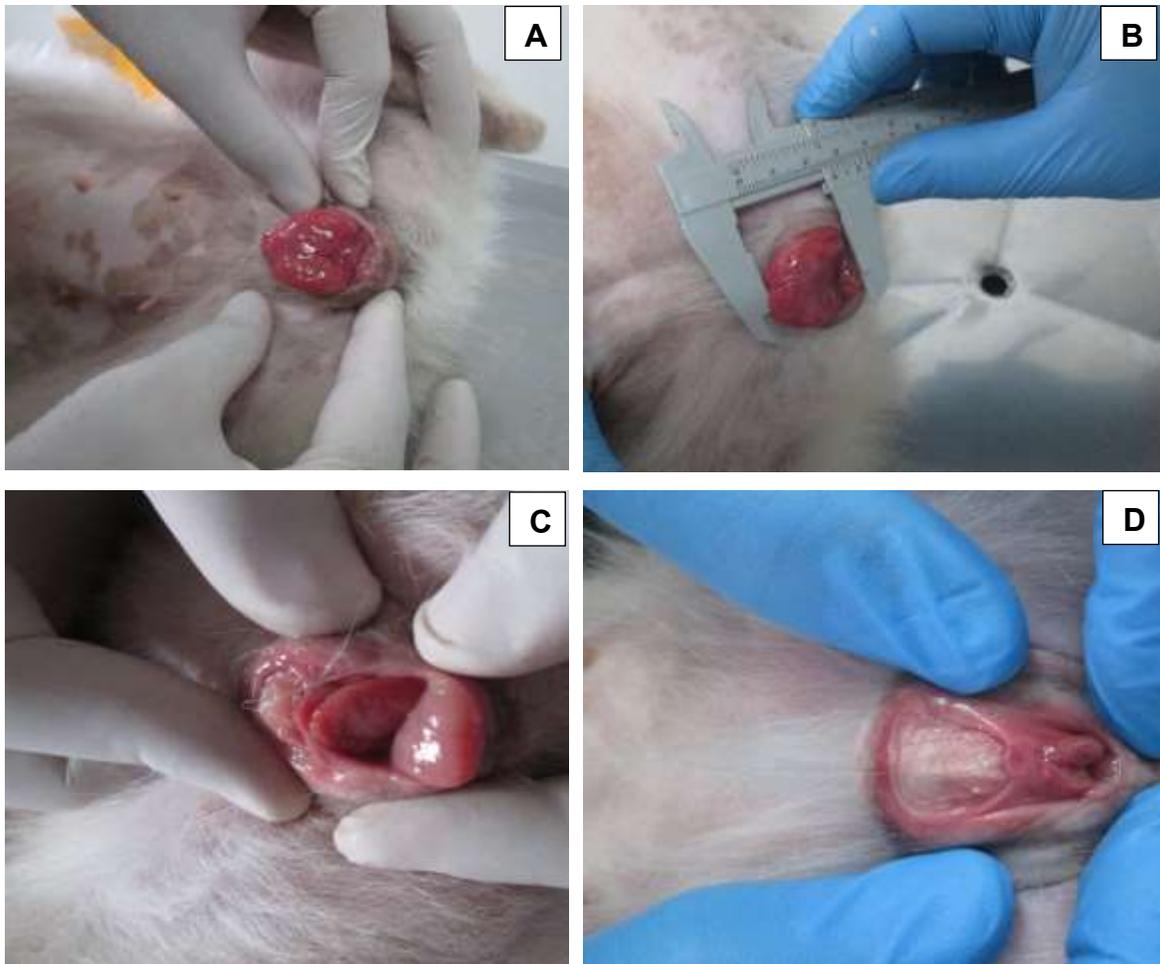


Figura 2. Respuesta quimioterapéutica usando vincristina del TVTC en una hembra canina. (A) Fotografía día que se realizó el diagnóstico clínico y citológico antes de iniciar la quimioterapia. (B) Tres semanas después de aplicar 2 dosis de vincristina. (C) Seis semanas después de aplicar 5 dosis de vincristina se observa una reducción considerable en el tamaño. (D) Ocho semanas de iniciado el tratamiento mostrando regresión total del tumor después de 7 dosis de Vincristina.

6.3 Diagnóstico y tratamiento de TVTC

El diagnóstico de la neoplasia se realizó por citología e histopatología en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Caldas, posteriormente confirmados molecularmente con el apoyo del grupo de investigación en Cáncer

Transmisible de la Universidad de Cambridge-Inglterra. En todos pacientes tratados en este estudio se realizó el mismo tratamiento quimioterapeutico en el cual se empleó una dosis de sulfato de vincristina a $0.05\text{mg}/\text{m}^2$ cada 7 días hasta la involución total del tumor.

La citología fue el examen diagnostico que se tuvo en cuenta inicialmente para incluir los pacientes dentro de la investigación y con los demás exámenes paraclínicos iniciar las quimioterapias, estas muestras citológicas se obtuvieron de las masas tumorales por la técnica de biopsia por aspiración con aguja fina (BACAF), utilizando una aguja calibre 22 sin importar el volumen de la lesión tumoral, acoplada a una jeringa de 5 mL, puncionando en diferentes puntos del área tumoral, los extendidos celulares fueron coloreados con una tinción de Wright para su posterior observación y diagnóstico. El análisis microscópico se realizó mediante microscopia de luz, las muestras citológicas se observaron inicialmente con el objetivo de 10X para verificación de celularidad, patrón de coloración y distribución de células. Se observaron aleatoriamente diferentes campos en aumento de 40X para identificar las características de las células de TVTC (figura 3).

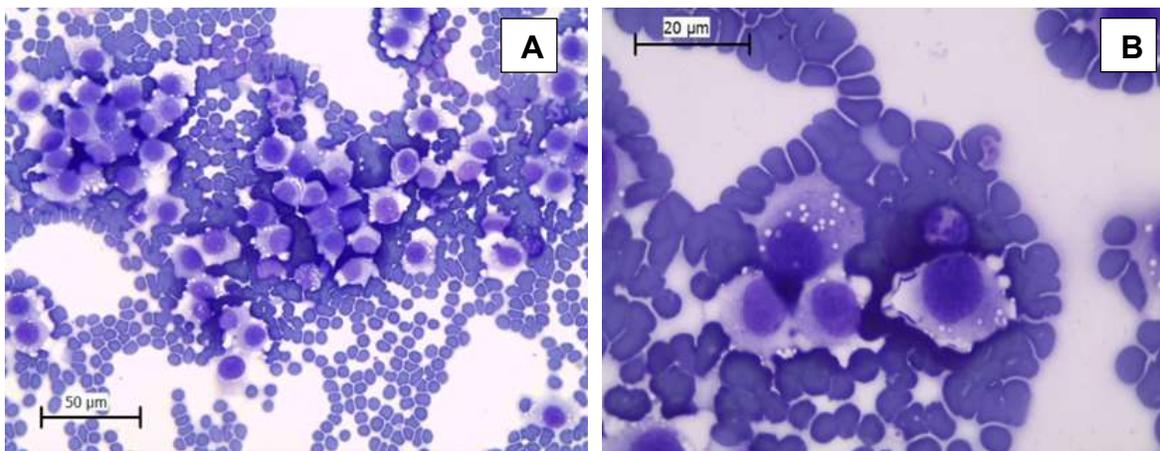


Figura 3. Características citomorfológicas del TVTC. (A) Numerosas células redondas con variable relación núcleo/citoplasma, 40X (B) Citoplasma multivacuolado una característica presente en la mayoría de células de TVTC, 100X.

6.4 Colecta y procesamiento de muestras

Después de obtener un diagnóstico clínico y citológico de TVTC se realiza la colecta de la primera muestra a los 24 caninos antes de iniciar el tratamiento, para esto el paciente se somete anestesia general fija y bajo condiciones asépticas se toma la primera biopsia incisional (B1). Se realiza una segunda biopsia incisional (B2) en las mismas condiciones en aquellos pacientes que a la tercera semana de tratamiento, antes de una cuarta dosis de Vincristina no han presentado una regresión tumoral total. La segunda toma de muestra B2 se realizó en 15 de los caninos. En cada uno de los procedimientos se tomaron 2 fragmentos de aproximadamente 0,5 cm³, de los cuales uno se almaceno en formalina buferada al 10% para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico, y el otro fragmento en una solución estabilizadora de tejidos *ARN/ater*® (Ambion®) almacenados a menos 22°C para posteriormente ser enviadas a la Universidad de Cambridge (Reino Unido) para el análisis molecular. En iguales condiciones se tomó una muestra de piel de cada uno de los hospederos de TVTC para la realizar los controles de las pruebas moleculares.

6.5 Análisis histopatológico

Las muestras de tejido obtenidas por medio de biopsia incisional fueron fijadas en un 1ml de formalina buferada al 10% durante 48 horas, la deshidratación, aclaramiento e imbibición en parafina se realizó en un procesador automático de tejidos (Kedee®). Los cortes tisulares de 4µm se obtuvieron con un micrómetro Leica RM 2135®, los tejidos fueron coloreados con Tricromico de Masson para mejorar la observación del tejido conectivo. Esto con el fin de poder facilitar la identificación de las diferentes fases histopatológicas.

La clasificación histopatológica que se realizó en esta investigación siguió los criterios establecidos por (Mukaratirwa et al. 2004; Stockmann et al. 2011), quienes describieron tres etapas o fases histológicas en el desarrollo TVTC, progresión (P),

que se caracteriza clínicamente ser un tumor que aumenta constantemente de volumen, además de presentar dentro sus principales características microscópicas poco estroma, abundantes células neoplásicas en mitosis y poco infiltrado linfocitario; regresión temprana (ER), donde la clínica muestra un tumor que disminuye rápidamente de volumen, presentando a la observación microscópica algunas células neoplásicas en mitosis, aumento de células apoptóticas e incremento del infiltrado linfocitario; y una última fase, de regresión tardía (LR) en la cual el tumor disminuye su volumen lentamente, presentando abundante infiltrado linfocitario, desaparecen las células neoplásicas, depósitos de colágeno y remplazo por estroma fibroso (figura 4). Para facilitar el análisis estadístico que relaciona las diferentes fases histológicas obtenidas dentro de los resultados, se hizo necesario agrupar las fases de regresión temprana y tardía en una sola que llamamos fase de regresión.

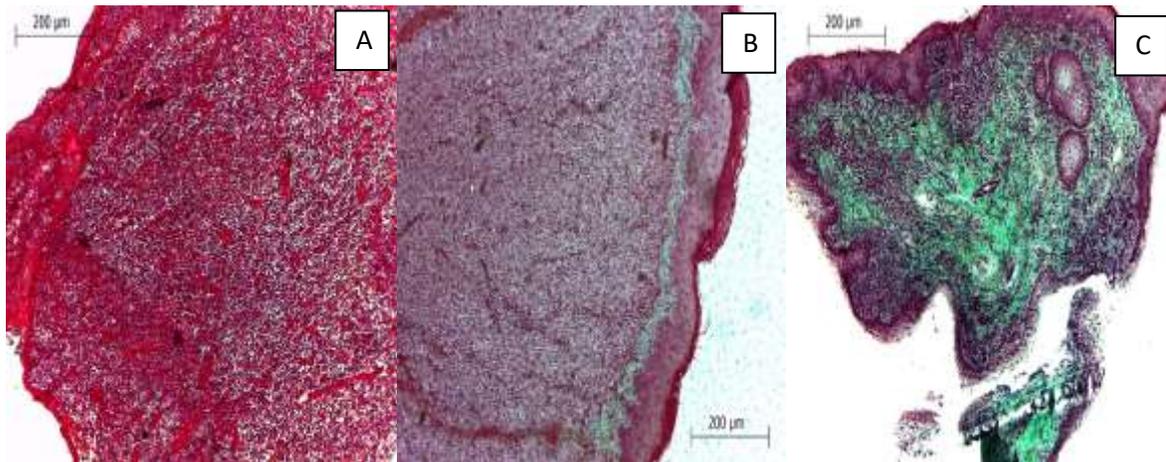


Figura 4. Clasificación histopatología del TVTC. A. TVTC progresión. Poco estroma, abundantes células neoplásicas en mitosis y poco infiltrado linfocitario. B. TVTC regresión temprana. Menor número de células neoplásicas, células apoptóticas e incremento de infiltrado linfocitario. C. TVTC regresión tardía. Desaparecen las células neoplásicas, depósitos de colágeno y estroma fibroso. Fotografías tomadas con el lente 10x con coloración Tricómico de Masson.

6.6 Análisis molecular

Las muestras recolectadas y almacenadas en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Caldas, tanto de los pacientes muestreados con TVTC como de otros tipos de tejidos (testículo y ovario) procedentes de caninos de la misma región geográfica para realizar los controles, fueron enviadas por una compañía especializada en el transporte de este tipo de muestras al Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge (Cambridge, Reino Unido). Posteriormente los análisis moleculares para confirmación diagnóstica de TVTC, se realizaron durante una pasantía investigativa en el mes de Enero del 2018 bajo la supervisión de la Dra Elizabeth Proby Murchison. Además de participar como coautor en una investigación internacional del TVTC liderado por el grupo de investigación en cáncer transmisible de la misma Universidad. (Ver anexos).

6.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico (ADNg) de las muestras tumorales y los tejidos control, se realizó usando el kit DNeasy Tissue-QIAGEN (Hilden, Alemania), siguiendo cada una de las recomendaciones del fabricante. El ADNg obtenido fue amplificado usando un kit de amplificación de genoma WGA-GE Healthcare, Genomephi V2 DNA kit (Chalfont St. Giles, Reino Unido) realizando el procedimiento de acuerdo a lo propuesto por el fabricante.

Para la medición de la concentración y pureza de ADN se usó el dispositivo NanoDrop ND-8000-Thermo Scientific (Boston, Massachusetts, USA). La cuantificación de ADN en las muestras el kit de ensayo Qubit® dsDNA HS-Life Technologies (Carlsbad, California, USA) según las indicaciones del fabricante.

6.6.2 PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)

La técnica cuantitativa de PCR en tiempo real (qPCR) se realizó para detectar el reordenamiento LINE-1 / c-myc y detectar el gen CDKN2A con muestras de ADNg obtenidas de las biopsias tumorales y también de las muestras de piel tomada de los animales huéspedes. Esto con el fin de obtener una confirmación diagnóstica molecular del TVTC en todas las muestras incluidas en esta investigación.

La presencia del reordenamiento de LINE-1/c-myc específico del TVTC es una identificación muy útil para la confirmación diagnóstica del TVTC (figura 5) (Castro et al. 2017; Katzir et al. 1985; Rebbeck et al. 2009). Esta qPCR se realizó con las

muestras de ADN_g extraídas de las biopsias antes (B1) y durante (B2) el tratamiento. Igual procedimiento fue realizado con el ADN_g extraído de las muestras de piel de los huéspedes. La técnica usada fue qPCR con Syber Green Mix-Life Technologies (Carlsbad, California, USA). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del reordenamiento de LINE-1/c-myc se muestran en la tabla 1.

El gen CDKN2A es un supresor tumoral involucrado en el ciclo celular. Las células que no pueden producir este inhibidor pueden ser más propensas a la transformación neoplásica (Norobi et al. 1994). En el genoma de las células de TVTC existe una eliminación homocigótica de este gen CDKN2A (Murchison et al. 2014), por lo tanto la no detección por qPCR también puede contribuir a la confirmación diagnóstica. En caso de que se presente detección puede atribuirse a la presencia de células somáticas del huésped en las muestras por una posible contaminación al momento de que estas son tomadas. Se realizó la qPCR en iguales condiciones de muestras que para el LINE-1/c-myc. Los oligonucleótidos cebadores que se usaron para la amplificación de CDKN2A se muestran en la tabla 1 y las condiciones de qPCR fueron las mismas que para el LINE-1/c-myc.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos iniciadores utilizados en la qPCR para LINE-1/c-myc y CDKN2A

Genes	Oligonucleotidos	
	Forward	Reverse
Beta	5'-	5'-
Actina	CTCCATCATGAAGTGTGACGTT	CGATGATCTTGATCTTCATTG
	G-3'	TGC-3'
Line-1/c-myc	5'-	5'-
	AGGGTTTCCCATCCTTTAACATT	AGATAAGAAGCTTTTGCACAG
	-3''	CAA-3'
CDKN2A	5'-	5'-
	CGGCCTTTGGAAGATTTTGT	CTTCCACCCCTAGAAACCTCC
	GGCTTGA-3'	TTCT-3'

Adaptado de (Castro et al. 2017).

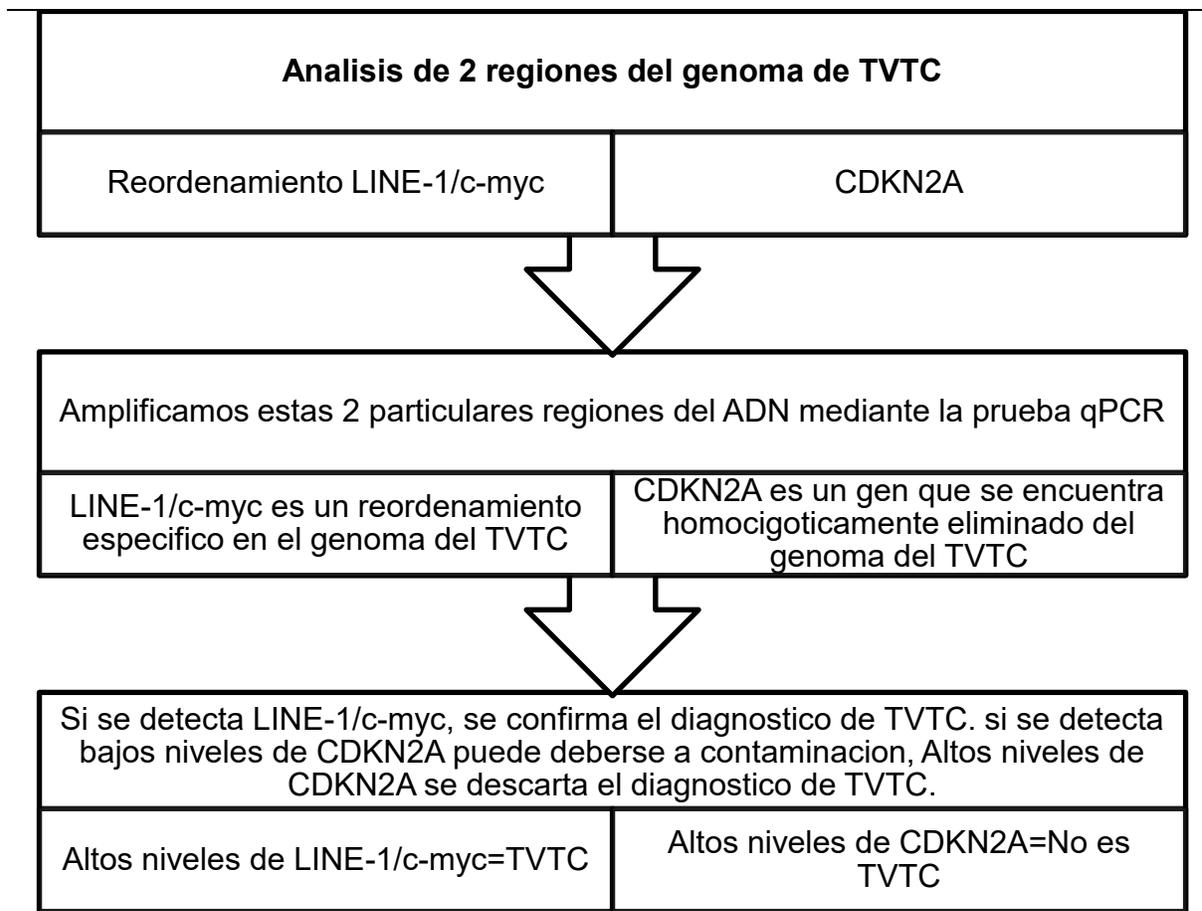


Figura 5. Diagnóstico de TVTC usando qPCR. Se identifica dos regiones particulares del ADN, LINE 1/C-myc y CDKN2A.

6.7 Expresión Inmunohistoquímica

Para el análisis de la expresión de CD3, CD8, CD79 fue utilizada la técnica de inmunohistoquímica en los cortes realizados de las muestras de TVTC incluidas en parafina. El procesamiento y la inclusión de las muestras de TVTC fue realizada en el laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Caldas, mientras que la técnica inmunohistoquímica se realizó en colaboración del Laboratorio del departamento de Patología Veterinaria FCAV-UNESP, Jaboticabal-Brasil. Utilizando los anticuerpos presentados en la tabla 2.

Los cortes de tejidos de 3µm fueron colocados en laminas cargadas (Microtomo manual Leica® RM2125 RTS), posteriormente se desparafinaron a 60°C por 2 horas, para luego hidratar los tejidos por 2 xiloles y alcoholes decrecientes (100%,

95%, 80% y 70%). La recuperación antigénica se realizó en una olla a presión tipo pascal® (DAKO) con el recuperador de antígeno citrato pH 6, dejando durante 30 minutos, después se hizo un proceso de enfriamiento por 20 minutos, seguido de lavados con agua destilada. Seguidamente las muestras fueron sometidas a bloqueo de peróxido endógeno con 5% de H₂O₂ durante 20 minutos, nuevamente lavado con agua destilada. El bloqueo de proteínas inespecíficas se realizó por 60 minutos con leche en polvo para cada anticuerpo y luego se realizaron lavados con solución tamponada de Tris de 7.4 de pH. Seguido de la incubación por 18 horas (En la Noche) a 4°C con el anticuerpo primario.

Después de finalizado el periodo de incubación se realizó el lavado del anticuerpo primario, para esto se usó nuevamente la solución Tris, seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (Tabla 2) esta vez durante 30 minutos a temperatura ambiente, repitiendo el lavado con la misma solución y colocando el cromógeno DAB (DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen System) durante 3 minutos, luego se realizó la contracoloración con Hematoxilina durante un minuto y finalmente deshidratación de los tejidos por alcoholes crecientes (70%, 80%, 95% y 100%) adicionalmente por 2 xiloles. Para las diluciones de los anticuerpos y el uso de controles positivos y negativos, se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

Tabla 2. Panel anticuerpos marcación Inmunohistoquímica.

Anticuerpo Primario	Clon	Dilución	Anticuerpo secundario
CD3 ¹	Monoclonal SP7	1:200	EnVision ⁴
CD8 ²	Monoclonal 53-6.7	1:200	EnVision ⁴
CD79 ³	Policlonal	1:200	EnVision ⁴

¹ Novusbio cod. NB600-1441. ² Novusbio cod. NBP1-49045. ³ Novusbio cod. NB600-1058. ⁴ Dako Dual Link System cod. K4061.

6.7.1 Validación de marcación

Se fotografiaron en cada una de las 92 láminas obtenidas 5 campos siguiendo un patrón aleatorio, que representaron un total de 460 fotografías microscópicas, la toma de estas se realizó con el software de Leica Application Suite Las-EZ® (PC Version 3.1) usando el objetivo de 40X. Todas las imágenes se procesaron con el software ImageJ ([Http// rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)). ImageJ es un programa de análisis de

imágenes que se utiliza como una herramienta de cuantificación para diferentes estructuras histológicas. Cabe aclarar que el programa en mención es un software de dominio público desarrollado por el National Institutes of Health. Y que sus características actuales permiten el uso de diferentes plugins y macroinstrucciones que facilitan el procesamiento y análisis de las imágenes. En el presente estudio se cuantifico el porcentaje de células marcadas en cada una de las cinco imágenes por caso por tipo de anticuerpo utilizado (Figura 6). Posteriormente se promedió los porcentajes obtenidos de las cinco fotografías de cada lamina. Dando como resultado un único valor por cada muestra procesada.

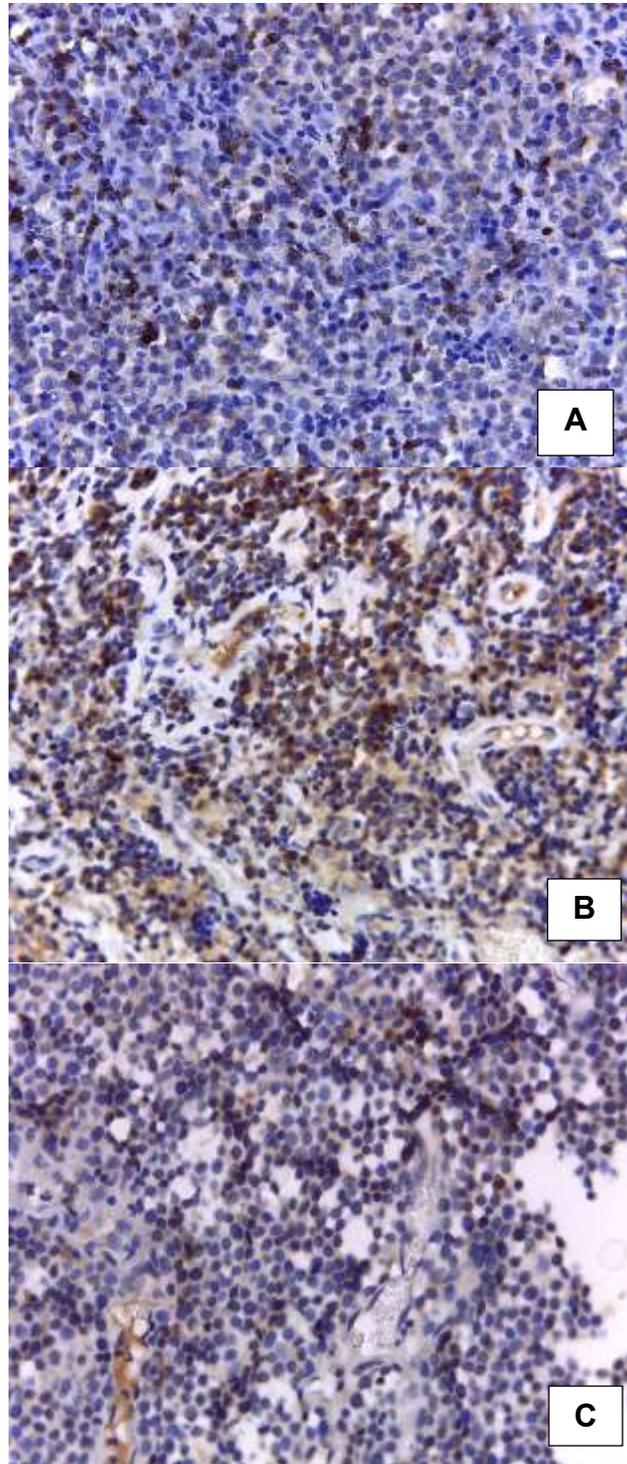


Figura 6. Marcación Inmunohistoquímica CD3, CD8 Y CD79. A. Anticuerpo CD3, 40X. B. Anticuerpo CD8, 40X C. Anticuerpo CD79, 40X. cromógeno DAB (DAKO Liquid DAB+ Substrate Chromogen System), contracoloración con Hematoxilina.

6.8 Análisis estadístico

El análisis para la relación entre la fase histopatológica de las muestras antes del tratamiento y el número de quimioterapias empleadas en el tratamiento, se realizó una prueba de chi cuadrado usando software estadístico Stata® 14.

Se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon para dos muestras, donde la variable que agrupaba era el número de biopsias. En cuanto al análisis entre las fases histopatológicas, el número de quimioterapias y los porcentajes de expresión inmunohistoquímica se realizó test de proporciones.

Para todas las pruebas estadísticas se estableció una probabilidad de cometer el error tipo I del 5% ($\alpha=0.05$). Los análisis se llevaron a cabo en un programa estadístico Stata 14®

7. RESULTADOS

7.1 Datos epidemiológicos, clínicos y respuesta al tratamiento

En total se recolectaron muestras de los 24 pacientes tratados, provenientes de Manizales y municipios cercanos del departamento de Caldas, al igual que otros de los departamentos de Risaralda y Valle del Cauca. El 67% (16/24) fueron hembras y el 33% (8/24) machos, los respectivos exámenes de químicas básicas de control estuvieron entre los rangos esperados para la evaluación de la función renal y hepática. Aunque los resultados obtenidos de la serie roja y blanca del hemograma fueron variables, la mayoría de estos estuvieron dentro de los valores normales y aquellos que salían de estos rangos los pacientes no presentaron una relación clínica que llevara a considerar detener el tratamiento. En caso de los valores plaquetarios, estos siempre se encontraron en niveles superiores a 200.000 células x 10³µL. Siendo este último uno de los valores principalmente tenido en cuenta como referencia antes de realizar cada una de las quimioterapias. Con respecto a la respuesta al tratamiento todos los pacientes mostraron una regresión tumoral total. En promedio los pacientes requirieron de 6 dosis del quimioterapéutico sulfato de vincristina a dosis de 0.05mg/m². Dentro de lo observado en la respuesta al tratamiento cabe resaltar que 9 animales (37,5%), mostraron una regresión tumoral total rápida, requiriendo máximo 4 quimioterapias, mientras que 15 restantes (62,5%) se recuperaron de una forma más lenta requiriendo entre 5-8 sesiones quimioterapéuticas. En todos los pacientes se evidencio después de las primeras semanas de tratamiento la eliminación de uno de los principales signos clínicos del TVTC, el sangrado genital. Los datos clínicos de los pacientes pueden observarse en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes de TVTC tratados e incluidos en este estudio.

N°	Sexo	Edad	Raza	B1	B2	Quimio	Procedencia
1	H	3	SRD	ER	LR	7	Cali
2	M	3	SRD	P	LR	8	Sta Rosa de Cabal
3	H	2	SRD	P	P	8	Palestina
4	M	8	SRD	P	ER	5	Cartago
5	H	6	SRD	P	LR	7	Arauca
6	H	4	SRD	P	----	4	Manizales
7	M	9	SRD	P	P	8	Cartago
8	H	2	SRD	ER	ER	6	Pereira
9	M	2	SRD	ER	----	5	Manizales
10	M	3	SRD	P	----	5	Manizales
11	H	2	SRD	P	ER	5	Filadelfia
12	H	3	SRD	P	ER	5	Filadelfia
13	M	3	SRD	P	ER	7	Pereira
14	H	2	Husky	P	----	4	Manizales
15	M	4	Labrador	P	ER	6	Marquetalia
16	H	3	SRD	P	----	4	Manizales
17	H	5	SRD	P	----	4	Manizales
18	H	2	SRD	ER	ER	7	La Virginia
19	H	3	SRD	P	----	4	Manizales
20	H	6	SRD	P	----	4	La Virginia
21	M	5	SRD	P	ER	5	Cartago
22	H	4	SRD	P	P	7	Cartago
23	H	3	SRD	P	----	3	Risaralda
24	H	2	SRD	P	LR	5	Risaralda

Sexo: Hembra (H) Macho (M). Edad: Los valores representan años. Raza: Sin Raza Definida (SRD). Fases histopatológicas: Biopsia antes del tratamiento (B1), Biopsia durante el tratamiento (B2). Fase de proliferación

(P), Fase de regresión temprana (ER), Fase de regresión tardía (LR).
Quimio: Numero de quimioterapias. Procedencia: Ciudades y municipios de los departamentos de Caldas, Risaralda y Valle del Cauca.

7.2 Examen citológico

En todos los pacientes se logró un diagnóstico inicial citológico observando células redondas con citoplasma y núcleos bien definidos, estos núcleos redondos u ovalados, algunos de ellos con posición excéntrica de tamaño variable con cromatina gruesa y nucleolos prominentes, el citoplasma en la mayoría de las células presento vacuolas pequeñas y claras (Figura 3). Se evidencio características citomorfológicas de los tipos Linfocitoide y plasmocitoide. pero este tipo de clasificación no fue tomada en cuenta en este estudio.

7.3 Respuesta al tratamiento

El tratamiento con sulfato de Vincristina empleado en este estudio fue efectivo en todos los pacientes, mostrando una involución tumoral total en promedio después de 6 sesiones de quimioterapia. No se observó ningún caso de resistencia al tratamiento. Los pacientes tratados estuvieron en un rango entre 3-8 sesiones.

7.4 Clasificación histopatológica

Se realizo la clasificación de las fases histopatológicas en todas las muestras de TVTC obtenidas antes y durante el tratamiento. Determinando que las muestra B1 (antes del tratamiento), el 83,3% (20/24) se encontraban en fase de Progresión y el 16,7% (4/24) en fase de regresión (todos en regresión temprana). Mientras que el caso de las muestras B2 (durante tratamiento), el 20% (3/15) estaban en fase de progresión y el 80% (12/15) en fase de regresión (Grafico 1).

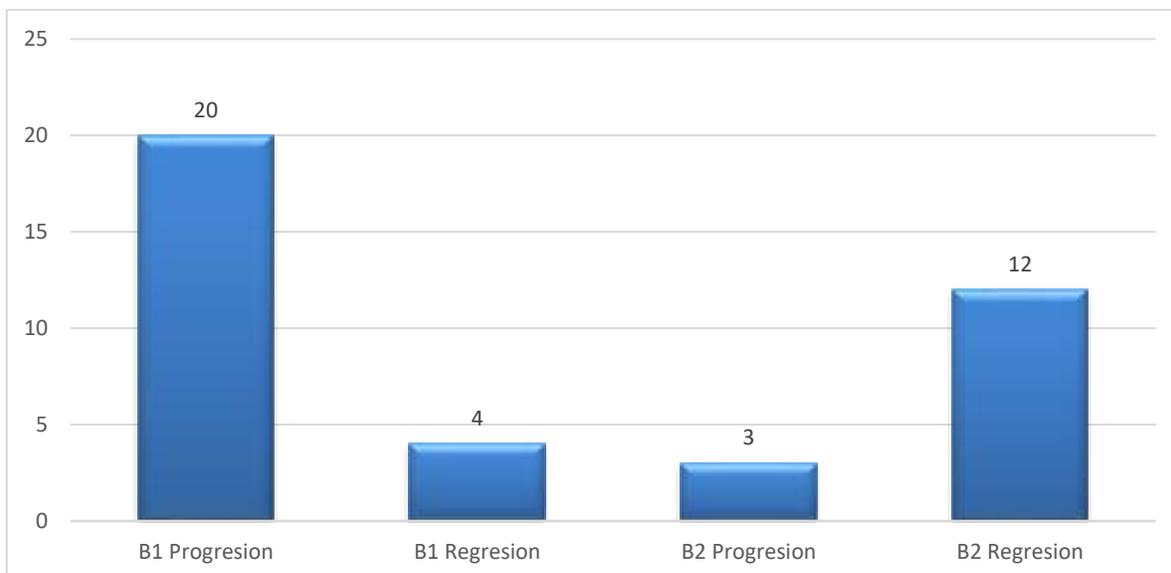


Grafico 1. Número de casos por fases de clasificación histopatológica. (B1) biopsia antes de empezar tratamiento. (B2) biopsia durante el tratamiento.

7.5 Análisis Molecular qPCR

7.5.1 Detección LINE-1/c-myc

Se realizó la técnica de qPCR para detectar el reordenamiento LINE-1/c-myc, que está presente en el genoma de todas las células de TVTC (Amariglio et al. 1991; Choi et al. 1999; Katzir et al. 1985). Los resultados mostraron la detección del reordenamiento LINE-1/c-myc en las 24 muestras de TVTC B1, igualmente se detectó en las 15 muestras de TVTC B2. Este reordenamiento no se detectó en ninguna de las muestras de piel de los respectivos huéspedes (Grafico 2).

7.5.2 Detección CDKN2A

Los resultados mostraron niveles muy bajos de CDKN2A en las muestras de las biopsias de TVTC (B1 y B2), esto debido a la delección homocigótica de este gen en las muestras de TVTC (Baez-Ortega et al. 2019; Murchison et al. 2014). Este resultado podría haberse dado a una posible contaminación de las muestras tumorales por otros tipos de células del hospedero. Por el contrario, los resultados de las muestras de piel de los huéspedes mostraron niveles muy altos de CDKN2A (Grafico 3).

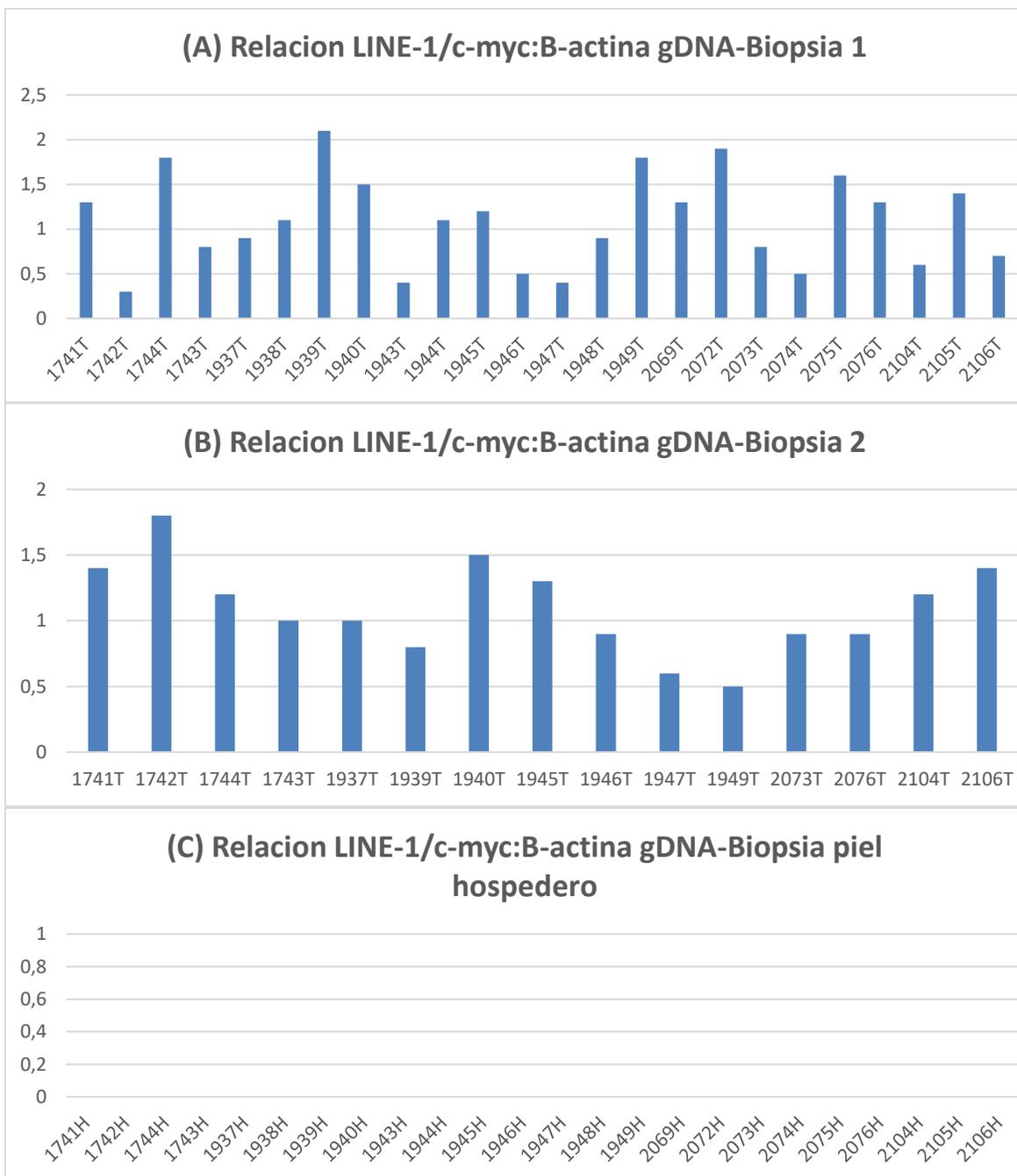


Gráfico 2. Graficas de la detección de reordenamiento LINE-1/c-myc del gDNA de las diferentes muestras procesadas por la técnica qPCR. (A) Detección del reordenamiento LINE-1/c-myc en todas las muestras de TVTC antes de iniciar tratamiento. (B) Detección del reordenamiento LINE-1/c-myc en las 15 muestras TVTC durante el tratamiento. (C) No hubo detección en ninguna de las muestras de piel de los hospederos correspondientes. Los números de identificación fueron asignados en el laboratorio del grupo de investigación en cáncer transmisible de la Universidad de Cambridge. Esta identificación fue seguida de la letra T(tumor) y H (hospedero).

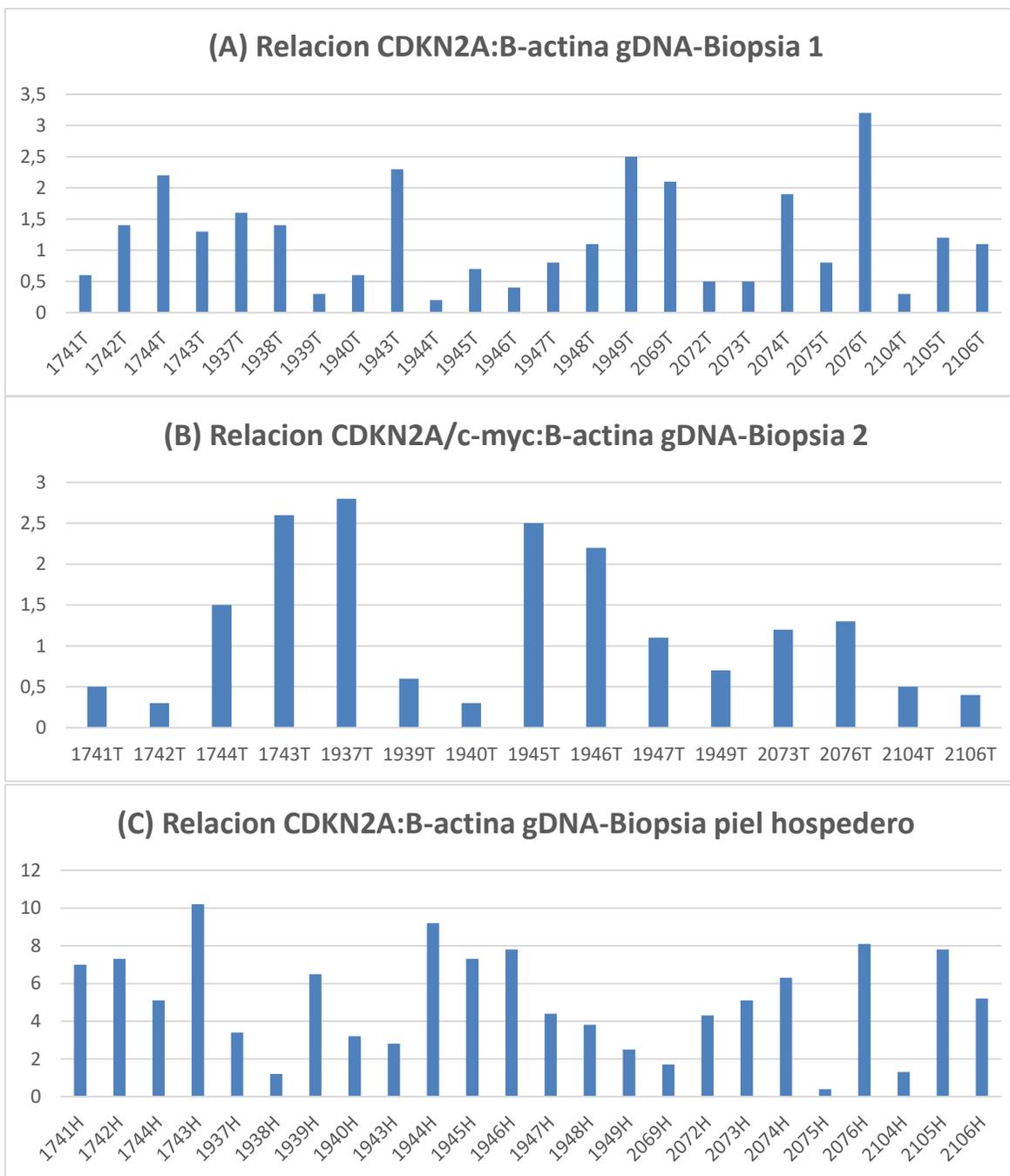
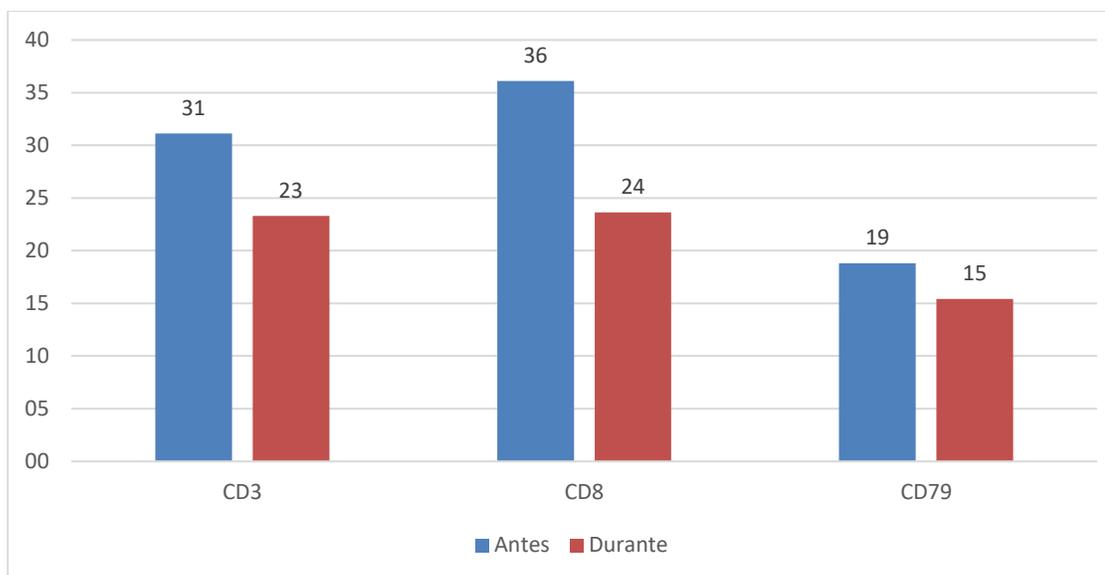


Grafico 3. Graficas de la detección de CDKN2A del gDNA de las diferentes muestras procesadas por la técnica qPCR. (A) Detección de niveles bajos del gen CDKN2A en todas las muestras de TVTC antes de iniciar tratamiento. (B) Detección de niveles bajos del gen CDKN2A en las 15 muestras TVTC durante el tratamiento. (C) Detección de niveles relativamente altos en comparación con las muestras tumorales del gen CDKN2A en todas las muestras de piel de los hospederos correspondientes. Los números de identificación fueron asignados en el laboratorio del grupo de investigación en cáncer trasmisible de la Universidad de Cambridge. Esta identificación fue seguida de la letra T(tumor) y H (hospedero).

7.6 Expresión Inmunohistoquímica

7.6.1 Marcación porcentual CD3, CD8 y CD79

Para cada anticuerpo la marcación inmunohistoquímica promedio porcentual mostro; el CD3 se encontró una marcación para B1 antes del tratamiento de (31%) y B2 durante el tratamiento (23%). Para CD8 la marcación de B1 fue (36%) y de B2 (24%). En el caso de CD79 la marcación de B1 mostro un (19%) y B2 (15%) (Grafico 4).



Grafica 4. Distribución promedios porcentuales de marcación inmunohistoquímica de los anticuerpos CD3, CD8 y CD79 antes y durante el tratamiento quimioterapéutico.

Aunque en los 3 anticuerpos se observa una disminución en el promedio porcentual de células marcadas, entre B1 y B2 no se evidencio una diferencia estadísticamente significativa debido a que ninguno mostro un Valor de $p < 0,05$ (Tabla 4).

Tabla 4. Promedios de porcentaje de marcación CD3, CD8 y CD79

Anticuerpo	Antes (B1)	Durante (B2)	p-valor
CD3	31	23	0,47
CD8	36	24	0,38
CD79	19	15	0,85

Promedios de los porcentajes de marcación obtenidos en cada una de las biopsias B1 y B2.

Comparación entre fases histopatológicas y la marcación inmunohistoquímica

En la clasificación de todas las biopsias analizadas solo se presentaron 4 casos en Regresión tardía (B2) frente a 12 casos de regresión temprana (4 B1 y 8 B2) se determinó unir ambas fases histopatológicas regresión temprana y tardía, denominándose regresión.

En el caso de B1 clasificadas en fase de Progresión se observó una diferencia estadística significativa para CD79 ya que presentó un porcentaje de marcación menor en comparación con CD3 ($p=0,03$) y CD8 ($p=0,02$). No existe diferencia estadística significativa entre estos dos últimos anticuerpos ($p=0,77$).

En el caso B1 clasificadas en fase de regresión, no se encontró diferencia estadística significativa al comparar CD3 frente CD8 ($P=0,79$), en este caso no se pudo calcular CD79 debido a que solo presentó un dato que no era representativo.

Para B2 clasificadas en fase de progresión CD3 y CD8 ($p=0,74$) no presentaron diferencia estadística significativa al compararse ambas marcaciones, igualmente para este caso CD79 no se pudo calcular debido a que presentó un solo dato.

Para B2 clasificadas en fase de regresión se encontró una diferencia estadística significativa para el CD79 ya que presentó un porcentaje de marcación menor en comparación con CD3 ($p=0,04$) y CD8 ($p=0,04$). No existe diferencia estadística significativa entre estos dos últimos anticuerpos ($P=0,91$). (Tabla 5).

Sin importación el momento de marcación B1 o B2 ni la fase histopatología de progresión o regresión CD3 no mostro diferencia estadística significativa. En la misma comparación para CD8 se observó diferencia estadística significativa ya que el porcentaje de marcación fue mayor en la fase de regresión en comparación con la fase de proliferación tanto en B1 ($p=0,04$) como en B2 ($p=0,04$). Además, Cd79 no mostro diferencia significativa entre los dos momentos que se logró medir B1 fase proliferación frente B2 fase de regresión. (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación fases histopatológicas y marcación inmunohistoquímica.

Biopsia	Histopatología	CD3	CD8	CD79
B1	P	29.6 ^{aA}	34.1 ^{aA}	18.9 ^{bA}
	R	38.5 ^{aA}	46.2 ^{aB}	*
B2	P	22.2 ^{aA}	17.4 ^{aC}	*
	R	23.6 ^{aA}	25.2 ^{aA}	17.3 ^{bA}

* No se pudo calcular debido a que solo es un dato. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, la comparación en minúsculas se hace por fila entre el estado histopatológico y en mayúsculas por columna comparando la expresión con la respectiva biopsia. Valor de $p<0,05$.

Comparación entre duración del tratamiento y la marcación inmunohistoquímica

En este análisis inicialmente se compararon los resultados de B1 de los 24 pacientes tratados. Se hizo necesario formar 2 grupos de acuerdo al tiempo de respuesta al tratamiento. De esta manera los pacientes que requirieron entre 1 y 4 sesiones de quimioterapia conformaron el grupo de respuesta rápida y correspondieron al 29% (7/24 caninos), y el 71% (17/24) conformaron el grupo de respuesta lenta, requiriendo entre 5 y 8 dosis de tratamiento (Tabla 6). posteriormente se realizó un análisis comparativo entre la marcación obtenida entre las biopsias B1 y B2 en los 17 casos del grupo de respuesta lenta (Tabla 7).

El grupo de pacientes que mostraron respuesta rápida presentaron niveles de marcación más bajos en los 3 anticuerpos CD3, CD8 y CD79 en comparación con el grupo de respuesta lenta. CD3 y CD8 mostraron diferencia estadística significativa, mientras que en el caso CD79 no mostro ninguna diferencia (Tabla 6).

En las muestras B1 analizadas de los pacientes que presentaron una respuesta rápida se observó una mayor marcación de CD8 mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con CD3 y CD79. Mientras que este mismo análisis en el grupo de pacientes de respuesta lenta presento una marcación menor de CD79 presentando diferencia estadísticamente significativa con respecto a la CD3 y CD8. No hubo diferencias entre estos dos últimos anticuerpos (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación respuesta al tratamiento y marcación inmunohistoquímica.

Tratamiento	CD3	CD8	CD79
B1 Respuesta rápida.	19.7 ^{aA}	24.7 ^{bA}	15.2 ^{aA}
B1 Respuesta lenta.	37.3 ^{aB}	40.8 ^{aB}	20.4 ^{bA}

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, la comparación en minúsculas se hace por fila entre la duración del tratamiento y en mayúsculas por columna comparando la expresión con la respectiva biopsia. Valor de $p < 0,05$.

Al comparar la B1 y B2 en los pacientes del grupo de respuesta lenta, se pudo observar niveles de marcación mayores para los 3 anticuerpos CD3, CD8 y CD79 en las biopsias antes de iniciar tratamiento. Mostrando una diferencia estadística significativa para CD3 y CD8. Mientras que no hubo diferencia para CD79 (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación respuesta lenta y marcación inmunohistoquímica

Tratamiento	CD3	CD8	CD79
B1 Respuesta lenta.	37.3 ^{aA}	40.8 ^{aA}	20.4 ^{bA}
B2 Respuesta lenta.	23.32 ^{aB}	23.62 ^{aB}	15.42 ^{bA}

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa, la comparación en minúsculas se hace por fila entre la muestra antes y durante el tratamiento, y en mayúsculas por columna comparando la expresión con la respectiva biopsia. Valor de $p < 0,05$.

En resumen, los resultados de la marcación inmunohistoquímica mostraron que los anticuerpos CD3, CD8 y CD79 presentan en general una disminución al compararse B1 con B2.

Al comparar las fases histopatológicas de progresión y regresión con la marcación inmunohistoquímica se evidencio una diferencia de CD79, donde mostro ser más baja que los otros dos anticuerpos. En cambio, para el caso CD8 presento una marcación mayor en la fase de regresión en ambos momentos B1 y B2.

Por último, al comparar la duración del tratamiento y la marcación Inmunohistoquímica, se evidencio una diferencia al observarse mayor marcación de CD3 y CD8 en el grupo de respuesta lenta en comparación con el grupo de respuesta rápida en B1. Al realizarse esta misma comparación entre B1 y B2 solo para el grupo de respuesta lenta, se evidencio una diferencia de CD3 y CD8 al mostrar una marcación mayor en las biopsias antes del tratamiento en comparación con las durante el tratamiento.

8. DISCUSIÓN

Los caninos analizados en este estudio mostraron diferentes características macroscópicas de TVTC que iban desde una forma nodular, papilar, multilobulada o en forma de coliflor que se observó en algunos machos. Coincidiendo con lo descrito por (Das and Das 2000; Ganguly et al. 2013) quienes definen estas formas como características clínico patológicas a tener en cuenta a la hora de realizar el examen físico de TVTC. Algunos reportes de caso muestran diferentes ubicaciones anatómicas del TVTC primario extragenitales principalmente piel, cavidad oral o nasal (Ojeda et al. 2018; Rezaei et al. 2016; Rocha, Tremori, and Carneiro 2014), Los 24 pacientes de esta investigación presentaron solamente ubicación de las masas en la región genital, siendo este uno de los criterios de inclusión dentro del estudio. En la literatura veterinaria, se ha informado la aparición de metástasis en los cuales el foco primario de TVTC es genital, afectando después de diseminarse mucosa nasal u oral, piel, tejido subcutáneo, ojos, órganos internos y sistema nervioso central (Albanese et al. 2006; Ferreira et al. 2000; Ojeda et al. 2016), Todos los pacientes de este estudio fueron sometidos a evaluaciones clínicas completas antes y durante el tratamiento descartando la presencia de alguna sospecha medica de metástasis. Además, la mayoría de estas fueron hembras mestizas 67%(16/24), mostrando mayor predisposición para este género y raza, datos similares a los trabajos de (Amaral et al. 2007; Brandão et al. 2002; Valençola et al. 2015) este resultado puede deberse a que la mayoría de pacientes eran procedentes de albergues donde se han rescatado los perros en condición de calle sin ningún tipo de control reproductivo previo, favoreciendo esta condición la trasmisión del TVTC principalmente en las hembras al ser receptivas a varios machos durante el coito. En cuanto al factor de edad esta enfermedad usualmente ocurre en animales en la etapa reproductiva entre 2-8 años (Das and Das 2000; Ganguly et al. 2013) resultados muy similares se encontraron en el presente estudio donde el promedio de edad representado en años fue de 3,7. Donde los perros más jóvenes estuvieron en los 2 años y el más longevo reporto 9 años.

Respecto al diagnóstico microscópico confirmatorio inicial antes del tratamiento, en esta investigación se realizó la citología solo con este fin, logrando observar todas las características citomorfológicas previamente descritas en este trabajo y las cuales son basadas en diferentes autores (Amaral et al. 2004, 2007; Cowell and Tyler 1989; Duncan and Prasse 1979; Thangathurai et al. 2008), Aunque no se tuvo en cuentas la clasificación citomorfológica Linfocitoide, plasmocitoide y mixto para el análisis de los datos de este estudio, cabe resaltar que esta se realizó en conjunto con otro estudio de TVTC con fin de correlacionar la citomorfología y histopatología con el tiempo de tratamiento, resultados en vía de publicación (ver anexos). La clasificación histopatológica mostro que antes del inicio del tratamiento el 83%

estaban en fase de progresión y el 17% en fase de regresión, similar al 77% en progresión y el 23% en regresión observado por (Fêo Ballesteros et al. 2018), y diferente a otros autores quienes reportan 57% en progresión, 33% en regresión y 10% no identificable (Alzate et al. 2019) y el 100% de los caninos en progresión en el trabajo de (Karakurt et al. 2020).

Igualmente todas las biopsias tomadas a los pacientes fueron confirmadas para TVTC a través de pruebas de qPCR donde mostraron valores de amplificación genómica confirmatorios para LINE-1/c-myc y la nula o baja amplificación de CDKN2A siguiendo las metodologías usadas y obteniendo similares resultados como los estudios de (Castro et al. 2016; Frampton et al. 2018; Strakova et al. 2020). El reordenamiento genómico LINE-1/c-myc al ser específico para esta neoplasia es considerado un marcador molecular del TVTC (Murgia et al. 2006; vonHoldt and Ostrander 2006). Otra particularidad genómica del TVTC es la delección homocigótica del CDKN2A, el cual debe encontrarse ausente en todas las células de TVTC (Murchison et al. 2014; Strakova and Murchison 2015). Por lo tanto, los niveles detectados de CDKN2A en este estudio en las células de TVTC parece atribuibles a la contaminación en el momento de la toma de la muestra por cualquier otro tipo de célula somática del paciente.

Referente al tratamiento en todos los pacientes se realizó quimioterapia con sulfato de Vincristina a dosis de 0,5mg/m² semanalmente, todos los casos mostraron regresión total tumoral, coincidiendo con lo reportado por (Amber et al. 1990; Hantrakul et al. 2014; Scarpelli et al. 2010). En el caso de este estudio no se presentó ningún caso presuntivo de resistencia al tratamiento empleado, ni fue necesario usar otro tipo de medicamento o terapia, diferente a lo observado por (Macotpet, Pattarapanwichien, and Suksawat 2019; Rogers et al. 1998) quienes reportar el uso de radioterapia, doxorubicina y L-asparagenasa como alternativas en aquellos casos de resistencia a la Vincristina.

Al analizar la respuesta inmune mediada por subpoblaciones de Linfocitos a través de marcación inmunohistoquímica de CD3, CD8 y CD79 se pudo evidenciar la relación que estos tuvieron y como se comportó el efecto de infiltrado intratumoral antes y durante el tratamiento, al igual que la relación que este pueda tener con la fase histopatológica en la que se encontraba. Aunque el infiltrado intratumoral linfocitario es considerado una de las acciones de respuesta inmunitaria contra el cáncer, aún existe controversia acerca de si los linfocitos T realizan una participación central en la respuesta inmune antineoplásica (Gajewski et al. 2006). En la regresión del TVTC sea de origen natural o trasplantado experimentalmente se asocia con intensas infiltraciones locales de linfocitos (Mizuno et al. 1989; Yang et al. 1987), Estas y otras características del microambiente tumoral del TVTC han

sido utilizadas a través del tiempo como un interesante modelo para estudiar los mecanismos que se desencadenan en la regresión tumoral.

Los resultados del presente estudio mostraron que tanto antes como durante el tratamiento los Linfocitos B CD79 (LB CD79) se encuentran en menor proporción significativa en comparación con los Linfocitos T CD3 (LT CD3) y los Linfocitos T CD8 (LT CD8), además de que no se observa ninguna diferencia en el infiltrado de esta subpoblación entre las fases de progresión y regresión. Este resultado difiere de (Chandler and Yang 1981) quienes obtuvieron un mayor porcentaje de infiltración de LB CD79 en la fase de progresión comparado con la fase de regresión. Otros estudios observaron resultados contrarios ya que las infiltraciones de LB CD79 fueron mayores en la fase de regresión al realizar la misma comparación (Pérez et al. 1998; Trompieri-Silveira et al. 2009), igualmente se ha encontrado negatividad en el TVTC para anticuerpos CD79 (Mascarenhas et al. 2017). Estas diferencias podrían atribuirse a las metodologías empleadas en cada uno de los estudios y al uso de diferentes anticuerpos como por ejemplo monoclonales mientras que en el presente estudio se usó policlonal para este caso puntual.

Entretanto para los LT CD3 los hallazgos de (Chandler and Yang 1981; Mizuno et al. 1989; Pérez et al. 1998) mostraron proporciones significativamente mayores en el infiltrado intratumoral del TVTC en la fase de regresión en comparación con la fase de progresión. Lo que los llevo a sugerir que estos cambios de respuesta por parte de LT CD3 podría tener una participación directa en la regresión espontanea o post tratamiento del TVTC. Estos datos difieren de lo descrito por (Trompieri-Silveira et al. 2009) quienes obtuvieron la misma proporción de LT CD3 en la fase de progresión y regresión. Este último resultado coincide con el presente estudio donde la proporción de marcación de LT CD3 no mostro ninguna diferencia significativa entre las dos fases histopatológicas. Sugiriendo que esta subpoblación linfocítica participa en la respuesta inmunológica de esta neoplasia, pero no necesariamente puede ser considerada la responsable de la regresión tumoral.

En relación a la subpoblación de LT CD8, es importante resaltar que no mostro diferencia significativa en relación con LT CD3 en lo que respecta al momento de la medición o la fase histopatológica. Aunque fue interesante observar en la presente investigación que su cantidad proporcional aumento significativamente durante la fase de regresión en comparación con la fase de progresión en ambos momentos antes y durante el tratamiento con Vincristina (Ver tabla 5). Similar observación obtuvieron (Gonzalez et al. 2000) demostrando que el número de LT CD8 fue significativamente mayor durante la fase de regresión. Contrario a los resultados de (Trompieri-Silveira et al. 2009) donde LT CD8 presento un aumento significativo en la fase de progresión en comparación con la fase de regresión. Este resultado podría hipotetizar que las subpoblaciones LT CD3, LT CD8 y LB CD79, aunque

infiltran el TVTC en los diferentes momentos y fases histopatológicas, son realmente los LT CD8 de mayor acción en la fase donde el tumor empieza a presentar reducción de su tamaño. Jugando un importante papel inmunológico en la regresión del TVTC.

Al realizar la comparación entre la respuesta al tratamiento y la marcación inmunohistoquímica, se observó que tanto el grupo de respuesta rápida como respuesta lenta, mostraron mayor infiltración de las subpoblaciones de LT CD3 y LT CD8 en comparación con LB CD79. Además, se encontró mayor infiltración intratumoral de LT CD3 y LT CD8 en los pacientes que tuvieron una respuesta lenta al tratamiento en comparación al grupo de respuesta rápida, contrario a la conclusión de la investigación de (Hsiao et al. 2002) quienes relacionaron el aumento de la expresión del CMH por parte de las células de TVTC con el aumento de subpoblaciones de LT favoreciendo la regresión tumoral. Se debe tener en cuenta que la investigación en mención se realizó en caninos infectados experimentalmente. Este resultado nos permite concluir que a mayor infiltrado intratumoral por parte de las subpoblaciones de LT mayor tiempo de tratamiento y número de quimioterapias requeridas para lograr la regresión total del TVTC.

Finalmente, el análisis de la marcación inmunohistoquímica obtenida solo en el grupo clasificado como respuesta lenta comparando la infiltración de las subpoblaciones linfocitarias antes y durante el tratamiento se encontró que los LT CD3 y LT CD8 muestran una reducción significativa durante la cuarta semana de tratamiento, contrario a lo reportado por (Chang et al. 2017; Gonzalez et al. 2000) quienes observaron durante la regresión del TVTC inducida por la quimioterapia que tanto el porcentaje como el número absoluto de linfocitos aumentaron. El resultado obtenido en este trabajo sugiere que el uso del sulfato de vincristina, aunque es efectivo en tratamiento contra el TVTC al mismo tiempo disminuye la respuesta inmune por parte de las subpoblaciones de LT generando un efecto que retrasa la regresión del TVTC prolongando el tiempo de tratamiento y aumentando el número de sesiones quimioterapéuticas requeridas. Otra posible hipótesis es que a mayor infiltrado intratumoral por parte de las subpoblaciones de LT CD3 y LT CD8 antes de iniciar tratamiento menor efecto farmacológico del sulfato vincristina sobre las células de TVTC.

9. CONCLUSIONES

En las condiciones que se desarrolló el presente trabajo se puede concluir:

- a. La subpoblación de Linfocitos B CD79 son los de menor participación en la respuesta intratumoral para el TVTC y no presentan cambios durante la quimioterapia.
- b. La subpoblación de linfocitos T CD8 mostro mayor infiltración intratumoral en la fase de regresión sin importar si la medición fue antes o durante el tratamiento.
- c. Las subpoblaciones linfocitarias LT CD3 y LT CD8 presentaron mayor marcación en las muestras de los pacientes con respuesta lenta antes de iniciar tratamiento.
- d. Las subpoblaciones linfocitarias LT CD3 y LT CD8 presentaron menor marcación en las muestras de los pacientes con respuesta rápida antes de iniciar tratamiento.
- e. En el grupo de pacientes clasificados de respuesta lenta al tratamiento, la comparación de la marcación inmunohistoquímica de las subpoblaciones linfocitarias LT CD3 y LT CD8 mostro una disminución significativa después de tercera semana del inicio de las quimioterapias.
- f. La quimioterapia sulfato de vincristina para el tratamiento del TVTC podría generar una disminución en el infiltrado intratumoral por parte de los linfocitos T alargando el tiempo necesario para observarse la regresión tumoral total.

10. REFERENCIAS

- Adachi, Susumu, Alvaro J. Obaya, Zhiyong Han, Noemi Ramos-Desimone, James H. Wyche, and John M. Sedivy. 2001. "C-Myc Is Necessary for DNA Damage-Induced Apoptosis in the G2 Phase of the Cell Cycle." *Molecular and Cellular Biology* 21(15):4929–37.
- Albanese, F., F. L. Salerni, S. Giordano, and L. Marconato. 2006. "Extragenital Transmissible Venereal Tumour Associated with Circulating Neoplastic Cells in an Immunologically Compromised Dog." *Veterinary and Comparative Oncology* 4(1):57–62.
- Albanese, Francesco, Alessandro Poli, Francesca Millanta, and Francesca Abramo. 2002. "Primary Cutaneous Extragenital Canine Transmissible Venereal Tumour with Leishmania-Laden Neoplastic Cells: A Further Suggestion of Histiocytic Origin?" *Veterinary Dermatology* 13(5):243–46.
- Alzate, Juliana M., Luis M. Montoya-florez, Jorge E. Pérez, Noeme S. Rocha, and Francisco J. Pedraza-ordonez. 2019. "The Role of the Multi-Drug Resistance 1 , P53 , b Cell Lymphoma 2 , and Bcl 2-Associated X Genes in the Biologic Behavior and Chemotherapeutic Resistance of Canine Transmissible Venereal Tumors." *Veterinary Clinical Pathology* (February):1–10.
- Amaral, Anne, Sandra Bassani-silva, Isabelle Ferreira, Luciano Santos, Fabio Henrique, Evangelista De Andrade, Luiz Fernando, Jantzen Gaspar, and Noeme Sousa Rocha. 2007. "Cytomorphological Characterization of Transmissible Canine Venereal Tumor Caracterização Citomorfológica Do Tumor Venéreo Transmissível Canino." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 102:253–60.
- Amaral, Anne S., Luiz Fernando J. Gaspar, Sandra B. Silva, and Noeme S. Rocha. 2004. "Diagnóstico Citológico Do Tumor Venéreo Transmissível Na Região de Botucatu , Brasil (Estudo Descritivo : 1994-2003)." *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 99(551):167–71.
- Amariglio, E. N., I. Hakim, F. Brok-Simoni, Z. Grossman, N. Katzir, A. Harmelint, B. Ramot, and G. Rechavi. 1991. "Identity of Rearranged LINE/c-MYC Junction Sequences Specific for the Canine Transmissible Venereal Tumor (Transposable Elements/Oncogene/Polymerase Chain Reaction)." *Medical Sciences* 88(September):8136–39.
- Amber, E. I., R. A. Henderson, J. B. Adeyanju, and E. Gyang. 1990. "Single-Drug Chemotherapy of Canine Transmissible Venereal Tumor With or Vincristine." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4(3):144–47.
- Arcila-villa, Antony, Carmen Dussan-lubert, and Francisco Pedraza. 2017. "Original Articles Articles Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Distribution and Prevalence of Transmissible Venereal Tumor In." *Revista Colombiana de*

- Baez-Ortega, Adrian, Kevin Gori, Andrea Strakova, Janice L. Allen, Karen M. Allum, Leontine Bansse-Issa, Thinlay N. Bhutia, Jocelyn L. Bisson, Cristóbal Briceño, Artemio Castillo Domracheva, Anne M. Corrigan, Hugh R. Cran, Jane T. Crawford, Eric Davis, Karina F. De Castro, Andriago B. De Nardi, Anna P. De Vos, Laura Delgadillo Keenan, Edward M. Donelan, Adela R. Espinoza Huerta, Ibikunle A. Faramade, Mohammed Fazil, Eleni Fotopoulou, Skye N. Fruean, Fanny Gallardo-Arrieta, Olga Glebova, Pagona G. Gouletsou, Rodrigo F. Häfelin Manrique, Joaquim J. G. P. Henriques, Rodrigo S. Horta, Natalia Ignatenko, Yaghouba Kane, Cathy King, Debbie Koenig, Ada Krupa, Steven J. Kruzeniski, Young Mi Kwon, Marta Lanza-Perea, Mihran Lazyan, Adriana M. Lopez Quintana, Thibault Losfelt, Gabriele Marino, Simón Martínez Castañeda, Mayra F. Martínez-López, Michael Meyer, Edward J. Migneco, Berna Nakanwagi, Karter B. Neal, Winifred Neunzig, Máire Ní Leathlobhair, Sally J. Nixon, Antonio Ortega-Pacheco, Francisco Pedraza-Ordoñez, Maria C. Peleteiro, Katherine Polak, Ruth J. Pye, John F. Reece, Jose Rojas Gutierrez, Haleema Sadia, Sheila K. Schmeling, Olga Shamanova, Alan G. Sherlock, Maximilian Stammnitz, Audrey E. Steenland-Smit, Alla Svitich, Lester J. Tapia Martínez, Ismail Thoya Ngoka, Cristian G. Torres, Elizabeth M. Tudor, Mirjam G. Van Der Wel, Bogdan A. Vițălaru, Sevil A. Vural, Oliver Walkinton, Jinhong Wang, Alvaro S. Wehrle-Martinez, Sophie A. E. Widdowson, Michael R. Stratton, Ludmil B. Alexandrov, Iñigo Martincorena, and Elizabeth P. Murchison. 2019. "Somatic Evolution and Global Expansion of an Ancient Transmissible Cancer Lineage." *Science* 365(6452).
- Banfield, W. G., Woke, P. A., MacKay, C. M., & Cooper, H. L. 1965. "Mosquito Transmission of a Reticulum Cell Sarcoma of Hamsters." *Science* 148(1960):1239–40.
- Batamuzi, E. K., and B. M. Kessy. 1993. "1 Role of Exfolia- Tive Cytology in the Diagnosis Transmissible Venereal Turnour." *Journal of Small Animal Practice* 34:399–401.
- Belov, Katherine. 2011. "The Role of the Major Histocompatibility Complex in the Spread of Contagious Cancers." *Mammalian Genome* 22:83–90.
- Blaine, D.P. 1810."A domestic treatise on the diseases of horses and dogs." London. T. Boosey.
- Booth, M. J. 1994. "Canine Transmissible Venereal Tumour and Ovarian Papillary Carcinoma in a Bitch." *Journal of Small Animal Practice* 35:39–42.
- Boscos, C. M., and H. N. Ververidis. 2004. "Canine TVT--Clinical Findings, Diagnosis and Treatment." *WSAVA* 1–4.
- Brandão, Claudia Valéria, Alessandra Gonçalves Borges, JoséJoaquin Tilton Ranzani, Carlos Roberto Teixeira, Sheila Canevese Rahal, and Noeme Sousa Rocha. 2002. "Tumor Venéreo Transmissível: Estudo Retrospectivo de 127

- Casos (1998 - 2000).” *Continuous Education Journal CRMV-Sp* 5(1):25–31.
- Bravo T, Diana, Pablo Cruz-Casallas, and Julieta Ochoa A. 2010. “Prevalencia de Neoplasias En Caninos En La Universidad de Los Llanos, Durante 2004 a 2007.” *Revista MVZ Cordoba* 15(1):1925–37.
- Caniatti, M., P. Roccabianca, E. Scanziani, S. Paltrinieri, and P. F. Moore. 1996. “Canine Lymphoma: Immunocytochemical Analysis of Fine-Needle Aspiration Biopsy.” *Veterinary Pathology* 33(2):204–12.
- Castro, K. F., A. Strakova, M. Tinucci-Costa, and E. P. Murchison. 2016. “Evaluation of a Genetic Assay for Canine Transmissible Venereal Tumour Diagnosis in Brazil.” *Veterinary and Comparative Oncology* 10–13.
- Castro, K. F., A. Strakova, M. Tinucci-Costa, and E. P. Murchison. 2017. “Evaluation of a Genetic Assay for Canine Transmissible Venereal Tumour Diagnosis in Brazil.” *Veterinary and Comparative Oncology* 15(2):615–18.
- Catone, G., G. Marino, G. Poglayen, M. Gramiccia, and A. Ludovisi. 2003. “Short Communication Canine Transmissible Venereal Tumour Parasitized by *Leishmania Infantum*.” *Veterinary Research Communications* 27:549–53.
- Chandler, J. P., and T. Yang. 1981. “CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL SARCOMA: DISTRIBUTION OF T AND B LYMPHOCYTES IN BLOOD, DRAINING LYMPH NODES AND TUMOURS AT DIFFERENT STAGES OF GROWTH.” *British Journal of Cancer* 44:514–21.
- Chang, Shih-chieh, Yeh-ku Chen, Yu-chun Cheng, Yi-chen Chen, and Jiunn-wang Liao. 2017. “TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES AND P-GLYCOPROTEIN / MELANOMA ANTIGEN A EXPRESSION IN VINCRISTINE-TREATED CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMORS.” *Taiwan Veterinary Journal* 43(4):285–93.
- Choi, Y., N. Ishiguro, M. Shinagawa, C. J. Kim, Y. Okamoto, S. Minami, and K. Ogihara. 1999. “Molecular Structure of Canine LINE-1 Elements in Canine Transmissible Venereal Tumor.” *Animal Genetics* 30(1):52–53.
- Chou, Pei Chung, Tien Fu Chuang, Tong Rong Jan, Hsin Chan Gion, Yi Chun Huang, Han Jon Lei, Win Yin Chen, and Rea Min Chu. 2009. “Effects of Immunotherapy of IL-6 and IL-15 Plasmids on Transmissible Venereal Tumor in Beagles.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130(1–2):25–34.
- Chu, R. M., T. J. Sun, H. Y. Yang, D. G. Wang, K. W. Liao, T. F. Chuang, C. H. Lin, and W. C. Lee. 2001. “Heat Shock Proteins in Canine Transmissible Venereal Tumor.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82(1–2):9–21.
- Cizmecci, S. U., A. M. Kose, I. Aydin, Dursun Ali Dinc, Mehmet Maden, and S. I. Kose. 2012. “Clinical Efficiency of Doxorubicin and Cisplatin in Treatment of Transmissible Venereal Tumor.” *Revue Medicine Veterinaire* 163(November):516–21.

- Cohen, D. 1985. *The Canine Transmissible Venereal Tumor: A Unique Result of Tumor Progression*. Vol. 43.
- Cole, M. D. 1986. "The Myc Oncogene: Its Role in Transformation and Differentiation." *Annual Review of Genetics* 20:361–84.
- Cowell, R. L., and R. D. Tyler. 1989. "Cytology of Cutaneous Lesions." *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 19(4):769–94.
- Dang, Chi V. 1999. "C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism." *Molecular and Cellular Biology* 19(1):1–11.
- Das, U., and A. K. Das. 2000. "Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma." *Veterinary Research Communications* 24(8):545–56.
- Duncan, J. ..., and K. .. Prasse. 1979. "Cytology of Canine Cutaneous Round Cell Tumors." *Vet.Sagepub.Com* 16:673–79.
- Fassati, Ariberto, and N. Avrion Mitchison. 2010. "Testing the Theory of Immune Selection in Cancers That Break the Rules of Transplantation." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59(5):643–51.
- Fêo Ballesteros, H., L. Flórez Montoya, R. S. Yamatogi, A. Prado Duzanski, J. P. Araújo Jr, R. A. Oliveira, and N. S. Rocha. 2018. "Does the Tumour Microenvironment Alter Tumorigenesis and Clinical Response in Transmissible Venereal Tumour in Dogs ?" *Veterinary and Comparative Oncology* (June 2017):1–9.
- Fernandez, N. J., K. H. West, M. L. Jackson, and B. A. Kidney. 2015. "Immunohistochemical and Histochemical Stains for Differentiating Canine Cutaneous Round Cell Tumors." *Veterinary Clinical Pathology* 42(2005):437–45.
- Ferreira, A. J. A., A. Jaggy, A. P. Varejão, M. L. P. Ferreira, J. M. J. Correia, J. M. Mulas, O. Almeida, P. Oliveira, and J. Prada. 2000. "Brain and Ocular Metastases from a Transmissible Venereal Tumour in a Dog." *Journal of Small Animal Practice* 41(4):165–68.
- Ferreira, Laiane, Alessandra Estrela-lima, Silva Solcà, Gabriel Saraiva, Diniz Gonçalves, Daniela Farias, Flaviane Alves, De Pinho, and Stella Maria Barrouin-melo. 2020. "Vincristine and Ivermectin Combination Chemotherapy in Dogs with Natural Transmissible Venereal Tumor of Different Cytomorphological Patterns : A Prospective Outcome Evaluation." *Animal Reproduction Science* 216(April):106358.
- Fonseca, Luciano S., Lígia S. L. S. Mota, Marcia M. Colodel, Isabelle Ferreira, Cláudia Valéria S. Brandão, and Noeme S. Rocha. 2012. "Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumor: Association between Different Phenotypes and the Insertion LINE-1/c-Myc." *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25(3):402–8.

- Frampton, Dan, Hagen Schwenzer, Gabriele Marino, Robin A. Weiss, Stephan Beck, Ariberto Fassati, Cristina Venturini, Rachel Austin, Karina Ferreira De Castro, Robin Ketteler, Benjamin Chain, and Richard A. Goldstein. 2018. "Molecular Signatures of Regression of the Canine Transmissible Venereal Tumor Article Molecular Signatures of Regression of the Canine Transmissible Venereal Tumor." *Cancer Cell* 33(4):620-633.e6.
- Fujinaga, T., M. Yamashita, M. C. Yoshida, S. Mizuno, Y. Okamoto, M. Tajima, and K. Otomo. 1989. "Chromosome Analysis of Canine Transmissible Sarcoma Cells." *Journal of Veterinary Medicine Series A* 36(1-10):481-89.
- Gajewski, Thomas F., Yuru Meng, Christian Blank, Ian Brown, Aalok Kacha, Justin Kline, and Helena Harlin. 2006. "Immune Resistance Orchestrated by the Tumor Microenvironment." *Immunological Reviews* 213(1):131-45.
- Ganguly, B., U. Das, and a. K. Das. 2013. "Canine Transmissible Venereal Tumour: A Review." *Veterinary and Comparative Oncology* 1-12.
- Gartel, Andrei L., and Ksenya Shchors. 2003. "Mechanisms of C-Myc-Mediated Transcriptional Repression of Growth Arrest Genes." *Experimental Cell Research* 283(1):17-21.
- Gaspar, Luis Fernando Jantzen, Isabelle Ferreira, Marcia Moleta Colodel, Cláudia Valéria Seullner Brandão, and Noeme Sousa Rocha. 2010. "Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumor: Cell Morphology and Influence on P-Glycoprotein Expression." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 34(5):447-54.
- Gaspar, Luiz Fernando Jantzen, Anne S. Amaral, Sandra Bassani-silva, and Noeme Sousa Rocha. 2009. "Imunorreatividade à Glicoproteína-p Nos Diferentes Tipos Citomorfológicos de Tumor Venéreo Transmissível Canino." *Veterinária Em Foco* 6(2):140-46.
- Girma, Birhan, and Mersha Chanie. 2015. "A Review on Canine Transmissible Venereal Tumor : From Morphologic to Biochemical and Molecular Diagnosis A Review on Canine Transmissible Venereal Tumor : From Morphologic to Biochemical and Molecular Diagnosis." *Academic Journal of Animal Diseases* 4(3):185-95.
- Gonzalez, C. M., S. M. Gri, D. K. Naydan, E. Flores, R. Cepeda, G. Cattaneo, and B. R. Madewell. 2000. "Canine Transmissible Venereal Tumour : A Morphological and Immunohistochemical Study of 11 Tumours in Growth Phase and during Regression after Chemotherapy." *Journal of Comparative Pathology* 122:241-48.
- HAMIR, A. N. 1985. "Primary Penile and Nasal Transmissible Venereal Tumours in a Dog." *Australian Veterinary Journal* 62(12):430-32.
- Hantrakul, Supannika, Narumol Klangkaew, Sunee Kunakornsawat, Tawewan

- Tansatit, A. Poapolathep, S. Kumagai, and S. Poapolathep. 2014. "Clinical Pharmacokinetics and Effects of Vincristine Sulfate in Dogs with Transmissible Venereal Tumor (TVT)." *Veterinary Medicine and Science* 76(12):1549–53.
- Harmelin, A., J. H. Pinthus, D. Friedmann-morvinski, K. Kaufman, and O. Brenner. 2002. "Lack of MHC Expression and Retention of Ultrastructural Characteristics by Xenograft Transmissible Venereal Tumor Cells in SCID Mice." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86:245–49.
- Hsiao, Ya-wen, Kuang-wen Liao, Shao-wen Hung, and Rea-min Chu. 2002. "Effect of Tumor Infiltrating Lymphocytes on the Expression of MHC Molecules in Canine Transmissible Venereal Tumor Cells." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87:19–27.
- Hsiao, Ya-Wen, Kuang-Wen Liao, Shao-Wen Hung, and Rea-Min Chu. 2004. "Tumor-Infiltrating Lymphocyte Secretion of IL-6 Antagonizes Tumor-Derived TGF-B1 and Restores the Lymphokine-Activated Killing Activity." *The Journal of Immunology* 172(3):1508–14.
- Hsiao, Ya Wen, Kuang Wen Liao, Tien Fu Chung, Chen Hsuan Liu, Chia Da Hsu, and Rea Min Chu. 2008. "Interactions of Host IL-6 and IFN- γ and Cancer-Derived TGF-B1 on MHC Molecule Expression during Tumor Spontaneous Regression." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 57(7):1091–1104.
- Idowu, A. L. 1984. "A Retrospective Evaluation of Four Surgical Methods of Treating Canine Transmissible Venereal Tumour." *Journal of Small Animal Practice* 25:193–98.
- Islam, Tariqul, A. F. M. Shahidullah, Shubhagata Das, Abdul Alim, and Shafiqul Islam. 2017. "Progressive Type Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT) in a Male Stray Dog." *International Journal of Natural and Social Sciences* 4(3):10–16.
- Kabuusu, R. M., D. F. Stroup, and C. Fernandez. 2010. "Risk Factors and Characteristics of Canine Transmissible Venereal Tumours in Grenada, West Indies." *Veterinary and Comparative Oncology* 8(1):50–55.
- Kanca, Halit, Gizem Tez, Kazim Bal, Dogukan Ozen, Eray Alcigir, and Sevil A. Vural. 2018. "Original Article Intratumoral Recombinant Human Interferon Alpha-2a and Vincristine Combination Therapy in Canine Transmissible Venereal Tumour." *Veterinary Medicine and Science* 4:364–72.
- Karakurt, Emin, Mushap Kuru, Serpil Dag, Enver Beytut, and Hilmi Nuhoglu. 2020. "Cytokeratin 5 / 6 Expression in Immunohistochemical Characterization of Dogs with Transmissible Venereal Tumors." *Turkish Veterinary Journal* 2(2):54–61.
- Katzir, Nurit, Gideon Rechavi, Justus Cohen, Tamar Unger, Frida Simoni, Shraga Segal, DAN Cohent, and David Givol. 1985. "Retroposon" Insertion into the

Cellular Oncogene c-Mnc in Canine Transmissible Venereal Tumor A /.”
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82(February):1054–58.

Kegler, K., A. Habierski, K. Hahn, S. P. Amarilla, F. Seehusen, and W. Baumgärtner. 2013. “Vaginal Canine Transmissible Venereal Tumour Associated with Intra-Tumoural Leishmania Spp. Amastigotes in an Asymptomatic Female Dog.” *Journal of Comparative Pathology* 149(2–3):156–61.

De la cruz, Susana Miguel, Israel A. Quijano-hernández, Javier Del Ángel-Caraza, José S. Martínez Castañeda, José M. Victoria-mora, and Marco A. Barbosa-mireles. 2015. “Respuesta Del Tumor Venéreo Transmisible Canino a Presentaciones de Vincristina de Patente y Genérica.” *Revista de Investigacion Veterinaria Del Peru* 26(4):587–95.

Liao, Kuang Wen, Shao Wen Hung, Ya Wen Hsiao, Michael Bennett, and Rea Min Chu. 2003. “Canine Transmissible Venereal Tumor Cell Depletion of B Lymphocytes: Molecule(s) Specifically Toxic for B Cells.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 92(3–4):149–62.

Liao, Kuang Wen, Zei Yi Lin, Hai Nie Pao, Sook Yee Kam, Fun In Wang, and Rea Min Chu. 2003. “Identification of Canine Transmissible Venereal Tumor Cells Using in Situ Polymerase Chain Reaction and the Stable Sequence of the Long Interspersed Nuclear Element.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15(5):399–406.

Lobert, Sharon, Bojana Vulevic, and John J. Correia. 1996. “Interaction of Vinca Alkaloids with Tubulin : A Comparison of Vinblastine ,.” *American Chemical Society* 2960(95):6806–14.

Macotpet, Arayaporn, Ekkachai Pattarapanwichien, and Fanan Suksawat. 2019. “SINGLE-AGENT L-ASPARAGENASE FOR THE TREATMENT OF VINCRIStINE AND DOXORUBICIN-RESISTANT CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR.” *Veterinary Practitioner* 20(1):56–58.

Marchal, T., L. Chabanne, C. Kaplanski, D. Rigal, and J. P. Magnol. 1997. “Immunophenotype of the Canine Transmissible Venereal Tumour.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 57(1–2):1–11.

Martínez, Mastoby M., Juan C. Ballut, and José A. Cardona. 2002. “Tumor Venéreo Transmisible (TVT) de Localización Extragenital.” *Revista MVZ Córdoba* 7(1):168–70.

Mascarenhas, Mariana B., Paulo V. Peixoto, Regina R. Ramadinha, Anibal G. Armien, Samay Z. Costa, Ileana C. Miranda, Vivian A. Nogueira, and Ticiania N. França. 2017. “Immunohistochemical, Lectin Histochemical and Ultrastructural Studies of Canine Transmissible Venereal Tumor in Brazil.” *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 37(6):613–20.

- Mizuno, Shinya, Toru Fujinaga, Motoshi Tajima, Kanjuro Otomo, and Toshio Koike. 1989. "Role of Lymphocytes in Dogs Experimentally Re-Challenged with Canine Transmissible Sarcoma." *Japanese Journal Veterinary Sciences* 51(1):86–95.
- Montoya, Mauricio, Francisco Pedraza, Fabrizio Grandi, and Noeme S. Rocha. 2012. "Cytologic Subtypes of Canine Transmissible Venereal Tumor." *Veterinary Clinical Pathology* 41(1):4–5.
- Mozos, E., A. Méndez, J. C. Gómez-Villamandos, J. Martín De Las Mulas, and J. Pérez. 1996. "Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor." *Veterinary Pathology* 33(3):257–63.
- Mukaratirwa, S., M. Chimonyo, M. Obwolo, E. Gruys, and H. Nederbragt. 2004. "Stromal Cells and Extracellular Matrix Components in Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumour at Different Stages of Growth." *Histology and Histopathology* 19(4):1117–23.
- Mukaratirwa, S., and E. Gruys. 2003. "Canine Transmissible Venereal Tumour : Cytogenetic Origin , Immunophenotype , and Immunobiology . A Review." *Veterinary Quarterly* 25(3):101–11.
- Murchison, E. P. 2009. "Clonally Transmissible Cancers in Dogs and Tasmanian Devils." *Oncogene* 27(S2):S19–30.
- Murchison, Elizabeth P., David C. Wedge, Ludmil B. Alexandrov, Beiyuan. Fu, Nigo Martincorena, Zemin Ning, Jose M. C. Tubio, Emma I. Werner, Jan Allen, Andriago Barboza De Nardi, Edward M. Donelan, Gabriele Marino, Ariberto Fassati, Peter J. Campbell, Fengtang Yang, Austin Burt, Robin A. Weiss, and Michael R. Stratton. 2014. "Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage." *Science* 343(437):437–40.
- Murgia, Claudio, Jonathan K. Pritchard, Su Yeon Kim, Ariberto Fassati, and Robin A. Weiss. 2006. "Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer." *Cell* 126(3):477–87.
- Norobi, Tsutomu, Kaoru Miura, David J. Wu, Augusto Lois, Kenji Takabayashi, and Dennis A. Carson. 1994. "Deletions of the Cyclin-Dependent Kinase-4 Inhibitor Gene in Multiple Human Cancers." *Nature* 368:753–56.
- Nowinsky, M. A. 1876. "Zur Frage über die Impfung der krebsigen Geschwülste." *Zbl Med Wissensch* 14: 790-791.
- Ojeda, J., A. Alfaro, M. Moroni, V. Camacho, J. Martínez, and M. Noro. 2016. "Tumor Venéreo Transmisibile Diseminado Sobre Piel, Párpados y Pene En Un Perro. Reporte de Caso." *Archivos de Medicina Veterinaria* 48(1):119–23.
- Ojeda, Javier, Marcelo Mieres, Francisco Soto, Verónica Arnes, Enrique Paredes, and María Navarrete. 2018. "Computer Tomographic Imaging in 4 Dogs with Primary Nasal Canine Transmissible Venereal Tumor and Differing Cellular

- Phenotype.” *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32(3):1172–77.
- Ostrander, Elaine A., Brian W. Davis, and Gary K. Ostrander. 2016. “Transmissible Tumors: Breaking the Cancer Paradigm.” *Trends in Genetics* 32(1):1–15.
- OTOMO, Kanjuro, Toshio KOIKE, Tadaaki KUDO, and Tamotsu SAKAI. 1981. “Histological and Ultrastructural Findings of Regressing Canine Transmissible Venereal Tumor After Repeated Transplantation.” *NII-Electronic Library Service* 43:823–32.
- Paranzini, Sella, Marcos Cézar, Wingeter Santis, Maria Isabel, and Cristiane Sella Paranzini. 2015. “Prevalence of Different Cytomorphological Types of Transmissible Venereal Tumours and the Association with Prognosis in Dogs Treated with Vincristine Sulphate – Retrospective Study Prevalência Dos Diferentes Tipos Morfológicos de Tumor Venéreo Transmissív.” *Semina: Ciências Agrarias* 36(6):3795–3800.
- Park, Mi Sun, Yongbaek Kim, Min Soo Kang, Sang Yeon Oh, Doo Youn Cho, Nam Shik Shin, and Dae Yong Kim. 2006. “Disseminated Transmissible Venereal Tumor in a Dog.” *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18(1):130–33.
- Pérez, José, Michael J. Day, and Elena Mozos. 1998. “Immunohistochemical Study of the Local Inflammatory Infiltrate in Spontaneous Canine Transmissible Venereal Tumour at Different Stages of Growth.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64(2):133–47.
- Placke, M. E., D. L. Hill, and T. J. Yang. 1987. “Cranial Metastasis of Canine Transmissible Venereal Sarcoma.” *Journal of Veterinary Medicine Series A* 34(1–10):125–32.
- Ramírez Bonilla, Francisco Tadeo, Luis Gabriel Sotto Gasca, Nadia Rocio Manjarres Gomez, Lizeth Jhoanna Artunduaga Mellizo, and Rodolfo Garcia Trujillo. 2015. “Reporte de Caso: Tumor Venereo Transmissible En Perro Mestizo.” *Revista Electronica de Veterinaria* 16(1).
- Rebbeck, Clare A., Rachael Thomas, Matthew Breen, Armand M. Leroi, and Austin Burt. 2009. “Origins and Evolution of a Transmissible Cancer.” *Evolution* 63(9):2340–49.
- Regmi, Sagar, Prem Lal Mahato, Iebu Devkota, Raju Prasad Neupane, Asmin Khulal, and Anil K. Tiwary. 2020. “A Case Report on Canine Transmissible Venereal Tumor.” *Journal of Zoological Research* 2(2):1–4.
- Rezaei, Mahdieh, Shahrzad Azizi, Shima Shahheidaripour, and Sara Rostami. 2016. “Primary Oral and Nasal Transmissible Venereal Tumor in a Mix-Breed Dog.” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(5):443–45.
- Rocha, Noeme Sousa, Tália Missen Tremori, and João Alexandre Matos Carneiro. 2014. “Fine Needle Aspiration Cytology in the Diagnosis of Canine Cutaneous Transmissible Venereal Tumor— Case Report.” *Open Journal of Veterinary*

Medicine 04(09):204–9.

Rogers, Kenita S., Michael A. Walker, and Heather B. Dillon. 1998. “Transmissible Venereal Tumor: A Retrospective Study of 29 Cases.” *Journal of the American Animal Hospital Association* 34(6):463–70.

Salamanca S, Santader-Baquero A, Triana-García Pa, Romero S, and Rondón-Barragán Is. 2008. “TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE (TVT) CON METÁSTASIS PULMONAR: REPORTE DE CASO Transmittable Venereal Tumour (TVT) with Pulmonary Metastasis: A Case Report.” *Orinoquia* 12(2):162–70.

Santos, Francisco glauco de Araujo, Anilton Cesar Vasconcelos, Jairo Eduardo dos Santos Nunes, Geovanni Dantas Cassali, Tatiane A. Paixao, Luciana Moro, and LUCIANA MORO. 2005. “O Tumor Venéreo Transmissível Canino – Aspectos Gerais E Abordagens Moleculares (Revisão De Literatura).” *Biosci J* 21(3):41–53.

Scarpelli, Karime C., Maria L. Valladão, and Konradin Metze. 2010. “Predictive Factors for the Regression of Canine Transmissible Venereal Tumor during Vincristine Therapy.” *The Veterinary Journal* 183(3):362–63.

Setthawongsin, C., S. Tangkawattana, and A. Rungsipipat. 2018. “ScienceDirect Computerized Cytomorphometric and Cytomorphological Analysis of Canine Transmissible Venereal Tumours.” *Journal of Comparative Pathology* 163:18–22.

Setthawongsin, Chanokchon, Somporn Techangamsuwan, Sirikachorn Tangkawattana, and Anudep Rungsipipat. 2016. “Cell-Based Polymerase Chain Reaction for Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT) Diagnosis.” *Journal of Veterinary Medical Science* 78(7):1167–73.

Shi, Shan Rong, Richard J. Cote, and Clive R. Taylor. 1997. “Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future.” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45(3):327–43.

Siddle, Hannah V., and Jim Kaufman. 2015. “Immunology of Naturally Transmissible Tumours.” *Immunology* 144(1):11–20.

Singh, J., J. S. Rana, N. Sood, G. R. Pangawkar, and P. P. Gupta. 1996. “Clinico-Pathological Studies on the Effect of Different Anti-Neoplastic Chemotherapy Regimens on Transmissible Venereal Tumours in Dogs.” *Veterinary Research Communications* 20(1):71–81.

Stettner, Noa, Ori Brenner, Raya Eilam, and Alon Harmelin. 2005. “Pegylated Liposomal Doxorubicin as a Chemotherapeutic Agent for Treatment of Canine Transmissible Venereal Tumor in Murine Models.” *Journal of Veterinary Medical Science* 67(11):1133–39.

Stockman, D., H. F. Ferrari, A. L. Andrade, T. C. Cardoso, and M. C. R. Luvizotto.

2011. "Detection of the Tumour Suppressor Gene TP53 and Expression of P53 , Bcl-2 and P63 Proteins in Canine Transmissible Venereal Tumour." *Veterinary and Comparative Oncology* 9(4):251–59.
- Stockmann, Daniela, Heitor F. Ferrari, Alexandre L. Andrade, Rodrigo A. Lopes, C. Tereza, and Maria C. R. Luvizotto. 2011. "Canine Transmissible Venereal Tumors : Aspects Related to Programmed Cell Death." *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 4(1):67–75.
- Strakova, Andrea, and Elizabeth P. Murchison. 2014. "The Changing Global Distribution and Prevalence of Canine Transmissible Venereal Tumour." *BMC Veterinary Research* 10(1):168.
- Strakova, Andrea, and Elizabeth P. Murchison. 2015. "The Cancer Which Survived: Insights from the Genome of an 11000 Year-Old Cancer." *Current Opinion in Genetics and Development* 30:49–55.
- Strakova, Andrea, Thomas J. Nicholls, Adrian Baez-Ortega, Máire Ní Leathlobhair, Alexander T. Sampson, Katherine Hughes, Isobelle A. G. Bolton, Kevin Gori, Jinhong Wang, Ilona Airikkala-Otter, Janice L. Allen, Karen M. Allum, Clara L. Arnold, Leontine Banske-Issa, Thinlay N. Bhutia, Jocelyn L. Bisson, Kelli Blank, Cristóbal Briceño, Artemio Castillo Domracheva, Anne M. Corrigan, Hugh R. Cran, Jane T. Crawford, Stephen M. Cutter, Eric Davis, Karina F. de Castro, Andriago B. De Nardi, Anna P. de Vos, Laura Delgadillo Keenan, Edward M. Donelan, Adela R. Espinoza Huerta, Ibikunle A. Faramade, Mohammed Fazil, Eleni Fotopoulou, Skye N. Fruean, Fanny Gallardo-Arrieta, Olga Glebova, Pagona G. Gouletsou, Rodrigo F. Häfelin Manrique, Joaquim J. G. P. Henriques, Rodrigo S. Horta, Natalia Ignatenko, Yaghoub Kane, Cathy King, Debbie Koenig, Ada Krupa, Steven J. Kruzeniski, Marta Lanza-Perea, Mihran Lazyan, Adriana M. Lopez Quintana, Thibault Losfelt, Gabriele Marino, Simón Martínez Castañeda, Mayra F. Martínez-López, Bedan M. Masuruli, Michael Meyer, Edward J. Migneco, Berna Nakanwagi, Karter B. Neal, Winifred Neunzig, Sally J. Nixon, Antonio Ortega-Pacheco, Francisco Pedraza-Ordoñez, Maria C. Peleteiro, Katherine Polak, Ruth J. Pye, Juan C. Ramirez-Ante, John F. Reece, Jose Rojas Gutierrez, Haleema Sadia, Sheila K. Schmeling, Olga Shamanova, Alan G. Sherlock, Audrey E. Steenland-Smit, Alla Svitich, Lester J. Tapia Martínez, Ismail Thoya Ngoka, Cristian G. Torres, Elizabeth M. Tudor, Mirjam G. van der Wel, Bogdan A. Vițălaru, Sevil A. Vural, Oliver Walkinton, Alvaro S. Wehrle-Martinez, Sophie A. E. Widdowson, Irina Zvarich, Patrick F. Chinnery, Maria Falkenberg, Claes M. Gustafsson, and Elizabeth P. Murchison. 2020. "Recurrent Horizontal Transfer Identifies Mitochondrial Positive Selection in a Transmissible Cancer." *Nature Communications* 11(1):1–11.
- Tella, M. A., O. O. Ajala, and V. O. Taiwo. 2004. "COMPLETE REGRESSION OF TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR (TVT) IN NIGERIAN MONGREL DOGS WITH VINCRISTINE SULPHATE CHEMOTHERAPY." *African Journal of Biomedical Research* 7:133–38.

- Thangathurai, Ramasamy, Gurusamypalayam Amirthalingam Balasubramaniam, Saravanamuthu Dharmaceelan, Periasamy Balachandran, Palani Srinivasan, Soundarapandian Sivaseelan, and Bhakthavasalam Murali Manohar. 2008. "Cytological Diagnosis and Its Histological Correlation in Canine Transmissible Venereal Tumour." *Veterinarski Arhiv* 78(5):369–76.
- Tomiyasu, Hirotaka, Masashi Takahashi, Yasuhito Fujino, Koichi Ohno, and Hajime Tsujimoto. 2010. "Gastrointestinal and Hematologic Adverse Events after Administration of Vincristine, Cyclophosphamide, and Doxorubicin in Dogs with Lymphoma That Underwent a Combination Multidrug Chemotherapy Protocol." *Journal of Veterinary Medical Science* 72(11):1391–97.
- Trompieri-Silveira, Ana Carolina, Daniel Gerardi, Juliana Vitti Mouro, Mirela Tinucci Costa, and Antonio Carlos Alessi. 2009. "Immunohistochemical Expression of B and T-Lymphocytes and TGF- β in Experimentally Transplanted Canine Venereal Tumor." *Ciencia Rural* 39(4):1148–54.
- Valençola, Renata Amarilha, Tamires Ramborger Antunes, Simone Sorgatto, and Bruna Brito Oliveira. 2015. "Aspectos Citomorfológicos e Frequência Dos Subtipos Do Tumor Venéreo Transmissível Canino No Município de Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, Brasil." *Acta Veterinaria Brasílica* 9(1):82–86.
- Vermooten, M. I. 1987. "Canine Transmissible Venereal Tumour (TVT): A Review." *Journal of the South African Veterinary Association* 58(3):147–50.
- Vogelstein, Bert, and Kenneth W. Kinzler. 2004. "Cancer Genes and the Pathways They Control." *Nature Medicine* 10(8):789–99.
- vonHoldt, Bridgett M., and Elaine A. Ostrander. 2006. "The Singular History of a Canine Transmissible Tumor." *Cell* 126(3):445–47.
- Weber, W. T., P. C. Nowell, and W. C. D. Hare. 1965. "Chromosome Studies of a Transplanted and a Primary Canine Venereal Sarcoma." *Journal of the National Cancer Institute* 35(3):537–47.
- Williamson, Mark Mc Coll, and Deborah Joan Middleton. 1998. "Cutaneous Soft Tissue Tumours in Dogs: Classification, Differentiation, and Histogenesis." *Veterinary Dermatology* 9(1):43–48.
- Yang, T. J., J. P. Chandler, and S. Dunne-Anway. 1987. "Growth Stage Dependent Expression of MHC Antigens on the Canine Transmissible Venereal Sarcoma." *Br Journal Cancer* 55:131–34.

11. ANEXOS



Universidad de Caldas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
HOSPITAL VETERINARIO DIEGO VILLEGAS TORO



Fecha _____

N° _____

Término de aceptación

Yo (nombre) _____, identificado(a) con cédula de ciudadanía número _____ autorizo el uso de la información obtenida del paciente (nombre) _____ para el desarrollo del proyecto EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUIMICA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN LA REGRESION TUMORAL DE PACIENTES SOMETIDOS A QUIMIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO DEL TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE CANINO, perteneciente al Grupo de Investigación en Patología Veterinaria de la Universidad de Caldas y adscrito a la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la misma Universidad.

Firma _____



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16765-w>

OPEN

Recurrent horizontal transfer identifies mitochondrial positive selection in a transmissible cancer

Andrea Strakova¹ et al.[#]

Autonomous replication and segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) creates the potential for evolutionary conflict driven by emergence of haplotypes under positive selection for 'selfish' traits, such as replicative advantage. However, few cases of this phenomenon arising within natural populations have been described. Here, we survey the frequency of mtDNA horizontal transfer within the canine transmissible venereal tumour (CTVT), a contagious cancer clone that occasionally acquires mtDNA from its hosts. Remarkably, one canine mtDNA haplotype, A1d1a, has repeatedly and recently colonised CTVT cells, recurrently replacing incumbent CTVT haplotypes. An A1d1a control region polymorphism predicted to influence transcription is fixed in the products of an A1d1a recombination event and occurs somatically on other CTVT mtDNA backgrounds. We present a model whereby 'selfish' positive selection acting on a regulatory variant drives repeated fixation of A1d1a within CTVT cells.

Andrea Strakova¹, Thomas J. Nicholls^{2,3,68}, Adrian Baez-Ortega^{1,68}, Máire Ní Leathlobhair¹, Alexander T. Sampson¹, Katherine Hughes⁴, Isobelle A. G. Bolton¹, Kevin Gori¹, Jinhong Wang¹, Ilona Airikkala-Otter⁵, Janice L. Allen⁶, Karen M. Allum⁷, Clara L. Arnold⁸, Leontine Basse-Issa⁹, Thinlay N. Bhutia¹⁰, Jocelyn L. Bisson¹, Kelli Blank⁸, Cristóbal Briceño¹¹, Artemio Castillo Domracheva¹², Anne M. Corrigan¹³, Hugh R. Cran¹⁴, Jane T. Crawford¹⁵, Stephen M. Cutter⁶, Eric Davis¹⁶, Karina F. de Castro¹⁷, Andriago B. De Nardi¹⁸, Anna P. de Vos¹⁹, Laura Delgadillo Keenan²⁰, Edward M. Donelan⁶, Adela R. Espinoza Huerta²¹, Ibikunle A. Faramade²², Mohammed Fazil²³, Eleni Fotopoulou²⁴, Skye N. Fruean²⁵, Fanny Gallardo-Arrieta²⁶, Olga Glebova²⁷, Pagona G. Gouletsou²⁸, Rodrigo F. Häfelin Manrique²⁹, Joaquim J. G. P. Henriques³⁰, Rodrigo S. Horta³¹, Natalia Ignatenko³², Yaghouba Kane³³, Cathy King⁷, Debbie Koenig⁷, Ada Krupa³⁴, Steven J. Kruzeniski²¹, Marta Lanza-Perea¹³, Mihran Lazyan³⁵, Adriana M. Lopez Quintana³⁶, Thibault Losfelt³⁷, Gabriele Marino³⁸, Simón Martínez Castañeda³⁹, Mayra F. Martínez-López⁴⁰, Bedan M. Masuruli⁴¹, Michael Meyer⁴², Edward J. Migneco⁴³, Berna Nakanwagi⁴⁴, Karter B. Neal⁴⁵, Winifred Neunzig⁷, Sally J. Nixon⁴⁶, Antonio Ortega-Pacheco⁴⁷, Francisco Pedraza-Ordoñez⁴⁸, Maria C. Peleteiro⁴⁹, Katherine Polak⁵⁰, Ruth J. Pye⁵¹, Juan C. Ramirez-Ante⁴⁸, John F. Reece⁵², Jose Rojas Gutierrez⁵³, Haleema Sadia⁵⁴, Sheila K. Schmeling⁵⁵, Olga Shamanova⁵⁶, Alan G. Sherlock⁵¹, Audrey E. Steenland-Smit⁹, Alla Svitch⁵⁷, Lester J. Tapia Martínez²¹, Ismail Thoya Ngoka⁵⁸, Cristian G. Torres⁵⁹, Elizabeth M. Tudor⁶⁰, Mirjam G. van der Wel⁶¹, Bogdan A. Vițălaru⁶², Sevil A. Vural⁶³, Oliver Walkinton⁵¹, Alvaro S. Wehrle-Martinez⁶⁴, Sophie A. E. Widdowson⁶⁵, Irina Zvarich⁶⁶, Patrick F. Chinnery⁶⁷, Maria Falkenberg², Claes M. Gustafsson² & Elizabeth P. Murchison¹ ✉

Artículo aceptado y que se publicara en el volumen 32, numero 2 (2021) en la revista de Revista de Investigaciones Veterinaria del Perú (RIVEP).

Rev Inv Vet Perú 2021; 32(2): e18416

<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i2.18416>

Características biológicas y seguimiento clínico en casos naturales de tumor venéreo transmisible canino

Biological characteristics and clinical follow-up in natural cases of canine transmissible venereal tumour

Juan C. Ramírez-Ante^{1,2}, Andrés Fernández-Riomalo^{1,2,3}, Francisco J. Pedraza Ordoñez^{1,4}

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar si existe alguna relación entre los subtipos citológicos, las fases histopatológicas y la respuesta al tratamiento con sulfato de vincristina en caninos afectados naturalmente por el tumor venéreo transmisible canino (TVTC). Se evaluaron 52 casos de TVTC en diferentes razas, edades y sexo sin encontrar una relación significativa entre las clasificaciones citológicas e histopatología determinadas previas a la quimioterapia y el tiempo de duración de este. Los resultados no mostraron diferencias en factores como respuesta parcial al tratamiento, grado de malignidad, metástasis o resistencia a la vincristina en los perros tratados; además, no se pudo definir el pronóstico para la involución tumoral a partir de la clasificación citología o histopatológica.

Palabras clave: fases histopatológicas, involución tumoral, quimioterapia, subtipos citológicos, tumor venéreo transmisible canino

¹ Grupo de Investigación en Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

² Facultad de Ciencia Pecuarias, Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal UNISARC, Santa Rosa de Cabal, Colombia

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Pereira, Colombia

⁴ Laboratorio de Patología Animal, Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

⁵ E-mail: juan.ante@unisarc.edu.co

Recibido: 8 de agosto de 2020

Aceptado para publicación: 6 de febrero de 2021

Publicado: 23 de abril 2021

