

## ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE LA DEXAMETASONA EN TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

### ANTIANGIOGENIC ACTIVITY OF DEXAMETHASONE IN CANINE TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR

CARLOS GONZÁLEZ R.<sup>1</sup>; ESTEFANÍA FLORES P.<sup>3</sup>; GINO CATTANEO U.<sup>3</sup>;  
RAQUEL CEPEDA C.<sup>2</sup>; RODRIGO RAMOS RAMOS.<sup>3</sup>

#### ABSTRACT

*The search of new therapies against cancer, both in human and in veterinary medicine, has lead to the development of a new group of drugs, named antiangiogenic drugs, due to their negative effect on the tumoral vasculature. The angiogenesis is defined as the development of new vessels starting from pre-existent vessels. Besides being present in cancer, where the genesis of new vessels is fundamental for the growth and dissemination to other tissues (metastasis), this phenomenon is also present in other diseases as well as in some physiologic processes.*

*With the purpose of studying the effect of these drugs on the vascular bed of tumors, the effect of dexamethasone was analyzed in a canine transmissible venereal tumor (CTVT) of spontaneous presentation. Steroids have a proven negative activity on tumoral vessels. With this purpose, 7 dogs affected with CTVT were treated during 14 days with dexamethasone. During this time period measures of tumoral size were obtained, along with samples of blood and tumor biopsies. Tumor tissue samples were analyzed for vascularity by immunohistochemical analysis, using antibodies against vonWillebrand factor as markers of endothelial cells. A significant decrease of the vascular area was observed in tumoral samples after dexamethasone treatment, in comparison with samples taken before treatment. This was clinically correlated with a small decrease in tumor size at the end of the treatment.*

**KEY WORDS:** Angiogenesis, CTVT, dexamethasone.

**PALABRAS CLAVE:** Angiogénesis, TTV, dexametasona.

#### INTRODUCCIÓN

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes (Rak *et al.*, 1995; Griffioen y Molema, 2000), lo que lleva a neovascularización. Es un fenómeno complejo donde participan múltiples mecanismos que se pueden agrupar en tres grupos de eventos (Malonne *et al.*, 1999):

- Activación de células endoteliales, gatillada principalmente por fenómenos de hipoxia de células tumorales, que induce la síntesis de moléculas con el factor inducible por hipoxia (HIF) que, a su vez, estimula la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una de las principales y más estudiadas moléculas del proceso angiogénico.
- Invasión y proliferación. Las células endoteliales activadas proliferan y comienzan a penetrar la matriz extracelular, ayudadas por la acción de las metaloproteinasas degradadoras de matriz (MMPs). En esta etapa actúa el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que favorece la adhesión de estas células en migración.
- Maduración y diferenciación. Las interacciones de las células endoteliales con la matriz extra-

<sup>1</sup> Dpto. Patología Animal, Fac. Cs. Vet. y Pecuarias U. de Chile.

<sup>2</sup> Dpto. Cs. Básicas, Fac. Cs. Vet. y Pecuarias U. de Chile.

<sup>3</sup> Dpto. Cs. Clínicas, Fac. Cs. Vet. y Pecuarias U. de Chile.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1020980.

celular estimulan moléculas que favorecen la diferenciación y formación tubular, además de la agregación de componentes extravasculares.

Teniendo en cuenta estos eventos, las estrategias para intervenir la neoformación vascular están dirigidas a evitar la proliferación celular, atacando las células o las moléculas estimuladoras, evitar la adhesión y migración, y actuar sobre las proteínas degradadoras de matriz. Dentro de las drogas que se han encontrado que inhiben el proceso, actuando sobre las células endoteliales, están algunos corticoides como la dexametasona (Folkman e Ingber, 1987; Folkman, 1995, 2001), cuyo principal efecto es estimular la apoptosis de estas células en proliferación, evitando con esto la neoformación vascular (Zhivotovsky *et al.*, 1997). Se ha visto que para realizar este efecto, los corticoides incluidos dentro del grupo de angiostáticos estimulan la apoptosis que es un tipo de muerte celular donde unas proteínas llamadas caspasas, que se activan en cadena, provocan alteraciones en el proceso de reparación celular, desorganizan el citoesqueleto, detienen la progresión del ciclo celular (Cryns y Yuan, 1998). En años recientes, una amplia gama de inhibidores de la angiogénesis han mostrado un gran potencial en el tratamiento del cáncer en estudios preclínicos y varios de estos compuestos están siendo probados actualmente en ensayos clínicos (O'Reilly, 2002).

Entre estos compuestos aparecen como una alternativa, especialmente atractiva para la Medicina Veterinaria, algunos corticoides como la hidrocortisona y la dexametasona, que se agrupan dentro de los esteroides angiostáticos (Schimmer y Parker, 2003), fármacos de uso e indicación corriente en otras patologías, aceptados sin reparos por los dueños de mascotas, quienes, en cambio, en su mayoría no permiten que ellas sean tratadas con una terapia de alta toxicidad, como la quimioterapia convencional, por lo que con frecuencia no aceptan o abandonan la quimioterapia, optando finalmente por la eutanasia.

El principal mecanismo por el cual los corticoides inhiben la angiogénesis sería mediante la inducción de apoptosis vía activación de caspasas, además de inhibir otras moléculas que participan directa o indirectamente en el proceso de neovascularización (Korsmeyer y Zinkel, 2001).

A la fecha, la terapia antiangiogénesis es considerada, en todo el mundo, como una prometedora alternativa en la terapia contra el cáncer y otras enfermedades proangiogénicas, sin los efectos cola-

terales de los tratamientos convencionales. No obstante, varias preguntas permanecen sin respuesta y varios conceptos no están verificados en el presente.

El interés en observar y cuantificar el efecto del corticoide dexametasona en la vascularidad del TVT, tomado como modelo biológico de neoplasia, motivó el diseño de esta experiencia. El TVT es una neoplasia del canino de ubicación generalmente genital, de gran incidencia en nuestro país (Flores *et al.*, 2000), que se caracteriza por su intensa vascularización en fase de crecimiento progresivo (González *et al.*, 2000), lo que se traduce clínicamente en un aspecto hemorrágico y constante sangramiento (Rogers, 1977).

## MATERIAL Y MÉTODO

### Material Biológico

Se utilizaron siete perros, machos, sexualmente maduros, con edades que fluctuaron entre los 2 y los 7 años, sin distinción de raza, atendidos en el Servicio de Cirugía de Pequeños Animales de la Facultad, con diagnóstico de TVT progresivo confirmado mediante citología e histopatología.

### Material Antiangiogénico

*Dispert-dex*®: Dexametasona fosfato disódico, 2,63 mg (equivalente a 2 mg de Dexametasona) por cm<sup>3</sup> en solución acuosa (Laboratorio Dispert S.A., Montevideo, Uruguay).

### Material Inmunoquímico

*Anticuerpo primario*: Se utilizó un anticuerpo policlonal antifactor de vonWillebrand humano (DAKO®, código N°A0082, Lote 111, Edición 13.12.01, Dinamarca), que corresponde a la fracción purificada de inmunoglobulina de conejo en solución 0,1 mol/L NaCl, 15 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

*Anticuerpo secundario*: Se utilizó un anticuerpo biotinilado de cerdo antiinmunoglobulinas de conejo (DAKO®, código N°A0082, Lote 111, Edición 13.12.01, Dinamarca) en solución 0,01 mol/L buffer fosfato, 0,15 mol/L NaCl, 15 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el cual reconoce el anticuerpo primario.

*Solución sustrato*: Se utilizó DAB (3,3'-diaminobenzidina) en solución cromógena combinado con un buffer-sustrato (buffer imidazol-HCl, pH 7,5, conteniendo peróxido de hidrógeno y un agente antimicrobiano) en proporción de 1 gota/1 ml. Esta solución permite visualizar las células endoteliales teñidas de un color café.

## METODOLOGÍA

A cada paciente se le administró dexametasona, en dosis endovenosa diaria de 0,5 mg/kg, por siete días, seguido de aplicaciones de dosis decrecientes también por siete días. Las dosis, expresadas en mg/kg, se muestran en el siguiente esquema.

<b>DÍA</b>	1-7	8	9	10	11	12	13	14
<b>DOSIS</b>	0,5	0,25	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01	0,005

Durante la aplicación de dexametasona se realizaron los siguientes procedimientos:

- *Examen clínico*: todos los días, para evaluar el estado general del paciente.
- *Muestras para hemograma y perfil bioquímico*: previo al tratamiento con dexametasona y, una vez terminado, para evaluar el estado general del paciente.
- *Medición del tamaño tumoral*: se midieron dos dimensiones con un pie de metro: largo (l) y ancho (a), cada dos días. El volumen tumoral se calculó según la fórmula de O'Reilly *et al.* (1997).

$$\text{Volumen} = a^2 \times l$$

- *Biopsias*: se obtuvieron muestras tumorales previo al tratamiento, durante y terminado el tratamiento con dexametasona. Las biopsias (obtenidas con un equipo de instrumental quirúrgico básico) se fijaron en formalina al 10% por 24 hrs. Luego se procesaron según métodos convencionales para inclusión en parafina (López *et al.*, 1982) y se obtuvieron cortes histológicos de 4 micrómetros de espesor con micrótomo de rotación (Leitz). Los cortes fueron desparafinados mediante paso por xilol, alcoholes descendientes y agua y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E), Van Gieson (vG) y Papanicolau para la descripción general del tumor (López *et al.*, 1982).
- *Inmunohistoquímica*: para identificar la actividad angiogénica se utilizó inmunomarcación con anticuerpos antifactor de vonWillebrand (vWf), para lo cual los cortes fueron montados en portaobjetos xilanizados y luego fueron desparafinados según técnica descrita anteriormente. Esta técnica inmunohistoquímica permite visualizar las células endoteliales de color café oscuro.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se determinó la actividad angiogénica mediante la cuantificación del área del lecho vascular, medida en micrómetros cuadrados ( $\mu\text{m}^2$ ), en las placas inmunomarcadas. Esto se hizo con el uso de un programa de análisis morfométrico computacional (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA), calculándose un valor promedio entre 5 campos elegidos al azar, con aumento de 200X, determinados en un microscopio (Nikon Eclipse E600) conectado a una cámara de video (Cool-Snap Pro, Media Cybernetics, USA) y a un computador.

Análisis estadístico: con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza de dos criterios o Diseño de Bloques al Azar para determinar si hay diferencias entre las muestras. En este diseño, con las unidades experimentales se forman grupos o bloques que correspondan a los niveles de variación de la fuente y los tratamientos se distribuyen al azar. A cada grupo de unidades que corresponden a un mismo nivel de variación y que, por lo tanto, forman un conjunto relativamente homogéneo, se denomina bloque.

## RESULTADOS

### CAMBIOS EN HEMOGRAMA Y PERFIL BIOQUÍMICO DURANTE TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA

Una vez finalizado el tratamiento con dexametasona, 6 casos presentaron alguna alteración en el hemograma. Las más frecuentes se presentaron en la serie roja y fueron policromacia, en 5 casos y rouleaux, en 4 casos. Además se presentó trombocitopenia en 3 casos.

En la Tabla 1 se muestran las alteraciones del hemograma que se presentaron en los casos tratados con dexametasona y el número de casos en que se presentó cada una.

Una vez finalizado el tratamiento con dexametasona, los 7 casos en estudio presentaron alguna alteración en el perfil bioquímico. Las más importantes fueron los aumentos de las enzimas Fosfatasa alcalina (FA) y Alanino-amino-transferasa (ALT), presentes en 7 y 6 casos, respectivamente.

La Tabla 2 muestra las alteraciones del perfil bioquímico de casos tratados con dexametasona y el número de casos en que se presentó cada una.

En la Tabla 3 se muestran las alteraciones del hemograma y del perfil bioquímico por caso estudiado.

**Cambios en Tamaño Tumoral**

En la Tabla 4 se observa que previo al tratamiento con dexametasona el volumen promedio fue de 13,63 cm<sup>3</sup>, teniendo 3,6 cm<sup>3</sup> el tumor más pequeño (caso 1) y 32,4 cm<sup>3</sup> el más grande (caso 7).

Al final del tratamiento con dexametasona se observó una disminución en todos los casos en relación al volumen tumoral inicial (día 0), sin embargo, ésta fue leve y comenzó a establecerse más bien al final del período de observación (días 14 y 17). El

TABLA 1  
ALTERACIONES DEL HEMOGRAMA  
DE LOS PERROS CON TVT LUEGO DE  
14 DÍAS DE TRATAMIENTO  
CON DEXAMETASONA

<i>Alteración</i>	<i>Nº de casos</i>
Anisocitosis	2
Policromacia	5
Rouleaux	4
Anemia macrocítica	1
Trombocitopenia	3
Linfopenia	1
Desviación a la izquierda	2
Monocitopenia	2
Eosinopenia	1
Linfocitos atípicos	1

TABLA 2  
ALTERACIONES DEL PERFIL BIOQUÍMICO  
DE PERROS CON TVT LUEGO DE 14 DÍAS DE  
TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA

<i>Alteración</i>	<i>Nº de casos</i>
Hipoproteinemia	1
Hipoalbuminemia	2
Hipoglobulinemia	1
NUS aumentado	2
Bilirrubina total aumentada	2
Bilirrubina conjugada aumentada	1
Bilirrubina libre aumentada	1
FA aumentada	7
ALT aumentada	6
GGT aumentada	2

TABLA 3  
ALTERACIONES DEL HEMOGRAMA Y PERFIL BIOQUÍMICO POR CASO DE LOS PERROS  
CON TVT LUEGO DE 14 DÍAS DE TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA

<i>Alteración</i>	<i>Caso</i>						
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
Anisocitosis			x			x	
Policromacia			x	x	x	x	x
Rouleaux			x	x	x		x
Anemia macrocítica						x	
Trombocitopenia		x		x			x
Linfopenia							x
Desviación a la izquierda			x		x		
Monocitopenia				x	x		
Eosinopenia			x				
Linfocitos atípicos							x
Hipoproteinemia			x			x	
Hiperproteinemia	x						
Hipoalbuminemia			x			x	
Hipoglobulinemia					x		
Hiperglobulinemia	x						
NUS aumentado	x			x			
Bilirrubina total aumentada			x				x
Bilirrubina conjugada aumentada			x				
Bilirrubina libre aumentada							x
FA aumentada	x	x	x	x	x	x	x
ALT aumentada	x	x		x	x	x	x
GGT aumentada					x		x

TABLA 4  
EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA SOBRE VOLUMEN  
DE TVT MEDIDO COMO PORCENTAJE REMANENTE DEL TAMAÑO INICIAL

	Caso	$(\text{cm}^3)$		Porcentaje remanente del tamaño inicial						
		día 0	día 2	día 4	día 6	día 8	día 10	día 12	día 14	día 17
D	1	3,60	100,00	93,89	81,67	81,67	76,11	65,83	65,83	65,83
E	2	4,39	100,00	100,00	100,00	82,00	82,00	82,00	82,00	82,00
X	3	28,67	100,00	100,00	100,00	100,00	96,44	96,44	96,44	92,85
A	4	5,38	100,00	100,00	100,00	83,64	72,86	72,86	72,86	72,86
M	5	4,05	100,00	92,84	92,84	85,68	75,80	66,67	66,67	66,67
E	6	16,93	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	91,49	91,49
T	7	32,40	100,00	100,00	90,74	90,74	90,74	90,74	90,74	85,62
A	X	13,63	100,00	98,10	95,04	89,10	84,85	82,08	80,86	79,62
S	D.E. ±	12,48	0,00	3,25	7,08	8,04	10,87	14,08	12,56	11,26

porcentaje de volumen remanente promedio, al día 17, fue de  $79,62 \pm 11,26\%$ , siendo el caso 1 el que presentó el menor porcentaje de volumen remanente ( $65,83\%$ ) y el caso 3 el que presentó el mayor porcentaje de volumen remanente ( $92,85\% \text{ cm}^3$ ).

#### Cambios en Área Vascular

La densidad de vasos sanguíneos presentes en las muestras posteriores al tratamiento (Figuras 2a y 2b) fue notoriamente menor que en las muestras tomadas previo al tratamiento con dexametasona (Figuras 1a y 1b).

Previo al tratamiento con dexametasona (Tabla 5), el área vascular promedio de los 7 casos fue de  $5070,79 \pm 2607,79 \mu\text{m}^2$ . El caso 5 presentó el valor promedio más alto ( $8214,07 \mu\text{m}^2$ ) y el caso 1 el menor ( $1646,41 \mu\text{m}^2$ ).

En todos los casos se observó disminución del área inmunomarcada en relación con el día 0 (Figuras 1a y 1b). El porcentaje de área vascular remanente promedio, para los 7 casos, fue de  $33,98 \pm 6,42\%$  al día 7 de tratamiento y de  $21,31 \pm 5,69\%$  al día 17, lo que significa una disminución importante respecto al valor promedio obtenido antes del tratamiento. El caso que presentó el mayor cambio fue el 7, cuya área vascular remanente fue sólo de  $11,93\%$ , mientras que la menor disminución fue del caso 2, que mantuvo un  $28,80\%$  del área vascular original.

Se encontraron diferencias significativas entre el área vascular de las muestras tumorales antes del tratamiento (día 0) y luego de 7 y 17 días de tratamiento con dexametasona ( $p \leq 0,05$ ).

TABLA 5  
EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA SOBRE ÁREA VASCULAR  
DE TVT MEDIDO COMO PORCENTAJE REMANENTE DEL ÁREA INICIAL

	Caso	$(\mu\text{m}^3)$	% Remanente de Área Inicial	
		Día 0	Día 7	Día 17
D	1	1646,41	41,14	27,75
E	2	2026,95	34,64	28,80
X	3	4941,64	23,64	21,07
A	4	4249,69	28,51	21,05
M	5	8214,07	35,07	19,61
E	6	6982,20	41,54	18,95
T	7	7434,58	33,33	11,93
A	Promedio	5070,79	33,98	21,31
S	D.E. ±	2607,79	6,42	5,69

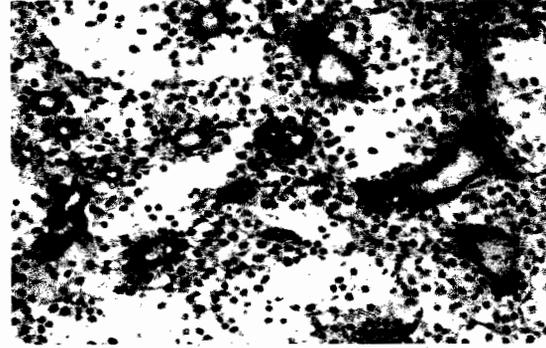
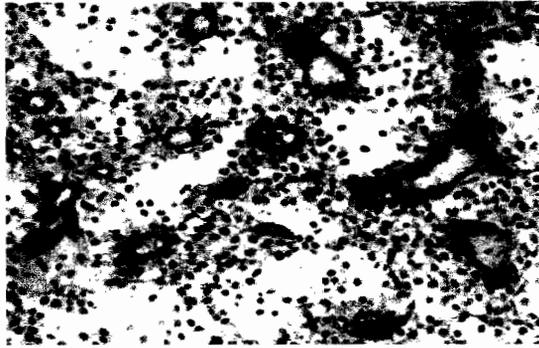


Fig. 1a Fig. 1b.

Cortes de TVT previo al tratamiento con dexametasona, donde se observan abundantes vasos sanguíneos teñidos de color café oscuro con tinción inmunohistoquímica antifactor de vonWillebrand (1a) y luego de ser marcados de color rojo para medición del área vascular (1b) (200X).

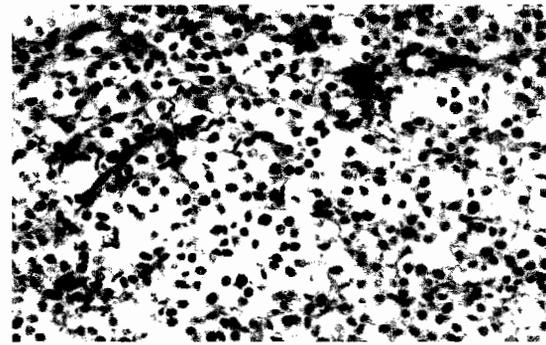
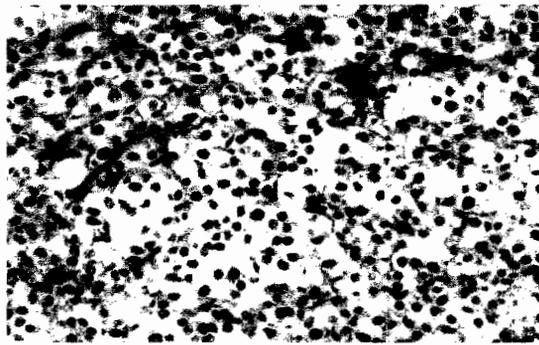


Fig. 2a Fig. 2b.

Cortes de TVT luego de 14 días de tratamiento con dexametasona donde se observa escasa cantidad de vasos sanguíneos teñidos de color café oscuro con tinción inmunohistoquímica antifactor de vonWillebrand, previo (2a) y posterior (2b) a ser marcados de color rojo para medición del área vascular (200X).

## DISCUSIÓN

### Hemograma y perfil bioquímico de los perros tratados con dexametasona

Al analizar en forma conjunta el hemograma y el perfil bioquímico, especialmente este último, de los perros tratados con dexametasona, se apreciaron alteraciones compatibles con un efecto negativo del corticoide a nivel hepático, lo que coincide con lo descrito por Rogers y Ruebner (1977), quienes observaron lesiones hepáticas asociadas a la administración de corticoides en perros, los que parecen ser particularmente susceptibles a presentar hepatopatías inducidas por el uso de corticoides. Estos hallazgos se relacionan con un incremento de los niveles de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en la sangre (Schimmer y Parker, 2003), incremento que se vio en los 7 casos en estudio. Junto con esto se observó un aumento

de la enzima alanino amino-transferasa (ALT) en 6 casos, cuyo incremento se relaciona con alteración a nivel de canaliculos hepáticos. Otras alteraciones características en patologías hepáticas como el aumento de los niveles sanguíneos de bilirrubina sólo las presentó un caso, lo que podría estar explicado por factores individuales y uno por un efecto a menor nivel del corticoide en el hígado.

Otros efectos del uso de corticoides que podrían explicar las alzas de las enzimas anteriormente señaladas, especialmente de FA, serían aquellos derivados de su actividad catabólica sobre músculo y hueso (Schimmer y Parker, 2003), sin embargo, esto no pudo ser corroborado en este trabajo.

En 4 y 5 casos, respectivamente, se presentó rouleaux (distribución de los glóbulos rojos en "pilas de monedas") y policromacia (coloración plomiza de los eritrocitos), que, aunque fueron de grado leve, podrían tener relación con una alteración de

la función hepática, ya que el hígado, junto con el bazo, ayuda a la eliminación de eritrocitos envejecidos (Montes, 2002). Sin embargo, ambas son alteraciones que se presentan en animales sanos y no se relacionan necesariamente con alguna patología.

La presencia de trombocitopenia en 3 casos no estaría asociada con los hallazgos señalados anteriormente, por el contrario, se postula que los corticoides aumentarían la producción de plaquetas (McDonald, 1988). Además, los valores observados no serían suficientes para provocar un desorden de coagulación, el que se produciría con valores inferiores a 20.000 plaquetas/mL (Rudolph, 2002).

Es importante señalar que ninguno de los 7 casos en estudio presentó signos clínicos de enfermedad durante o terminado el tratamiento con la dexametasona, excepto algunos episodios de diarrea en los primeros días de tratamiento que fueron atribuidos al cambio de alimento. Esto no descarta, sin embargo, la presentación subclínica de alguna patología que pudiera explicar las alteraciones antes señaladas y que, ya sea por la duración del tratamiento o por las dosis empleadas, no evolucionó a un cuadro clínico.

#### Área vascular y tamaño tumoral

La disponibilidad de anticuerpos dirigidos contra células endoteliales ha hecho posible, mediante técnicas inmunohistoquímicas, una fácil y rápida evaluación de la actividad angiogénica en neoplasias, permitiendo determinar el efecto de drogas que interfieren con la proliferación vascular. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en medicina humana (Obermair *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2000; Izawa y Dinney, 2001).

Los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo antifactor de vonWillebrand fueron muy satisfactorios, coincidiendo con lo observado en varios tipos de cáncer en humanos (Weidner *et al.*, 1991; Obermair *et al.*, 1998) y en animales (Griffey *et al.*, 1998; González *et al.*, 2000). Este método, complementado con el análisis de imágenes asistido por un computador, permitió obtener registros precisos, rápidos y objetivos, demostrando ser una metodología útil para la evaluación de neoplasias, coincidiendo con lo informado sobre vascularización tumoral en tumores mamarios en caninos (Griffey *et al.*, 1998) y en TVT (González *et al.*, 2000).

La disminución significativa ( $p \leq 0,05$ ) del área del lecho vascular lograda en este trabajo, después de 17 días de tratamiento con dexametasona, concuerda con el aspecto macroscópico que presenta-

ron los tumores terminado el tratamiento, los que se observaron moderadamente más pálidos y menos hemorrágicos que al inicio del tratamiento, así como también con lo observado histológicamente en las muestras teñidas con tinciones corrientes.

Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura para la dexametasona, aunque no hay datos del uso de la droga en TVT, así Crum *et al.* (1985) e Ingber *et al.* (1986) encontraron que dexametasona y otros corticoides asociados con heparina inhibían la proliferación vascular en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Kull (1988) observó que dexametasona inhibía la angiogénesis en una línea de carcinoma mamario humano implantado en ratas, Arizawa *et al.* (1995) observaron que esta droga inhibía la angiogénesis y disminuía la metástasis de una línea de cáncer de colon humano en un modelo animal. Hori *et al.* (1987) vieron que el corticoide también inhibía el proceso en implantes de esponja colocados en ratones. Lansink *et al.* (1998) observaron, en un modelo *in vitro* de células endoteliales humanas, que dexametasona inhibía casi completamente la formación tubular de los vasos sanguíneos.

En la mayoría de estos casos, la inhibición de la angiogénesis estaría dada, además de su efecto proapoptótico sobre las células endoteliales, por la inhibición de algunas moléculas como el activador de plasminógeno (PA), el cual transforma el plasminógeno en plasmina, molécula que tiene un efecto proteolítico sobre la matriz extracelular, permitiendo el avance de las células endoteliales activadas y la formación de nuevos vasos (Lansink *et al.*, 1998). Además, la plasmina activa ciertas metaloproteinasas, moléculas fundamentales para la migración de células endoteliales (Griffioen y Molema, 2000). Otra molécula inhibida por la dexametasona sería el factor de necrosis tumoral (TNF), que induce la activación de integrinas y éstas facilitan la adhesión de los nuevos vasos a la matriz extracelular (Griffioen y Molema, 2000).

La leve disminución observada en el tamaño tumoral de los 7 casos luego de 2 semanas de tratamiento con dexametasona, concuerda con lo descrito en la literatura para otras drogas antiangiogénicas en general (Folkman, 1995; Brem, 1999). Es decir, que si bien existe una disminución, sólo es importante en períodos prolongados de tratamiento. Sin embargo, no hay datos consignados en la literatura sobre la relación entre tamaño tumoral y el tratamiento con dexametasona como droga antiangiogénica.

El análisis computacional mostró una significativa y marcada disminución del lecho vascular. Esto podría deberse a que este tipo de drogas no sólo bloquean la neovascularización inhibiendo la proliferación y migración de células endoteliales, sino que podrían inducir apoptosis en las células endoteliales, mecanismo mediado por la activación de caspasas, según Zhivotovsky *et al.* (1997). De esta forma se inicia la cascada apoptótica, llevando a la muerte celular.

Sin embargo, aquellos tumores que presentaron mayor reducción del lecho vascular no fueron los que presentaron la mayor reducción en volumen tumoral. Es necesario considerar que en un tumor como el TVT la regresión o involución de un lecho capilar es un proceso lento que necesita de tiempo para llevar a la lisis de las células tumorales (Folkman, 1995), requiriendo, esta modalidad de terapia, de tratamientos prolongados que deberían estar dirigidos a producir una estabilización de la enfermedad más que la reducción completa del tumor, según lo planteado por Fidler *et al.* (2001). Además, no se debería esperar una reducción total del volumen tumoral ya que, como se ha informado en la literatura (Rak *et al.*, 1995; Carmeliet y Jain, 2000; Folkman, 2001), tumores menores a 1 ó 2 mm de diámetro pueden sobrevivir sin aporte de nuevos vasos sanguíneos, lo que haría imposible eliminar completamente una masa tumoral utilizando sólo terapia antiangiogénica.

Por estas razones, se postula que esta nueva modalidad de terapia y, por lo tanto, cualquier droga antiangiogénica, debería ser utilizada como complemento a otras modalidades de terapia contra el cáncer como quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia, más que como única estrategia. Es importante recordar que la disminución efectiva del lecho vascular, aunque no lleve a una rápida caída en el volumen tumoral, sí debería estar asociada a una menor posibilidad de diseminación del proceso neoplásico a distancia.

De esta forma se ha abierto un nuevo campo en el área de la terapia anticancerosa, con prometedores resultados, llevando al desarrollo de inhibidores sintéticos del proceso angiogénico, como la talidomida, o de origen endógeno, como la angiostatina o la endostatina, orientados principalmente al campo de la medicina humana, pero con la posibilidad cierta de que en un futuro próximo se logre un desarrollo de este campo en la medicina veterinaria y tengamos nuevas armas con que contar para el tratamiento del cáncer en animales.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARIZAWA, Y.; SUTANTO-WARD, E.; FORTUNATO, L.; SIGURDSON, R. 1995. Hepatic Artery Dexamethasone Infusion Inhibits Colorectal Hepatic Metastases: a Regional Antiangiogenic Therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 2(2): 114-120.
- BREM, S. 1999. Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control Journal*, 6(5): 436-459.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. 2000. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* 407: 249-257.
- CRUM, R.; SZABO, S.; FOLKMAN, J. 1985. A New Class of Steroids Inhibits Angiogenesis in the Presence of Heparin or a Heparin Fragment. *Science*, 230(4732): 1375-0378.
- CRYNYS, V.; YUAN, J. 1998. Proteases to Die for. *Genes and Development*, 12(11): 1551-1570.
- FIDLER, I.; KERBEL, R.; ELLIS, L. 2001. Biology of cancer: Angiogenesis. In: DeVita, V.; Hellman, S.; Rosenberg, S. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 6<sup>a</sup> edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos, pp. 137-147.
- FLORES, E.; CATTANEO, G.; GONZÁLEZ, C.; CEPEDA, R. 2000. Tumor Venéreo Transmissible: Aspectos Históricos, Epidemiológicos y Terapéuticos. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 20(1):82-93.
- FOLKMAN, J. & INGBER, D. 1987. Angiostatic steroids: method of discovery and mechanism of action. *Annals of Surgery*, 206: 374-383.
- FOLKMAN, J. 1995. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 333: 1757-1763.
- FOLKMAN, J. 2001. Angiogenesis. In: Braunwald, E.; Fauci, A.; Hauser, S.; Jameson, J.; Kasper, D. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Vol. 1). 15<sup>th</sup> edition. Editorial McGraw-Hill. USA, pp. 517-530.
- GONZÁLEZ, C.M.; GRIFFEY, S.M.; NAYDAN, D.K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B.R. 2000. Canine Transmissible Venereal Tumour: a Morphological and Immunohistochemical Study of 11 Tumours in Growth Phase and during Regression after Chemotherapy. *Journal of Comparative Pathology*, 122: 241-248.
- GRIFFEY, S.; VERSTRAETE, F.; KRAEGEL, S.; LUCROY, M.; MADEWELL, B. 1998. Computer-assisted Image Analysis of Intratumoral Vessel density in Mammary Tumors from Dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 59(10): 1238-1242.
- GRIFFIOEN, A.; MOLEMA, G. 2000. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases and Chronic Inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2): 237-268.
- HORI, Y.; HU, D.; YASUL, K.; SMITHER, R.; GRESHAM, G.; FAN, T. 1987. Differential Effects of Angiostatic Steroids and Dexamethasone on Angiogenesis and Cytokine Levels in Rat Sponge Implants. *British Journal of Pharmacology*, 118: 1584-1591.
- INGBER, D.; MADRI, J.; FOLKMAN, J. 1986. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology*, 119: 1768-1775.

- IZAWA, J.; DINNEY, C. 2001. The Role of Angiogenesis in Prostate and Other Urologic cancers: a review. *Canadian Medical Association Journal*, 164(5): 662-670.
- KORSMEYER, S.; ZINKEL, S. 2001. Molecular biology of cancer: Apoptosis. In: DeVita, V.; Hellman, S.; Rosenberg, S. *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 6ª edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Estados Unidos, pp. 111-122.
- KULL, F. 1988. Reduction in Tumor Necrosis Factor Receptor Affinity and Cytotoxicity by Glucocorticoids. *Biochemical and Biophysical Research Commun*, 153(1): 402-409.
- LANSINK, M.; KOOLWIJK, P.; VAN HINSBERGH, V.; KOOISTRA, T. 1998. Effects of Steroid Hormones and Retinoids on the Formation of Capillary-like Tubular Structures of Human Microvascular Endothelial Cells in Fibrin Matrices is Related to Urokinase Expression. *Blood*, 92(3): 927-938.
- LÓPEZ, M.; LEYGTHON, C.; GRAF, M. *Técnicas de Laboratorio para Citología e Histopatología*. 2ª edición. U. de Chile, Fac. de Medicina, Dpto. de Biología Celular y Genética, pp. 104-111.
- MALONNE, H.; LANGER, I.; KISS, R. 1999. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical and Experimental Metastasis* 17: 1-14.
- MCDONALD, L. 1988. Hormonas que influyen sobre el metabolismo. In: Booth, N.; McDonald, L. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (Vol. 1). Editorial Acribia. Zaragoza, España, pp. 629-672.
- MONTES, G. 2002. Eritrocitos. In: Rudolph, W.; Villouta, G. *Manual de hematología clínica veterinaria*. U. de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pec., Dpto. de Patología Animal. Santiago, Chile, pp. 23-33.
- MORENO, A.; VIDART, J.; GONZÁLEZ, L.; ASENIO, J.; FURIO, V.; CORONADO, P.; CRISTOÓBAL, I.; HERRAIZ, M.; ESCUDERO, M. 2000. La medición de la angiogénesis Tumoral como Factor Pronóstico Eficaz para el Cáncer de Ovario. Resultados Preliminares. *Acta Obstetricia et Ginecológica*, 13(6): 326-330.
- OBERMAIR, A.; WANNER, C.; BILGI, S.; SPEISER, P.; KAIDER, A.; REINTHALLER, A.; LEODOLTER, S.; GITSCHE, G. 1998. Tumor Angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density With Survival. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, 196: 126-131.
- O'REILLY, M.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277-285.
- O'REILLY, M. 2002. The Combination of Antiangiogenic Therapy with Other Modalities. *The Cancer Journal*, 8(1): 89-99.
- RAK, J.; ST CROIX, B.; KERBEL, R. 1995. Consequences of Angiogenesis for Tumor Progression, Metastasis and Cancer Therapy. *Anti Cancer Drugs*, 6: 3-18.
- ROGERS, W.; RUEBNER, B. 1977. A retrospective study of probable glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 170: 603-611.
- RUDOLPH, W. 2002. Hemostasis. In: Rudolph, W.; Villouta, G. *Manual de Hematología Clínica Veterinaria*. U. de Chile, Fac. de Cs. Vet. y Pec., Dpto. de Patología Animal. Santiago, Chile, pp. 59-71.
- SCHIMMER, B.; PARKER, K. 2003. Corticotropina; esteroides de la corteza suprarrenal y sus análogos sintéticos; inhibidores de la síntesis y efectos de las hormonas suprarrenales. In: Goodman-Gilman, A. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 10ª edición. Editorial MacGraw-Hill. Ciudad de México, México, pp. 1667-1696.
- WEIDNER, N.; SEMPLE, J.; WELCH, W.; FOLKMAN, J. 1991. Tumor Angiogenesis and Metastasis - Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *N England J Med* 324: 1-8.
- ZHIVOTOVSKY, B.; BURGESS, D.; SCHKEGEL, J.; PORN, M.; VANAGS, D.; ORRENIUS, S. 1997. Proteases is Fas-mediated Apoptosis. *Journal of Cell Biochemistry*, 64(1): 43-49.