

01664

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**HISTOGENESIS DEL TUMOR VENEREO
TRANSMISIBLE DE LOS PERROS.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:
PATOLOGIA**

P R E S E N T A :

M.V.Z. RAFAEL FRANCISCO COLIN FLORES

**ASESORES: DRA. NURIA DE BUEN DE ARGÜERO
DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL HABITO DE GANAR.

Ganar no es un algo que se presenta esporádicamente. Es un algo que sucede en todo tiempo. No se gana de vez en cuando, por que las cosas no se hacen bien de vez en cuando, sino que se hacen bien todo el tiempo. Ganar es un hábito. Desafortunadamente también lo es perder.

Siempre que un jugador de football sale a la cancha, debiera jugar como un todo. Un todo desde los pies hasta la cabeza. Cada centímetro de el deberá jugar. Algunos juegan con el cerebro, cosa que esta bien porque debemos ser listos e inteligentes para ser el número "uno" en cualquier cosa; pero es aún más importante jugar con el corazón, con cada fibra de nuestro cuerpo. Si tenemos la suerte de encontrar a alguien con mucho cerebro y mucho corazón, tendremos la certeza de que nunca saldrá del campo en segundo lugar.

El manejo de un equipo de football es igual al de cualquier otro equipo, organización, ejercito, partido político o negocio. Los principios son los mismos. El objetivo es ganar, vencer al otro. Tal vez esto suene duro o cruel. Yo no lo creo así.

Es una realidad de la vida que el hombre es competitivo, y que los juegos más competitivos atraen a los hombres más competitivos. Por eso están ahí, para competir y ganar. Conocen perfectamente las reglas y los objetivos cuando salen a jugar. La meta es ganar limpia, honesta y decentemente, a corde con las reglas, pero ganar.

En verdad nunca he conocido a un hombre que con el tiempo y muy dentro de su corazón no aprecie el trabajo duro y la disciplina. Hay algo en todo buen hombre que lo impulsa hacia la disciplina y la dura realidad del combate frente a frente.

Creo firmemente que la mejor hora de cualquier hombre, su logro más grande y su mayor satisfacción, es aquel momento en que después de haber trabajado arduamente con todo su empuje, esfuerzo y dedicación a favor de una causa noble, se encuentre exhausto en el campo de juego, ¡Victoriosos!.

Vince Lombardi
(Head Coach, Green Bay Packers)

DEDICATORIAS

A mis padres, **Melba y Rafael** por su apoyo incondicional, amor y confianza en todas las etapas de mi vida. Además por fundar en mí todos los valores necesarios para mi desarrollo personal y profesional.

A mis hermanos, **Melba y Carlos**, que como siempre en las buenas y en las malas hemos estado y estaremos unidos con todo.

A mis Abuelos, **Francisco y Manuel**, que aunque físicamente no están, siempre jugarán un papel primordial por su filosofía de la vida.

A mis Abuelitas, **Carolina y Margarita** por su amor, consejos y ser tan complacientes.

A mis tías y tíos, **Mirna** por su perfeccionismo y ternura, **Manuel** por su creatividad, **Mildred** por sus ganas de vivir, **Miguel** por su nobleza, **Mirtha** por su constancia y cariño.

A los primos; **Maurilio, Manuel, Miguel, Enrique, Pepe, David, Cesar y Beto** por compartir su vida.

A Gizela,

por llegar a mi vida, brindarme su comprensión, ternura, buen
humor, gran paciencia, pero sobre todo **AMOR.**

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Nuria de Buen de Argüero**, por sus consejos, confianza, enseñanzas, paciencia; solo por mencionar algunas, pero sobre todo que es un ejemplo a seguir.

A **Emma Serrano**, por su invaluable colaboración en este trabajo, así como ser una buena amiga.

A **Jaime Córdova**, por su colaboración en la elaboración del material fotográfico.

Al **Dr. Jose Jessurum** y al Departamento de Patología del Hospital Universitario de la Universidad Estatal de Minnessota, por su desinteresada colaboración y financiamiento del presente estudio.

A mis amigos; **Andres Barrera, Enrique Aburto, Emma Serrano, Ricardo Rodríguez, Jaime Córdova, Jorge Alanis, Juan Alvarez, Luis Calzada, Josefina del Río, Armando Trejo, Luis Ignacio Montesinos**, por compartir momentos agradables.

A **Sasha**; por estar conmigo, darme cariño, agradecimiento siempre.

Gracias

DATOS BIOGRÁFICOS.

El autor nació en la Ciudad de México el 28 de enero de 1963, cursó sus estudios de licenciatura de 1981 a 1985 en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, obteniendo el título profesional de M.V.Z., con mención honorífica en 1986. Obtuvo su residencia en Patología Veterinaria en 1987. Cursó los estudios de Maestría en Ciencias Veterinarias: Patología de 1991 a 1993.

En la actualidad es Profesor Asociado "C" de Tiempo Completo en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM. Presidente de la Sociedad de Egresados del Posgrado en Patología Veterinaria. Socio Titular por parte de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C. Consejero Técnico Titular por el Colegio de Ciencias Médicas Básicas de la FMVZ-UNAM.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	22
LITERATURA CITADA	26
CUADROS	35
FIGURAS	38

RESUMEN

MVZ Colín Flores Rafael Francisco. Histogénesis del Tumor Venéreo Transmisible de los Perros (Bajo la dirección de Dra. Nuria de Buen de Argüero y Dr. Francisco Trigo Tavera).

El Tumor Venéreo Transmisible (TVT) fue descrito por primera vez en 1820 y transplantado de perro a perro en 1876 por Novinsky. El tumor ha sido descrito como enzoótico en diferentes países, donde se asocia la frecuencia de presentación a un estrecho contacto entre los perros, sobrepoblación de perros callejeros, entre otros.

Se utilizaron 50 casos de archivo del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM diagnosticados previamente como TVT. Posteriormente los cortes fueron teñidos utilizando la técnica de complejo avidina-biotina-peroxidasa, sometiéndolos a diferentes baterías de anticuerpos monoclonales comerciales (específicos para perro) como: alfa 1 antitripsina (AAT), alfa 1 antiqumiotripsina (AACT), lisozima (Lis), Leu-7, Leu-M1, antígeno leucocitario común (ALC), citoqueratina (CK), vimentina (Vim), proteína S-100 (PS100), Enolasa Neurona Específica (ENE), Pan B, Factor VIII, Ulex. En el presente estudio se encontró que para AAT, AACT, Lis, ALC, Pan B, Leu 1, Leu 7, Factor VIII, Ulex, resultaron negativos.

Por otro lado, para ENE 15 casos (30%) resultaron negativos, 6 casos (12%) positividad discreta, 29 casos (58%) positivos moderadamente. Con la PS 100, 33 casos (66%) resultaron negativos, 2 casos (4%) positivos discretamente, 5 casos (10%) positivos en forma moderada, 10 casos (20%) positividad intensa. Vim; 29 casos (40%) en forma leve, 29 casos (38%) positividad moderada, 11 casos (22%) intensamente positivo. CK 27 casos (54%) negativos, 17 casos (34%) positivos levemente, 6 casos (12%) positivos moderadamente. Se encontró asociación estadísticamente significativa para ENE, PS100, Vim y Ck de $p < (0.001)$ con la prueba de ji cuadrada, Mantel Haenzel y Exacta de Fisher. La positividad y las asociaciones estadísticamente significativas, sugieren que la estirpe histológica de TVT sea de tipo neuroectodérmico.

HISTOGENESIS DEL TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE DE LOS PERROS.

INTRODUCCION.

Las neoplasias en la actualidad son una de las principales causas de muerte en los perros (35). Como resultado del mejor cuidado veterinario, viven más tiempo y son más susceptibles a las enfermedades de animales viejos tales como los tumores (35,41).

El tumor venéreo transmisible (TVT) fue descrito por primera ocasión en 1820 y trasplantado de perro a perro en 1876 por Novinsky (1, 2, 20, 25, 30, 31, 35, 38, 39, 44, 50). También ha recibido los nombres de granuloma venéreo, tumor de Sticker, sarcoma transmisible, linfogranuloma venéreo y tumor venéreo contagioso, sarcoma infeccioso, linfosarcoma infeccioso, condiloma canino (20,25,30,31,34,44). El tumor ha sido descrito como enzoótico en diferentes países como Puerto Rico, Bahamas, Irlanda, Japón, China, Kenia, Indonesia, Estados Unidos (20,25,29,30,31,42) donde se asocia la frecuencia de presentación a que existen condiciones como un estrecho contacto entre los perros, o a que existen gran cantidad de perros sin restricciones de la actividad sexual lo cual ocurre en ciudades con sobrepoblación y pobre control zoonosanitario (30,35,41). Asimismo, algunos estudios revelan que el incremento en la frecuencia de presentación tiene una correlación positiva con la temperatura media anual alta y precipitación pluvial, se ha observado una correlación negativa en la prevalencia de TVT a nivel de hospitales veterinarios (36). En México, en 1988 se realizó un estudio en el

Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM encontrando de 858 casos de neoplasias remitidos para su estudio el 7.4% (64 casos) fueron TVT (21). De 131 casos de diagnóstico por biopsia de TVT, Morales y González, concluyeron que 76 correspondían a hembras y 55 a machos, siendo sus principales presentaciones en órganos genitales y un 14% de los casos en localizaciones extragenitales (40).

El TVT se ha reconocido en forma natural solo en los perros, y no existe predisposición de raza. Se presenta en animales jóvenes callejeros que se encuentran en actividad sexual donde las hembras son más susceptibles que el macho (12,35,41). Comúnmente el TVT afecta a los genitales externos, y generalmente es transmitido por el coito. El desarrollo del tumor de perro a perro es probablemente facilitado por la especial característica de que en el curso de la relación sexual en esta especie quedan lesiones de la mucosa vaginal o peneana, lo cual provee el lecho necesario para el trasplante del tumor (35). El tumor también puede transmitirse por lamido de genitales de perros afectados (35,41). Experimentalmente, el TVT se ha transplantado desde 1876, en diferentes estudios seriados, y se encontró que el tumor no presentó cambios histológicos, ni tampoco en su capacidad de establecerse en individuos susceptibles (47). Sin embargo, el TVT nunca pudo ser transplantado cuando se utilizaron células tratadas a diferentes condiciones, como la congelación, calor, glicerina, disecadas (41).

La neoplasia puede desarrollarse seguida de inoculaciones o inyecciones de células viables tumorales vía subcutánea, intraperitoneal, subaracnoidea, irritación

cutánea o de la mucosa genital, pero no existen informes del establecimiento del TVT cuando se colocan células viables tumorales en piel o mucosa intacta (41).

El TVT se ha transplantado a algunos miembros de la familia *Canidae*, tales como perros, lobos, coyotes, chacales, zorras, así como a ratones desnudos y hamster (19,27,35,41). Por otro lado, en diferentes estudios a nivel internacional, se ha informado en esta neoplasia, que el número de cromosomas son de 58-59 y que de éstos 16 a 17 son metacéntricos y 43 acrocéntricos (23); se sabe que el cariotipo normal de un perro es de 78 cromosomas. Se sugiere un mecanismo de transmisión celular por sus constantes y altamente específicas aberraciones cromosomales, además de que se ha demostrado el complejo de histocompatibilidad (DL-A) expresado en la superficie membranal de las células tumorales el cual es idéntico al complejo de histocompatibilidad de células normales de perros originarios de diferentes partes del mundo (34,35,39,41). El crecimiento del tumor es rápido en principio y lento después, lo cual indica inhibición del crecimiento de tipo inmunológico (38,41). Esto se debe a la alta expresión del antígeno tumoral del TVT con la disminución en la inhibición de adherencia leucocitaria en las etapas iniciales y posteriormente, la formación de IgG anti-TVT y en menor proporción contra DL-A; además de la presencia del complemento, así como los linfocitos con antígeno timocítico (Ta) en su superficie membranal ayudan a la destrucción de células tumorales y por lo tanto la regresión del tumor in vivo (36,38).

Los signos clínicos comunmente referidos por los propietarios de los perros con TVT son el sangrado persistente por vulva o prepucio, si el tumor se encuentra

en los genitales externos. Sin embargo, si existe presentación intranasal de TVT, frecuentemente provoca estornudo y epistaxis. Una observación interesante es que los perros que tienen este tipo de tumor desarrollan policitemia, por lo que se sugiere que las células viables de TVT probablemente sintetizan y secretan eritropoyetina (35,41).

El aspecto macroscópico del TVT presenta diferentes formas. Puede ser pedunculado, nodular, papilar, multinodulado descrito como apariencia de "coliflor", de tamaño variable ya que va de 0.5 cm a 15 cm. Pueden ser únicos o múltiples, se encuentran en los genitales externos donde pueden hacer prominencia a través de la vulva y prepucio. Sin embargo, hay informes de sitios extragenitales como la piel, párpado, cavidad nasal, cavidad oral, cavidad craneana y existe un informe de metástasis en hígado, cavidad peritoneal y linfonódulos regionales (13,22,30,35,39,41,44,52,53). Los hallazgos microscópicos de esta, son células acomodadas formando masas compactas o láminas y ocasionalmente cordones separados por estroma fino de tejido conectivo fibroso. Las células son redondas, ovoides o poliédricas con citoplasma escaso a moderado eosinofílico con núcleo redondo, hiper cromático y nucleolo central, las mitosis son numerosas de 6 - 8 por campo observado con el objetivo de gran aumento (40X). Además se describe la presencia de células fusiformes que posiblemente indican la transformación y regresión de células tumorales, abundantes linfocitos, escasas células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos con áreas de ulceración y necrosis (12,20,22,25,28,30,31,35,37,45,47,40,50).

Ultraestructuralmente el citoplasma es abundante, con retículo endoplásmico granular, mitocondrias grandes, así como proyecciones citoplasmáticas interdigitales, sin embargo se encuentra libre de ribosomas (18,26,35,36).

El origen del TVT no se conoce, aunque se ha sugerido una etiología viral, sin embargo no ha podido ser confirmada esta teoría (3,26,35,41,48, 49).

El origen celular del TVT se desconoce. En varias ocasiones se ha descrito como tumor derivado de linfocitos, histiocitos, células reticulares y células maduras de tipo endotelial. Sin embargo, las características ultraestructurales sugieren un origen linforeticular (1, 2, 3, 16, 26, 27, 30, 34, 35, 37, 41, 45, 50). Por Inmunohistoquímica se han realizado escasos estudios para el diagnóstico del TVT, no existe información consistente de los marcadores que han sido empleados (32,33,46,48).

De lo anterior se deriva que el determinar la histogénesis del tumor venéreo transmisible de los perros contribuirá a conocer mejor el comportamiento de esta neoplasia, y con esto probablemente facilitará las estrategias de prevención y control del TVT en los individuos de la familia *Canidae*.

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHC) es un método esencial y complementario de la histopatología. Las técnicas de inmunoperoxidasa (IP) son un grupo de procesos inmunoenzimáticos capaces de demostrar varias sustancias (antígenos) en células y tejidos (29). Estas técnicas están basadas en la habilidad de anticuerpos específicos

que localizan y se unen a su correspondiente antígeno. Dependiendo del tipo de método empleado de IP, uno o varios anticuerpos pueden ser utilizados en la reacción. En esta variación del proceso de IP la enzima activa de peroxidasa es usada en la presencia de una peroxidasa hidrogenada y un cromógeno para visualizar el resultado de la reacción. El color de esta reacción depende del cromógeno usado. El cromógeno más usado es la Diaminobenzidina (DAB) presentándose como gránulos de color café de depósito en el sitio de reacción antígeno-anticuerpo (5,6,7,9,10,17).

HISTORIA Y SU ENTORNO.

Durante muchos años han sido empleados Anticuerpos con sustancias que permiten ver partes específicas de las células en secciones de tejido. El isotiocianato de fluoresceína y otros componentes fluorescentes fueron de las primeras sustancias dirigidas a anticuerpos, sin producir un color contrastante y su visualización requiere un microscopio fluorescente con sus limitantes problemas como: experiencia en la interpretación, reacciones no permanentes, cortes por congelación entre otras (42,46). Aunque los anticuerpos conjugados con fierro, introducido en 1959, produjeron suficiente opacidad para el microscopio fotónico y electrónico, la pobre penetración del conjugado fierro, la disposición no específica del fierro en tejidos y en el medio que lo contiene han limitado su uso (14,24,29,42,46).

En 1966 los anticuerpos con enzimas se introdujeron independientemente por Avrameas y Uriel, así como Nakane y Pierce. El conjugado anticuerpo-enzima retiene sus propiedades enzimáticas e inmunológicas y por lo tanto con la capacidad de unirse a ciertos antígenos en tejidos y cambiar el color para un adecuado sustrato cromógeno. Diferentes enzimas han sido empleadas para la conjugación con anticuerpos, pero se obtiene mejores resultados con peroxidasa (25,34,46).

Independientemente del reactivo de conjugación que se use, algunos anticuerpos permanecen sin conjugarse (sin marcar) siguiendo la conjugación enzima-anticuerpo. Estos anticuerpos sin conjugarse compiten con los anticuerpos enzima-conjugados por sus lugares antigénicos reduciendo así en un grado considerable, la sensibilidad de la técnica. Esta reducción condujo a un desarrollo de procedimientos más sensibles de anticuerpo - enzima sin marcar. El prototipo de estos procedimientos fue el método de enlace enzima - inmunoglobulina que fue introducido por Sternberger y Mason en 1969. En 1970 se modificó el método del enlace con el desarrollo de la técnica del anticuerpo no marcado peroxidasa - antiperoxidasa. Numerosos procedimientos de inmunoperoxidasa han sido introducidos en los últimos años. De todos los procedimientos antiguos y nuevos los dos más comúnmente empleados son: la técnica peroxidasa - antiperoxidasa y el complejo avidina - biotina (5,6,7,11,17,25,29)

TECNICA PEROXIDASA - ANTIPEROXIDASA (PAP)

Es un método altamente sensible que permite utilizar altas diluciones de los anticuerpos, obteniendo buenos resultados a la observación microscópica ya que esto disminuye de manera importante la presencia de tinción inespecífica. El complejo de peroxidasa - antiperoxidada consta de un anticuerpo dirigido contra peroxidasa de raíz fuerte y un antígeno de peroxidasa raíz fuerte que forma un complejo inmune estable. El complejo PAP se une al anticuerpo primario dirigido contra un marcador específico que es buscado en la célula o tejido, por medio de un anticuerpo primario y que sirve como puente. Este método es comunmente utilizado debido a su gran especificidad de los reactivos (42,50).

COMPLEJO AVIDINA - BIOTINA (ABC)

El método del complejo de avidina - biotina explota la alta afinidad de unión que existe entre la biotina y la avidina. La avidina es una lipoproteína que está presente en la clara de huevo y la biotina es una vitamina del grupo de la vitamina B1 que tiene la propiedad de poderse conjugar con varias moléculas de peroxidasa, además de una alta afinidad por la avidina. Lo fundamental de este método es que incluye muchas moléculas de peroxidasa, muchas más que el método de PAP, y esta ampliación de la inmunomarcación da al método gran sensibilidad y estabilidad lo que permite trabajar con altas diluciones del anticuerpo primario (5,6,7,29,42,51).

CONTROLES

Como en otras técnicas inmunológicas, los resultados de reacciones de inmunoperoxidasa no son válidas a menos que existan controles y estándares apropiados. La especificación de muchos anticuerpos comerciales y no comerciales, son usualmente determinados por técnicas menos sensibles, como la inmunoprecipitación. Las técnicas de inmunoperoxidasa como la ABC y PAP son de mayor grado de sensibilidad; por lo tanto es imperativo que la especificidad de cada nuevo anticuerpo sea determinada usando controles de secciones histológicas positivas y negativas que sean conocidas cada vez que se corra la prueba de inmunoperoxidasa (17,24).

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

El examinador no sólo debe estar familiarizado con las características de una verdadera reacción positiva, sino que también debe estar alerta de toda la variabilidad posible en los resultados dependiendo de la naturaleza del tejido y el tipo de anticuerpo que se esté usando. Inclusive uno debe de estar familiarizado con la naturaleza de la lesión que se está estudiando y saber como combinar el criterio morfológico convencional con el resultado de la reacción inmunológica.

Las causas potenciales de mala interpretación de las técnicas de inmunoperoxidasa son de naturaleza técnica o de criterio empleado en los marcadores.

Quando la Diaminobenzidina (DAB) es usada como un cromógeno, una reacción de inmunoperoxidasa positiva se caracteriza por la presencia de gránulos color café en el lugar donde está la reacción antígeno - anticuerpo.

Resultados falsos negativos pueden ocurrir cuando:

1. Un anticuerpo es inapropiado debido a que esta desnaturalizado o usado a una concentración errónea.
2. Son caracterizadas combinaciones no específicas del anticuerpo con el tejido.
3. Existe presencia de peroxidasa endógena dentro del tejido en su estudio o la afinidad por el complejo avidina - biotina por algunos elementos celulares ocurre.

Actualmente se debe tener en mente la posibilidad de que un marcador puede ser específico para un cierto tipo de célula el día de hoy y en el futuro puede reaccionar con otros.

El número de antígenos que se han detectado con inmunohistoquímica en secciones de tejido es enorme y va creciendo a un ritmo constante.

Teóricamente, cualquier sustancia antigénica que persiste por lo menos parcialmente, en secciones de tejido, puede ser demostrada por medio de esta técnica. Con el advenimiento de la tecnología monoclonal un gran número de anticuerpos están a la disposición. Aunque algunos de estos anticuerpos han demostrado que son muy útiles, hay que ser particularmente cuidadoso en no sobreinterpretar los resultados en un tejido específico.

Algunas de las aplicaciones en medicina veterinaria son:

1. Determinar la estirpe histológica de neoplasias anaplásicas.
2. Clasificar y tipificar células de acuerdo a los componentes propios (ejemplo, linfomas).
3. Identificar agentes infecciosos tales como virus, bacterias, parásitos y hongos.
4. El empleo simultáneo de esta técnica con el estudio ultraestructural, tanto para la identificación de células como para la de agentes infecciosos (inmunomicroscopía electrónica).

Existen algunas ventajas que tiene la inmunoperoxidasa en comparación con la inmunofluorescencia. Mientras que para la inmunofluorescencia se requiere de tejidos frescos, los cortes se realizan en congelación, además de que para la observación de las reacciones se necesita un microscopio de fluorescencia, y la duración de la reacción es corta (42,46,51). En el caso de la inmunoperoxidasa se puede realizar en tejidos fijados en formalina amortiguada al 10%, líquido Bouin principalmente. Además de que se puede realizar la técnica en tejidos coloreados primeramente con tinciones habituales (HE, PAS, MASSON, etc), o también en una misma sección de tejido realizar más de una reacción de IP, pero una de las ventajas más importantes es que en este tipo de técnica, es que la reacción es permanente (5,6,7,17,29,42,51).

HIPOTESIS.

Dados los estudios de microscopía fotónica y electrónica las células del tumor venéreo transmisible de los perros tendrán reacciones positivas para los marcadores de tipo linfocítico por medio del complejo avidina - biotina - peroxidasa.

OBJETIVOS.

Determinar la histogénesis del tumor venéreo transmisible de los perros.

Determinar que la técnica de inmunohistoquímica del complejo avidina - biotina - peroxidasa es útil para establecer la estirpe histológica del TVT.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 50 casos de archivo del Departamento de Patología de la FMVZ de la UNAM, que fueron previamente diagnosticados como TVT. Dichos casos estuvieron fijados en formalina amortiguada al 10% con pH 7.4 durante 24 horas, de los cuales se obtuvieron cortes de 4 micrómetros de grosor a partir de las muestras incluidas en parafina que fueron utilizadas para el diagnóstico histopatológico llevado a cabo por microscopía fotónica.

INMUNOHISTOQUIMICA.

Los cortes fueron teñidos utilizando la técnica del complejo avidina - biotina - peroxidasa, en el Departamento de Patología del Colegio de Medicina Veterinaria y el Departamento de Patología del Hospital Universitario de la Universidad Estatal de Minnesota; Minneapolis Minnesota, en los Estados Unidos de Norteamérica e interpretados en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Las secciones de tejido de TVT se sometieron a las diferentes baterías de anticuerpos comerciales monoclonales específicos para perro*.

** Biogenex Corporation, Dublin California. USA.*

Dako Corporation. Sta. Barbara California. USA.

Vector Corporation, Burlingame California. USA.

Con criterio de selección con base en: la morfología en la microscopía fotónica, ultraestructural así como inmunotinciones descritas previamente en la literatura internacional, que sugieren la probable estirpe histológica del TVT como vascular, otros autores epitelial y algunos más linforeticular para lo cual en este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Alfa 1 - antitripsina (AAT). Es una glicoproteína responsable de la mayor actividad antiproteolítica del suero. Es sintetizada en los hepatocitos, histiocitos y monocitos, se utiliza para el diagnóstico diferencial de procesos tumorales de las células antes mencionadas (42).

Alfa 1 - antiqumotripsina (AACT). Es una glicoproteína antiproteolítica, sintetizada en histiocitos que se utiliza para el marcaje de tumores de macrófagos circulantes o tisulares (42).

Lisozima (Muramidasa). Es una sustancia bacteriolítica que se encuentra en la leche, lágrima, saliva, suero. Es un marcador de monocitos, histiocitos y desórdenes linfoproliferativos (42).

Leu - 7. Es un marcador específico para la superficie celular de linfocitos y monocitos. Se utiliza en procesos linfoproliferativos y mielomonocíticos (8,51).

Leu - M1. Es un antígeno marcador de células monocíticas granulocíticas que se expresa consistentemente en individuos que presentan linfomas tipo Hodgkin y también en linfomas de células T y recientemente se ha utilizado en casos proliferativos de células mesoteliales (8,51).

Antígeno Leucocitario Común (ALC). Es una glicoproteína presente en la membrana celular de la línea hematolinfoide y se utiliza en el diagnóstico de linfomas (8).

Citoqueratina (CK). Es un conjunto de proteínas del grupo de los filamentos intermedios presentes en las células epiteliales de las cuales se expresan de 2 a 10 queratinas en los diferentes tipos de epitelios dependiendo del desarrollo embrionario, grado de diferenciación y condiciones del medio; por lo que se utiliza para la identificación de células epiteliales (8).

Vimentina (Vim). Es un polipéptido del grupo de los filamentos intermedios que se encuentran en células de origen mesenquimal, así como en algunos tumores de estirpe epitelial (8).

Proteína S-100 (PS100). Es una proteína de bajo peso molecular que inicialmente se consideró como un marcador glial. Sin embargo, se ha encontrado en melanocitos, células de Langerhans, histiocitos, condrocitos, lipocitos, músculo cardíaco, músculo estriado, células de Schwann, células epiteliales y mioepiteliales (8,42).

Enolasa Neurona Específica (ENE). Son isoenzimas presentes en células de estirpe neuroendócrina y neuronal (8).

Pan B- Es un antígeno membranal presente en todas las células de estirpe linfocítica de la línea B (51).

Factor VIII. Es una glicoproteína presente en el plasma, plaquetas, células endoteliales y se utiliza para identificar algunos desórdenes sanguíneos y tumores de origen vascular (42).

Ulex. Es una glicoproteína presente en células endoteliales, semejante al factor VIII y se utiliza para diagnosticar tumores de estirpe vascular (8,42).

Una vez realizada la selección de anticuerpos se procedió a desparafinar y rehidratar las secciones por medio de inmersión secuencial de las laminillas en xileno - etanol en diferentes grados de concentración y se enjuagaron con agua bidestilada. A continuación, se inactivó la peroxidasa endógena tisular por inmersión de las laminillas en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.5% en metanol por 30 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la digestión enzimática proteolítica, incubando las laminillas en una solución de 50 mg. de proteasa XIV en 100 ml. de 0.1 Mph 7.4 en solución amortiguada de fosfatos (SAF) (precalentada a 37C) por 15 minutos lavando las secciones en SAF 3 veces por 5 minutos cada una.

Después se efectuó el bloqueo de la adherencia de proteínas en las secciones de tejido mediante la incubación por 30 minutos en SAF suplementado con suero normal de conejo al 4.0%, y posteriormente la solución se drenó de las laminillas. Se aplicó el anticuerpo primario fabricado en carnero; diluido en SAF al 4% con suero normal de conejo y se incubó 24 hrs. a 4 °C; posteriormente se lavó con SAF 3 veces 5 minutos en cada ocasión. Se puso en contacto al anticuerpo secundario fabricado en conejo unido a la biotina (biotinilado) a una dilución de 1:200, en SAF al 4% con suero normal de conejo, se incubaron las laminillas durante 30 min. a temperatura ambiente y después se lavaron las secciones en SAF por 5 minutos 3 veces. Se aplicó el complejo avidina - biotina - peroxidasa, se incubó durante 30 minutos a

temperatura ambiente lavando posteriormente las secciones de tejido en SAF por 5 minutos.

Para concluir se utilizó el cromógeno 3,3 diaminobenzidina 4HCL (DAB) 1 mg/ml en SAF suplementado con H₂O₂ (10 microlitros de H₂O₂ al 50% en 5 ml. de SAF). Se aplicaron 4 gotas en cada sección y se incubaron las laminillas 5 minutos, posteriormente se lavaron las secciones en SAF tres veces por cinco minutos. Una vez concluida la técnica se realizó la contratinción con hematoxilina para observarse al microscopio. Con cada anticuerpo utilizado, se emplearon controles positivos de tejidos totalmente diferenciados, así como un control negativo, que sólo estuvo en contacto con suero normal de conejo (8,24,41,50).

Terminada la metodología antes descrita, se procedió a la observación de las laminillas en el microscopio fotónico evaluando la intensidad en cada caso con base en la siguiente escala:

(-) = *negativo.*

(+/-) = *positivo en forma incipiente.*

(+) = *positiva en forma discreta.*

(++) = *positivo en forma moderada.*

(+++)= *positivo fuertemente.*

Se realizó el análisis estadístico mediante tablas de contingencia y las prueba de ji-cuadrada, Friedman, Exacta de Fisher, Mantel - Haenszel en el programa para computadora SPSS (Statistical Package for Social Sciences) (43). Se clasificaron de acuerdo al criterio determinado internacionalmente para estirpe epitelial, hemolinfoide, vascular, neurogénico (8,42,51).

RESULTADOS.

De los 50 casos de TVT sometidos a la batería de anticuerpos, en el grupo de la estirpe linfoide, histiocítica, monocítica como AAT, AACT, Lisozima, ALC, Pan B, Leu -1, Leu -7, los 50 casos (100%) resultaron negativos (Cuadro 1).

Así mismo para el factor VIII, Ulex, que son marcadores empleados para plaquetas, células endoteliales los 50 casos (100%) resultaron negativos (Cuadro 2).

Por otro lado, cuando se empleó ENE se encontraron 15 casos (30%) negativos, 35 casos (70%) positivos, de los cuales 29 casos (58%) con reacción moderada y 6 casos (12%) con positividad discreta (Cuadro 3, Figura 1).

Mientras que para PS-100, 33 casos (66%) fueron negativos, 17 casos (34%) positivos, de estos últimos 2 casos (4%) con reacción discreta, 5 casos (10%) con reacción moderada y 10 casos (20%) con reacción fuertemente positiva (Cuadro 3, Figura 2).

En el caso de VIM, 50 casos (100%) resultaron positivos, de los cuales 20 casos (40%) con reacción discreta, 19 casos (38%) con reacción moderada y 11 casos (22%) con reacción fuertemente positiva (Cuadro 3, Figura 3).

Por otro lado, con CK 27 casos (54%) fueron negativos, 23 casos (46%) positivos de los cuales 17 casos (34%) con reacción discreta, 6 casos (12%) con reacción moderada (Cuadro 3, Figura 4).

DISCUSIÓN.

El tumor venéreo transmisible es un proceso de transmisión sexual que afecta al sistema genital y otros órganos de los perros (1,2,3,12,13,16,18,19,20,26, 27,28,30,31,35,41). Existen factores que contribuyen a la presentación y desarrollo de la enfermedad como el coito, lameduras entre perros con TVT, el vivir en regiones tropicales y subtropicales, así como perros callejeros (31,35,44).

En los casos de TVT revisados, cuando se pusieron en contacto con los anticuerpos AAT, AACT, lisozima, ALC, Pan B, Leu 1, Leu 7, los cuales se indican para marcar células de la estirpe linfóide, monocitos, e histiocitos, resultaron negativos. No existen informes en la literatura acerca del empleo de los mismos, y el hecho de que no existiera marcaje con dichos anticuerpos sugiere que el TVT no parece tener como estirpe histológica de origen a estas células.

Mientras que, para el caso de los anticuerpos que se utilizan como marcadores de plaquetas y células endoteliales, como son factor VIII y Ulex, en que resultaron negativos la totalidad de los casos, no existen informes en la literatura a nivel mundial de la utilización de estos para diagnósticos de TVT. Estos resultados nos indican que esta neoplasia no tiene componentes de origen vascular. Por otro lado, cuando se emplearon marcadores como ENE se encontró asociación estadísticamente significativa $p < (0.001)$ por medio de la prueba de ji cuadrada, para la positividad y la intensidad de la reacción lo cual sugiere que el TVT contiene enolasa similar a la de las células de estirpe neuroendócrina. Esto difiere con los datos encontrados a nivel internacional, en donde solo existe un informe (48) el cual

describe el empleo de la enolasa neurona específica para marcar TVT, sin embargo resultó negativo. La diferencia de este informe con el presente estudio podría estar asociado al tamaño de la muestra, a la naturaleza del anticuerpo, la dilución del mismo o a la técnica empleada (8,51).

Mientras que, cuando se utilizó PS 100 se encontró asociación estadísticamente significativa $p < (0.001)$ por medio de la prueba de ji cuadrada para la positividad e intensidad de la reacción, lo cual indica que el TVT contiene a este filamento intermedio que está presente normalmente en las células de origen neuroectodérmico, y algunos de origen mesodérmico. Este hallazgo no concuerda con los datos encontrados en la literatura mundial, en donde solo en un estudio se describe el uso de la proteína S 100 para marcar al TVT (48). Esto podría estar asociado a factores como el tamaño de la muestra, pureza y naturaleza del anticuerpo, así como algunos otros factores en el proceso de las muestras (8,50). Cuando se utilizó Vim se encontró asociación estadísticamente significativa para la positividad $p < (0.001)$ y no se observó diferencia significativa estadísticamente en la intensidad de la reacción $p > (0.232)$ con la prueba de ji cuadra y ANOVA-Friedman respectivamente; lo cual nos indica que el filamento intermedio está presente en las células de TVT. Dichos hallazgos concuerdan con el único informe que existe en la literatura a nivel mundial, lo cual nos sugiere que este tumor contiene Vimentina como las células de origen mesodérmico y ectodérmico.

En el caso de la CK, se encontró asociación estadísticamente significativa $p < (0.001)$ por medio de la prueba de ji cuadrada, para positividad e intensidad de la

reacción, lo cual indica que el TVT contiene a este filamento el cual normalmente está presente en células de estirpe epitelial. Este hallazgo difiere con lo referido en la literatura (4,48) en donde han resultado negativas las células de este tumor cuando se han puesto en contacto con este anticuerpo. Esto puede deberse no solo al tamaño de la muestra, al tipo, dilución o la técnica empleada, sino también a que se ha observado que las células epiteliales pueden expresar de 2-10 queratinas diferentes, lo cual depende la diferenciación celular, condiciones del medio y estadio de la lesión (8).

Por otro lado, se encontró asociación estadísticamente significativa en positividad para los marcadores de estirpe neuroectodérmica como lo son la ENE, PS100, los de tipo epitelial tales como la Citoqueratina y Vimentina con la prueba de ANOVA-Friedman con $p < (0.001)$. Además se observó asociación para ENE-PS 100 con $p < (0.05)$ y $p < (0.001)$; ENE-Vim $p < (0.001)$ y $p < (0.001)$; ENE-CK $p < (0.001)$ y $p < (0.001)$; PS 100 - Vim $p < (0.001)$ y $p < (0.001)$; PS 100 - CK $p < (0.001)$ y $p < (0.001)$; Vim- CK $p < (0.01)$, $p < (0.00361)$ y $p < (0.00458)$ con la prueba de ji cuadrada, Mantel Haenszel y exacta de Fisher respectivamente, para con las células tumorales en estudio.

La positividad y las asociaciones estadísticamente significativas para los marcadores antes descritos, sugieren que la estirpe histológica del TVT sea de tipo neuroectodérmico. Sin embargo hay que realizar más trabajos de este tipo, como lo es la inmunomicroscopía electrónica con el objetivo de determinar más componentes antigénicos de las células de TVT, y con ésto establecer con más

precisión la estirpe celular de origen de este tumor en perros. Este constituye el primer informe de su tipo publicado en México.

LITERATURA CITADA

1. Adams, E.W.; Moore, E.G.; and Carter, L.P.: Canine Venereal tumor: Biologically active Deoxyribonucleic Acid from canine venereal tumor cell. *Am. J. Vet. Res.* 29: 1241-1233 (1968).
2. Amber, E.T. and Henderson, R.A.: Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaira-Nigeria. *J. Am. An. Hosp. Assoc.* 18: 350-352 (1982).
3. Amber, E.T.; Isitor, G.; and Adeyanju, B.: Viral like particles associated with naturally occurring transmissible venereal tumor in two dogs: preliminary report. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2613-2615 (1985).
4. Bacchi, C.A.; Negrette, M.S.: Absence of reaction for cytokeratin in the immunoperoxidase test for canine Transmissible venereal tumor. *Rev. Med. Vet. Buenos Aires It.* 158-160: (1990).
5. Bayer, A.; Skitelky, E.M.: The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods Enzymol* 62:308, (1979).
6. Battifora, N.: The multitumor (sausage) tissue block. Novel method for immunohistochemical antibody testing *Lab. Invest* 55: 244-248,(1986).

7. Battifora, N.: Clinical applications of the immunohistochemical of filamentous proteins. *Am J Surg Pathol* 12:24-42.(1988).
8. Battifora, H.: Inmunohistología en Patología Quirúrgica. *Memorias de la XVII Congreso Latinoamericano de Patología*. Sociedad Venezolana de Anatomía Patológica. Octubre 10-20, 1989, Caracas, Venezuela.
9. Bohn, H.; Inaba, N.; Luben, G: New placental proteins and thier potencial diagnostic significance as tumor markers. *Oncodev biol Med* 2,141-153.(1980).
10. Bretschneider, A.; Burns, W.; Morrison, A: "Pop off" technique. The ultrastructure of paraffine embedded-section. *Am J Clin Pathol* 76: 450-453.(1981).
11. Brooks, JJ.: Immunohistochemistry of soft tissue tumors. Myoglobin as tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Cancer* 50: 1757-1763,(1982).
12. Brodey, R. and Roszel, J.F.: Neoplasms of the canine uterus, vagina and vulva: a clinicopathologic Survey. *J.Am. Vet. Med. Ass.* 151: 1294-1307 (1967).

13. Brown, N.; Calvert, C. and MacEwen, G.: Chemotherapeutic Management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. . *J. Am. Vet. Med. Ass.* 181:463-464 (1982)
14. Busachi, C.A.; Ray, M.B.; Desmet, V.J: An immunoperoxidase technique for demonstrating membrane localized HBs Ag in paraffin sections of liver biopsies. *J Immunol Methods* 19:95,(1978).
15. Carcangiu, M.L.; Sibley, R.K.; Rosai, J: Clear cell change in primary thyroid tumors. A study of 38 cases. *Am J Surg Pathol* 9: 705-722,(1985).
16. Carvert, C.; Leifer, C.E.; and MacEwen, G.: Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. . *J. Am. Vet. Med. Ass.* 181: 363-364 (1982).
17. Ches, Q.; Hajdu, S.I: The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 30: 1-7,(1985).
18. Cockrill, J.M. and Beasley, J.N.: Ultrastructural Characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages fo growth and regression *Am. J. Vet. Res* 36: 677-681 (1975).

19. Cockrill, J.M. and Beasley, J.N.: Transmission of transmissible venereal tumor of the dog to the coyote. *Am. J. Vet. Res.* 40: 409-410 (1979).
20. Crisotofori, F.; Aaden, S. and Cheddi, A.: Description du sarcome venerien transmissible chez un Chien (Sarcome de Sticker) en Somalie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop* 38: 235-238 (1985).
21. De Buen, N.; Candanosa, E.; y Castillo, G.: Diagnóstico citológico en Veterinaria, análisis de 3563 casos. *Vet. Mex.* 19: 211-215 (1988).
22. Duncan, J.R. and Prease, K.W.: Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol.* 16: 673-679 (1979).
23. Fujinaga, T.; Yamashita, M; Yoshida, M.C.; Mizuno. S.; Okamoto, Y; Tajima, M; Otowo, K. Chromosome analysis of canine transmissible sarcoma cells. *J. of Vet. Med.* 36: 481-484 (1989).
24. Haines, D.M.; Chelack, B.J.: Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues of diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn Invest* 3: 101-112 (1991).

25. Heyderman, E.: Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods and controls. *J. Clin. Pathol.* 32: 971, (1979).
26. Higgins, D.A.: Observations on the canine transmissible venereal tumors as seen in the Bahamas. *Vet. Rec.* 79: 67-71 (1966).
27. Hill, D.L.; Yang, T.L. and Watchell, A.: Canine transmissible venereal sarcoma: tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. *Vet. Pathol.* 21: 39-45 (1984).
28. Holmes, J.M.: Measurement of the rate of death of canine transmissible venereal tumour cells transplanted in dogs and nude mice. *Res. Vet. Sci.* 30: 248-250 (1984).
29. Hsu, S.M.; Raine, L.: Protein A, Avidin and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem Cytochem* 29: 1349, (1981).
30. Ivoghli, B.: Canine transmissible venereal tumor in Iran. *Vet. Pathol.* 14: 289-290 (1977).

31. Jubb, R.C.; Kennedy, K. and Palmer, N.: Pathology in Domestic Animals. 3rd. Edition, Vol. 3. *Academic Press* 1985.
32. Jones, T.C. and Hunt, R.D.: Veterinary Pathology 5th. edition. *Lea and Febiger* Philadelphia, Pa. 1983.
33. Laging, C.; Kroning, T.: Observations on the canine transmissible venereal tumour. Retrospective study of tumours sent to the Institut für Tierpathologie of Ludwig-Maximilians University, between 1975-1987.: *Tierärztliche-Praxis* 17: 85-87 (1989).
34. Lewis, R.E. Jr; Johnson, W.W.; Cruse, J.M.: Pitfalls and caveats in methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis. *Surv Synth Pathol Res.* 1:134-152 (1983).
35. Mc Entee, K., and Nielsen, S.W.: In bulletin of the world health organization. International histological classification of tumours of domestic animals. *World Health Organization.* 50: 1-2 (1974).
36. Mc Ewen, G.: In clinical veterinary oncology., *J.B. Lippincott company* Philadelphia, Pa 1989.

37. McLeod, G., and Lewis, J.: Transmissible venereal tumor with metastases in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **161**: 199-200 (1972).
38. Mizuno, S.; Fujinaga, T.; Tajima, M.; Otomo, K.; Koike, T.: Role of lymphocytes in dogs experimentally re-challenged with canine transmissible sarcoma. *Jap. J. Vet. Sci* **51**: 86-95 (1989).
39. Mohanty, G.C., and Rajya, B.: Growth and Morphological Characteristics of canine venereal tumor cells in vitro. *Vet. Pathol.* **14**: 420-425 (1977).
40. Morales, S.E; González, C.G.: Informe de los casos de Tumor Venereo Transmisible en perros diagnosticados por Biopsia en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM entre 1985 y 1993. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. p. 154, Acapulco Gro. México. 1994.
41. Murray, M.; James Z., and Martin, W.B.: A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. *Res. Vet. Sci.* **10**: 565-568 (1969).
42. Nadji, M. and Azorides, R.M.: Immunoperoxidase techniques: A practical approach to tumor diagnosis. *American Society of clinical pathologist*. Chicago, 1986.

43. Navarro, R.: Introducción a la bioestadística. *Mc Graw Hill*, México, D.F. 1987.
44. Nielsen, S.W. and Kennedy, P.C.: In tumors in domestic animals 3rd. edition, *University of California Press*. Los Angeles, California, 1990.
45. Parent, B.; Teuscher, E.; Morin, J., and Byuchaert, A.: Presence of the canine transmissible venereal tumor in the nasal cavity of dogs in the area of Dakar Senegal. *Can. Vet. J.* 24: 287-288 (1983).
46. Rosai, J.: Ackerman's Surgical Pathology. 7th ed. *C. V. Mosby Company*. St. Louis, Missouri, 1989.
47. Rust, J.: Transmissible Lymphosarcoma in the dog. . *J. Am. Vet. Med. Ass.* 40: 10-14 (1949).
48. Sandusky, G.E.; Carlton, W. and Wingtman, K.: Diagnostic Immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet. Pathol.* 24. (1987).
49. Sapp, W.J. and Adams, E.W.: C-Type viral particles in canine venereal tumors cell cultures. *Am. J. Vet. Res* 31: 1321-1323(1970).

50. Stewart, H.L.; Snell, K.C; Dunham, L.J; Schlyen, S.M.: Transplantable and transmissible Tumors of Animals *Armed Forces Institute of Pathology* Washington, D.C. 1959.
51. Taylor, C.R.: Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, Pa. 1986.
52. Van Resenburg, I., and Petrick, S.: Extragenital malignant transmissible venereal tumour in a bitch. *J. South Afr. Vet. Ass. 51: 199-201 (1980).*
53. Yang, T.I.: Metastatic transmissible venereal sarcoma in a dog. *J. Am. Vet. Med. Ass. 190: 555-556 (1987).*

CUADRO 1

Distribución de casos de TVT con anticuerpos que marcan la estirpe linfoide, histiocítica y monocítica.

	AAT	AACT	Lisozima	ALC	Pan B	Leu 1	Leu 7
(-)	50/50 (100%)						
(-+)	0	0	0	0	0	0	0
(+)	0	0	0	0	0	0	0
(++)	0	0	0	0	0	0	0
(+++)	0	0	0	0	0	0	0

(-) = negativo

(-+) = incipiente

(+) = discreto

(++) = moderado

(+++)= severo

CUADRO 2

Distribución de casos de TVT con anticuerpos que marcan las plaquetas y células endoteliales

INTENSIDAD	FACTOR VIII	ULEX
(-)	50/50 (100%)	50/50 (100%)
(+-)	0/50 (100%)	0/50
(+)	0/50	0/50
(++)	0/50	0/50
(+++)	0/50	0/50

(-) = negativo

(-+)= incipiente

(+) = discreto

(++) = moderado

(+++)= severo

CUADRO 3

Distribución de casos de TVT con anticuerpos que marcan estirpe de tipo neuroendócrino, ectodérmico.

	ENE	PS 100	Vim	CK
(-)	15/50 (30%)	33/50 (66%)	0/50	27/50 (54%)
(+-)	0/50	0/50	0/50	0/50
(+)	6/50 (12%)	2/50 (4%)	20/50 (40%)	17/50 (34%)
(++)	29/50 (58%)	5/50 (10%)	19/50 (38%)	6/50 (12%)
(+++)	0/50	10/50 (20%)	11/50 (22%)	0/50

(-) = negativo

(-+)= incipiente

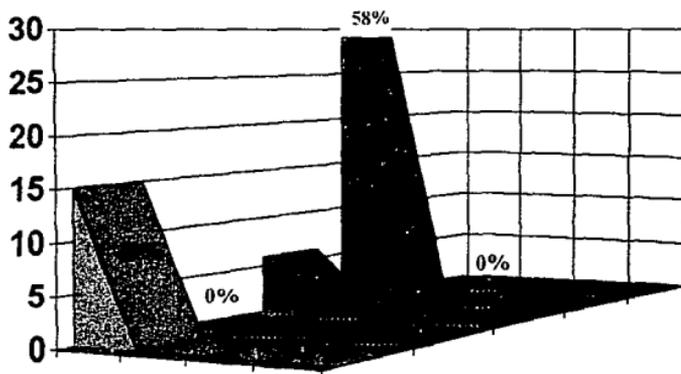
(+) = discreto

(++) = moderado

(+++)= severo

FIGURA 1

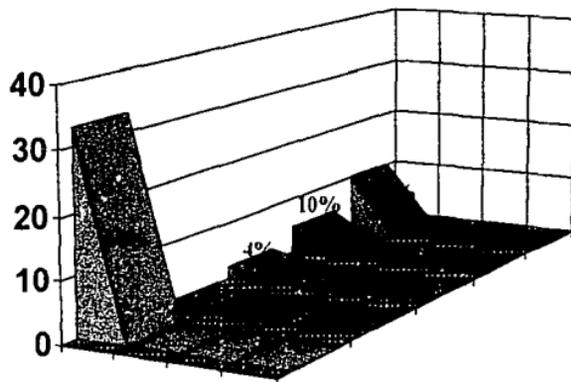
Distribución de casos de TVT marcados con enolasa
neurona específica.



■ (-) Negativo ■ (+-) Incipiente ■ (+) Discreto ■ (++) Moderado ■ (+++) Severo

FIGURA 2

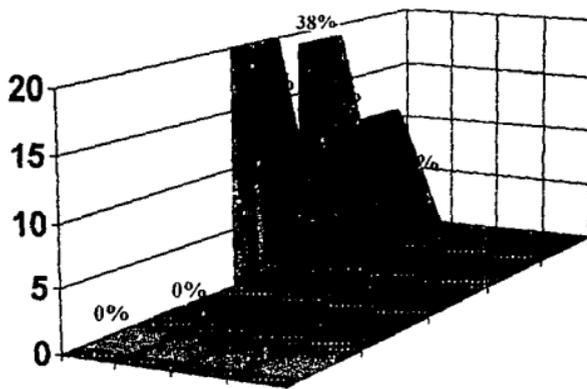
Distribución de casos de TVT marcados con Proteína S-100



■ (-) Negativo ■ (+-) Incipiente ■ (+) Discreto ■ (++) Moderado ■ (+++) Severo

FIGURA 3

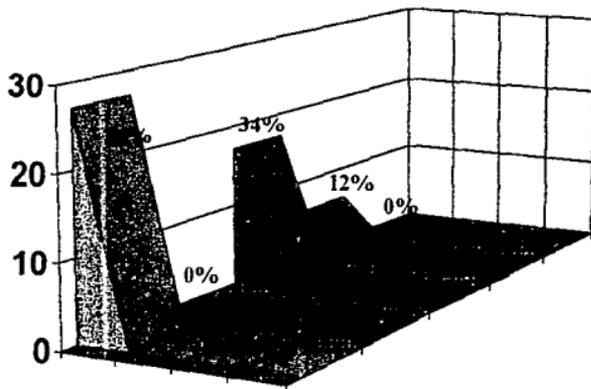
Distribución de casos de TVT marcados con Vimentina.



■ (-) Negativo ■ (+-) Incipiente ■ (+) Discreto ■ (++) Moderado ■ (+++) Severo

FIGURA 4

Distribución de casos de TVT marcados con citoqueratina.



■ (-) Negativo ■ (+-) Incipiente ■ (+) Discreto ■ (++) Moderado ■ (+++) Severo

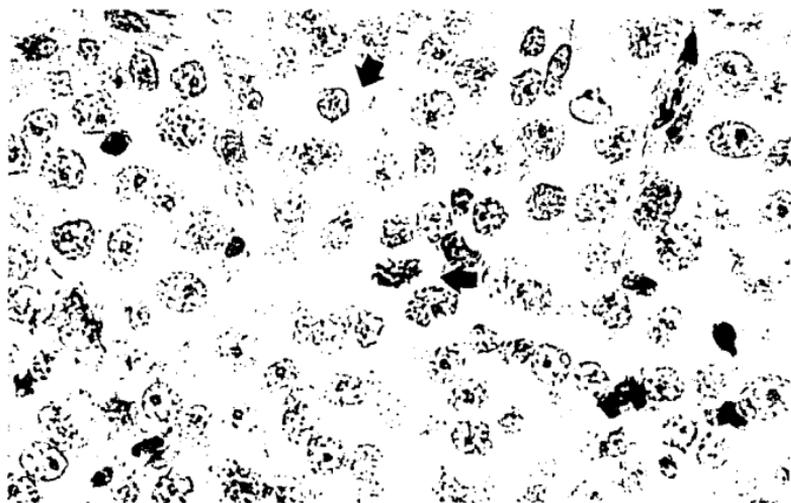


Fig. 5 Micrografía, donde se aprecian células redondas con vacuolización del citoplasma (flechas), núcleos con cromatina granular y nucléolos prominentes así como mitosis características de TVT. H&E (1000X).

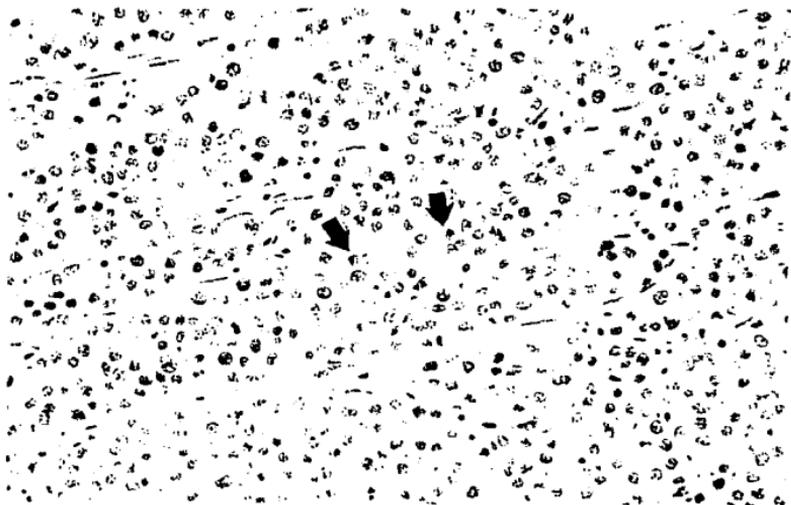


Fig 6. Micrografía de TVT, donde se observan células redondas acomodadas en cordones, sostenidas por un estroma moderado de tejido conectivo. Nótese el color amarillo-ocre en el citoplasma de las células en intensidad discreta que corresponde a la reacción antígeno-anticuerpo para Citoqueratina (flechas) (400X)

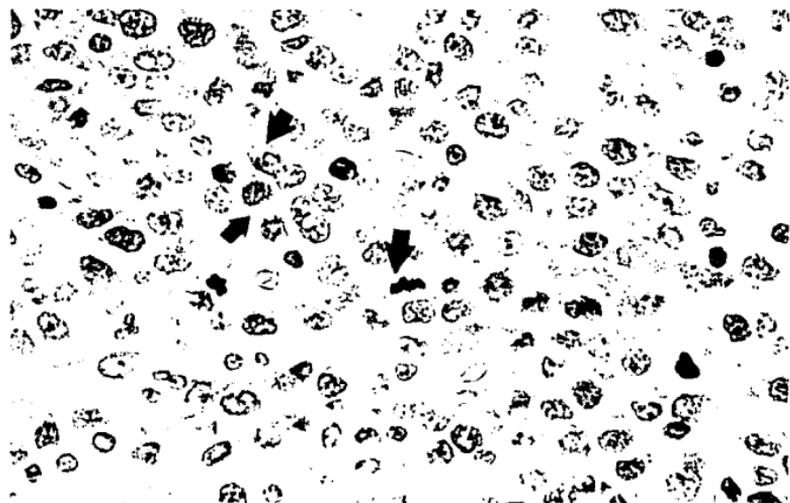


Fig 7. Inmunotinción correspondiente a Enolasa Neurona Específica en la que se observa el citoplasma de las células de TVT, de color amarillo-ocre en forma moderada (flechas). Nótese la presencia de mitosis (1000X).

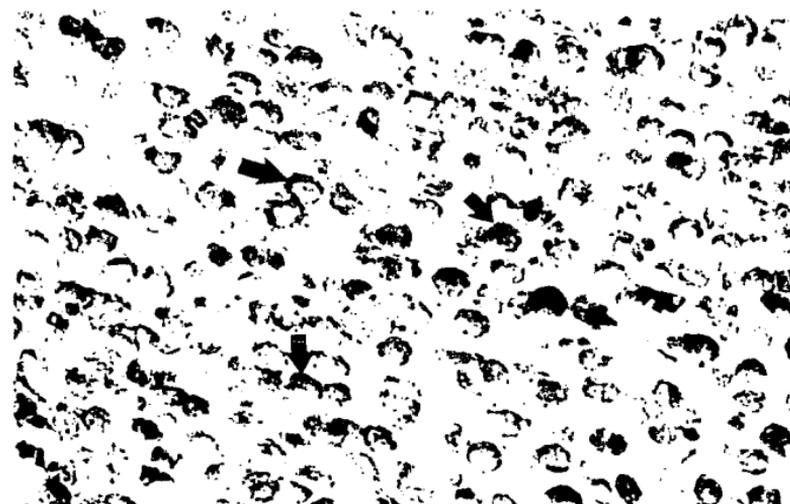


Fig 8. Inmunoperoxidasa de TVT, nótese los gránulos color café-ocre (fuertemente positivos) en el sitio de unión-antígeno-anticuerpo, dirigido en contra de proteína S100 (flechas) (1000X)