



FACULTAD DE SALUD

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ERITROPOYETINA,
INTERPRETACIÓN CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA, HEMOGRAMA Y
MORFOLOGÍA NEOPLÁSICA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL TUMOR
VENÉREO TRANSMISIBLE EN CANINOS IDENTIFICADOS EN LA PROVINCIA
DE IMBABURA**

**Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**Profesor Guía
Dr. Freddy Proaño Pérez**

**Autora
Mayra Fernanda Martínez López**

**Año
2015**

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Freddy Proaño Pérez, Ph.D.

Profesor Guía

CI: 100208116-2

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Mayra Fernanda Martínez López

CI: 100408790-2

Agradecimientos

A mi querida familia por su apoyo incondicional y cariño durante el cumplimiento de este sueño.

Al equipo de profesionales de la Universidad de Cambridge y de NationWide Specialist Laboratories, Dra. Elizabeth Murchison, Dra. Joy Archer, Dra. Cinzia Cantacessi, Dr. Tim Williams, Dra. Karina Ferreira de Castro, Helen Evans, Maire Lawlor y Andrea Strakova por su apoyo profesional, capacitación y consejos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, que financió la beca para mi desplazamiento a Inglaterra y gastos relacionados al transporte y Radio Inmuno Ensayo en el Reino Unido.

A la Ing. Margarita Mancero y al Ing. Edwin Ortiz por su colaboración y permitir la toma de muestras de este trabajo.

Al equipo de Quirófano Móvil, Patrulla Amigo Fiel, Amici Cannis y Dr. Marco Lima, por colaborar con el manejo de animales, insumos y equipos.

Al Ing. Diego Vela Tormen, por su apoyo constante, capacitación y donación de insumos.

Al Dr. Julio Ortiz y colaboradores por su apoyo en el procesamiento y diagnóstico de muestras citológicas.

Al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

Dedicatoria

A mis padres y hermano, todas las metas que he alcanzado han sido fruto de su esfuerzo, dedicación y entrega.

A Liz, mi modelo a seguir, gracias por confiar en mí y darme esta gran oportunidad.

A Freddy, mi mentor y amigo, gracias por la paciencia y consejos.

RESUMEN

El Tumor Venéreo Transmisible (TVT) es un cáncer contagioso de carácter no infeccioso presente en caninos, que se transmite por contacto directo a través del traspaso de clones celulares viables de animales portadores a susceptibles, presentando un cariotipo completamente diferente al de los caninos domésticos. Descrito por primera vez en 1876, ha sido el centro de numerosas investigaciones a nivel mundial, y aunque el Ecuador presenta un número elevado de caninos portadores de TVT, no existe ningún estudio oficial o publicación científica relacionados al tema. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles séricos de eritropoyetina, citologías, histopatologías, hemograma y morfología neoplásica, para el diagnóstico del TVT. En total, se valoraron clínicamente 559 caninos localizados en la provincia de Imbabura, distribuidos en 3 cantones; luego de la valoración clínica se tomaron muestras sanguíneas, se tomó biopsias y frotis genitales a los animales sospechosos de la enfermedad, estas fueron procesadas en Ecuador y analizadas en la Universidad de Cambridge, utilizando las pruebas de Radio Inmuno Ensayo, Hemograma, Citología e Histopatología. El análisis de todas las pruebas confirmó el diagnóstico clínico de TVT en 11 caninos (2%), los cuales presentaron una marcada eosinofilia con valores normales de hematocrito y hemoglobina en el hemograma; así también mostraron concentraciones elevadas de eritropoyetina (EPO) sérica, en relación al grupo control. Al análisis citológico e histopatológico, todos los casos positivos exhibieron células redondeadas grandes, núcleos de cromatina grumosa y vacuolas citoplasmáticas. En conclusión, la prevalencia de TVT en los cantones estudiados fue heterogénea, se demuestra la importancia de la utilización de la citología e histopatología para la confirmación del diagnóstico, la eosinofilia puede ser un indicador relacionado a la presencia de células de TVT y esta patología genera un aumento de EPO sérica en animales portadores, encontrándose el tamaño de las masas tumorales directamente relacionado a los valores de esta hormona.

ABSTRACT

Transmissible Venereal Tumour (TVT) is a non-infectious, contagious cancer present in canines and transmitted through direct contact allowing the transfer of viable cell clones from sick to susceptible animals, which has a completely different karyotype compared to domestic canines. It was first described in 1876, and has been the centre of a large number of worldwide researches since then; although Ecuador has a high number of dogs affected with TVT, there are no official studies or scientific papers issuing this problem. The aim of this study was to evaluate the serum levels of erythropoietin (EPO), cytologies, histologies, haemogram and neoplastic morphology to diagnose TVT in canines identified in Imbabura province, Ecuador. In total, 559 canines located at Imbabura province were clinically evaluated, which were distributed in 3 cantons, after clinical evaluation blood samples were collected; biopsies and genital swabs were also performed in TVT suspicious dogs, all samples were processed in Ecuador and analysed at the University of Cambridge by using Radio Immuno Assay technique, haemograms, cytologies and histopathology. The data analysis confirmed the diagnosis of TVT in 11 canines (2%), which showed a marked eosinophilia with normal haematocrit and haemoglobin values, with increased serum concentrations of EPO compared to the group of control dogs. In the cytological and histopathological analysis, all positive cases showed large rounded cells with aggregated chromatin nucleus and cytoplasmic vacuoles. In conclusion, the prevalence of TVT in the studied cantons was heterogeneous, the importance of the use of cytological and histopathological appreciation for the confirmation of suspicious cases was shown, eosinophilia can be an indicator related to the presence of TVT cells and this pathology generates a raise in the normal serum concentration of EPO in sick dogs, being the size of the tumoral masses directly related to the values of this hormone.

Índice

Capítulo I: Introducción	1
1.1 Justificación.....	3
1.2 Objetivo general	4
1.3 Objetivos específicos.....	4
1.4 Hipótesis	5
Capítulo II: Revisión Bibliográfica	6
2.1 Tumor Venéreo Transmisible Canino o Sarcoma de Sticker	6
2.1.1 Historia	6
2.1.2 Etiología	7
2.1.3 Epidemiología.....	10
2.1.4 Mecanismos de transmisión	13
2.1.5 Patogenia e inmunología.....	14
2.1.6 Signos Clínicos.....	18
2.1.7 Diagnóstico.....	20
2.1.8 Diagnóstico diferencial	21
2.1.9 Tratamiento	22
2.1.10 Control y prevención.....	26
2.2 Eritropoyetina	27
2.2.1 Estudios realizados en pacientes oncológicos humanos y caninos.	28
Capítulo III: Materiales y Métodos	32
3.1 Ubicación geográfica.....	32
3.1.1 Provincia de Imbabura.....	32
3.1.2 Provincia de Pichincha	33
3.2 Diseño del estudio.....	33
3.2.1 Grupo 1: "Positivos al examen clínico"	34
3.2.2 Grupo 2: "Control Imbabura"	34
3.2.3 Grupo 3: "Control Pichincha"	35
3.3 Materiales.....	35

3.3.1	Materiales de Campo	35
3.3.2	Materiales de Laboratorio	36
3.4	Métodos	38
3.4.1	Examen clínico	38
3.4.2	Categorización de caninos	39
3.4.3	Toma de muestras.....	40
3.4.4	Procesamiento de muestras	42
4.1	Diagnóstico clínico de TVT	52
4.2	Examen clínico y categorización	56
4.3	Hemograma	60
4.4	Citologías y análisis histopatológico	65
4.5	Eritropoyetina Sérica	68
4.6	LINE-MYC	71
	Conclusiones y Recomendaciones	72
5.1	Conclusiones.....	72
5.2	Recomendaciones.....	73
	Referencias	75
	Anexos	90

Índice de Tablas

Tabla 1.- Distribución geográfica y por género de caninos evaluados y caninos seleccionados como Control (Grupos 2 y 3).....	35
Tabla 2.- Distribución geográfica y por género de caninos evaluados y caninos diagnosticados clínicamente como positivos a TVT.....	53
Tabla 3.- Determinación de valores promedio de las constantes fisiológicas evaluadas en los Grupos Experimentales 1, 2 y 3.....	57
Tabla 4.- Comparación valores de referencia en hemograma, utilizados en un laboratorio clínico veterinario de la ciudad de Quito versus valores promedio obtenidos del Grupo 2.....	61
Tabla 5.- Comparación valores promedio obtenidos en los hemogramas pertenecientes a caninos del Grupo 1 vs los valores referenciales obtenidos del promedio de hemogramas pertenecientes al Grupo 2.....	62
Tabla 6.- Confirmación de diagnóstico positivo a TVT de los caninos evaluados por medio de cuatro métodos clínicos y de laboratorio.....	71

Índice de Figuras

Figura 1.- Células características de TVT en frotis genital teñido con técnica Diff-Quick©. Aumento 400X.....	9
Figura 2.- Distribución Mundial de TVT y Prevalencia.....	10
Figura 3.- Tumor Venéreo Transmisible, vulva, perra.....	18
Figura 4.- Métodos de tratamiento de TVT.....	25
Figura 5.- Relación geográfica del porcentaje de animales examinados en la provincia de Imbabura durante la jornada de esterilización.....	51
Figura 6.- Porcentaje de hembras y machos examinados durante la jornada de esterilización.....	51
Figura 7.- Porcentaje de caninos diagnosticados como clínicamente positivos a TVT durante la jornada de esterilización.....	55
Figura 8.- Distribución Geográfica de Caninos Positivos a TVT en la Provincia de Imbabura identificados durante la Jornada de Esterilización..	55
Figura 9.- Distribución por sexo, propietario, raza y estado reproductivo de animales categorizados en el estudio.....	57
Figura 10.- Agrupación de caninos de los tres grupos experimentales en relación a su peso corporal.....	58
Figura 11.- Agrupación de caninos de los tres grupos experimentales en relación a su edad.....	59
Figura 12.- Agrupación de caninos de los tres grupos experimentales en relación a su temperatura rectal.....	59

Figura 13.- Histograma perteneciente a valores de hematocrito del Grupo 1.....	63
Figura 14.- Histograma perteneciente a valores de hematocrito del Grupo 2.....	63
Figura 15.- Comparación de valores de eosinófilos encontrados en caninos positivos a TVT y caninos control por medio del diagrama caja-bigotes.....	65
Figura 16.- Citología perteneciente a la canina T005. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400x.....	66
Figura 17.- Citología perteneciente a la canina T005. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400x.....	66
Figura 18.- Histología perteneciente a biopsia tumoral de canina T005 Tinción H&E. Aumento 400X.....	67
Figura 19.- Comparación de concentraciones de EPO sérica entre caninos positivos a TVT y caninos control de la provincia de Imbabura por medio de Diagrama de caja-bigotes.....	68
Figura 20.- Relación peso corporal/masa tumoral de caninos positivos a TVT.....	69
Figura 21.- Correlación peso corporal/volumen tumoral vs EPO sérica en caninos positivos a TVT.....	70

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CD	Células Dendríticas
CD14⁺	Antígeno propio del sistema inmune de mamíferos, por sus siglas en inglés Cluster of Differentiation 14
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor Específico de Eritropoyetina
GAD	Gobierno Autónomo Descentralizado
GY	Gray, Unidad del Sistema Internacional que mide la dosis absorbida de radiaciones ionizantes por determinado material. Equivalente a 1 Joule absorbido por Kg de peso.
HIF-1	Factor de Transcripción Hipoxia-Inducible, por sus siglas en inglés Hypoxia-Inducible Transcription Factor
IEE	Instituto Espacial Ecuatoriano
IGM	Instituto Geográfico Militar
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
LINE	Elementos Nucleares Dispersos Largos, por sus siglas en inglés Long Interspersed Nuclear Elements
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad, por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MYC	Oncogén aislado en el virus de Mielocitomatosis Aviar, por sus siglas en inglés Avian Myelocytomatosis virus

NSE	Enolasa Neurona-Específica, por sus siglas en inglés Neuron-specific Enolase
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONG	Organización No Gubernamental
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, por sus siglas en inglés quantitative Polymerase Chain Reaction
rcEPO	Eritropoyetina Recombinante Canina
rhEPO	Eritropoyetina Recombinante Humana
RIA	Radio Inmuno Ensayo, por sus siglas en inglés Radio Immuno Assay
TGF-beta1	Factor de Crecimiento Transformante beta 1, por sus siglas en inglés Transforming Growth Factor beta 1
TVT	Tumor Venéreo Transmisibile

Capítulo I: Introducción

Desde su descubrimiento, el desarrollo y desenvolvimiento del cáncer han despertado gran interés por parte de la comunidad científica a nivel mundial, la capacidad que tiene esta mutación celular de proliferarse continuamente y ser favorecida por la selección natural, han hecho de la misma una de las más letales con su huésped, sin importar especie, edad, sexo, ni condición y por lo tanto le otorgan un carácter autodestructivo (Murchison, 2009, p.19).

Al cáncer se lo ha clasificado como una enfermedad crónica, así como a la hipertensión, falla renal crónica y enfermedad cardíaca valvular, siendo la más tratable y que menor mortalidad causa dentro de este grupo. Esta clasificación ha permitido nuevas investigaciones direccionadas a su prevención y tratamiento, incluyendo la creación de terapias moleculares con el fin de detener su crecimiento y metástasis (Ogilvie y Moore, 2008, p. 3; Elgue, Piaggio, Amaral y Pessina, 2012, p. 25).

La Organización Mundial de la Salud establece que en el año 2012, el cáncer ocasionó la muerte de 8,2 millones de personas, localizándose un 70% de las mismas en Asia, África, América Central y Sudamérica (OMS, 2014). Estudios realizados en el campo de la Medicina Veterinaria determinan que las patologías neoplásicas malignas ocasionan una elevada mortalidad en caninos de Australia, Europa, Japón y Estados Unidos, siendo afectados principalmente animales gerontes (Ogilvie y Moore, 2008, p.3).

En Latinoamérica los datos relacionados a la prevalencia e incidencia de cáncer en perros son escasos, además diversas investigaciones relacionadas a etiologías tumorales en caninos dentro de escuelas de Medicina Veterinaria en América del Sur, plantean el riesgo de posibles sesgos en los resultados obtenidos (Flores, 1986, p.1; Elgue et al, 2012, p.25). Una de las causas principales para la falta de datos relacionados a esta patología, es el diferente estatus que poseían las mascotas en el continente hace algunos años en

comparación a Europa y Estados Unidos, así como el desconocimiento de los propietarios y médicos en general de la diversidad de cánceres que perros y gatos pueden sufrir (Ogilvie y Moore, 2008, p. 3).

Aunque existen diversos agentes etiológicos, como virus y bacterias, que pueden generar cambios y mutaciones celulares, desarrollando células cancerígenas en diversos organismos, como por ejemplo: hepadnavirus, herpesvirus, serovariedades de retrovirus, papillomavirus, *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni*, entre otros, el cáncer no es clasificado como una patología transmisible (Welsh, 2011, p. 1-2). Se ha demostrado, sin embargo, que existe un tipo de cáncer que es capaz de vencer las limitaciones de proliferar en tan solo un huésped y puede propagarse entre individuos sin necesidad de un vector o intermediario (Welsh, 2011, p.2). A este tipo de cánceres se los ha clasificado como Cánceres Clonales Transmisibles, y como su nombre lo indica, su contagio depende del contacto de un individuo susceptible con uno enfermo en el que se favorece el traspaso de clones celulares capaces de proliferar exitosamente en su nuevo huésped (Murchison, 2009, p. 19).

En el mundo existen únicamente dos especies que presentan cánceres clonales transmisibles de manera natural, el perro (*Canis lupus familiaris*) y el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrissi*) (Murchison, 2009, p. 20; Welsh, 2011, p. 2; Murchison et al, 2010, p.84). El Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVT) o Sarcoma de Sticker fue descrito por primera vez en 1876 (Nowinsky, 1876 citado por Das y Das, 2000, p. 546) y desde entonces, ha sido el centro de numerosas investigaciones a nivel mundial, que tienen como fin tomar el ejemplo de un cáncer transmisible in vivo y extrapolar los resultados obtenidos al cáncer humano con la idea de comprender completamente su comportamiento y desarrollar métodos efectivos de prevención y tratamiento.

Las condiciones sanitarias en las cuales se desenvuelve la fauna urbana, tanto en grandes ciudades como en pueblos pequeños en el Ecuador, se encuentran

por lo general en detrimento del estado inmunitario de los animales, ya sea porque éstos no reciben inmuno profilaxis adecuada, no se controla de forma correcta su reproducción o simplemente sufren el abandono de sus propietarios, favoreciendo el apareamiento de patologías virales, bacterianas y parasitarias que pueden incluso suponer un riesgo para la salud pública. Un elevado número de canes portadores de TVT son diagnosticados y tratados en el país, pero una gran cantidad de médicos veterinarios tratantes desconocen el origen y fisiopatología de la enfermedad, así como carecen de un protocolo estandarizado de tratamiento con resultados investigados en diversos grupos de animales y efectos comprobados.

Esta investigación tiene como propósito el establecimiento de una línea base de información que sea de utilidad e importancia en el futuro para clínicos e investigadores que deseen ampliar los conocimientos referentes a esta patología y enfermedades asociadas con datos aplicables a la realidad nacional.

1.1 Justificación

El cáncer es un problema a nivel mundial para cuya investigación todos los gobiernos destinan gran cantidad de recursos (OMS, 2014). El Ecuador presenta un número elevado de caninos portadores de TVT convirtiéndolo en el escenario ideal para el análisis de esta patología, sin embargo no existe ningún estudio oficial o publicación científica relacionados al tema a pesar de que mundialmente existen más de 7000 investigaciones enfocadas en este tipo de cáncer.

Se requiere mayor investigación oncológica en el área veterinaria pues los resultados obtenidos son extrapolables a la oncología humana, en el país existen pocos estudios direccionados al cáncer de origen animal sin tomar en cuenta que representa datos de interés para el avance y mejora de metodologías de prevención y tratamiento utilizadas en personas, así como

también un aumento de aportes veterinarios a la investigación permitirán su acceso a medicamentos de uso humano regulados que son necesarios también para el tratamiento de pacientes veterinarios.

El estudio es parte de una colaboración mundial con la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge y el Wellcome Trust Sanger Institute, Inglaterra, referente a genética, etiopatología, epidemiología y tratamiento del Cáncer Venéreo Transmisible Canino y el Cáncer Facial Transmisible del Demonio de Tasmania, por lo tanto los resultados que se generen del mismo serán de completa utilidad para los profesionales de la institución y pueden permitir el establecimiento de futuras colaboraciones entre ambas instituciones y la Universidad de las Américas (UDLA)

Al abarcar temas de interés en la rama de oncología tanto humana como veterinaria, el estudio es también de utilidad para médicos, biotecnólogos y genetistas especializados en cáncer así como Fundaciones o Instituciones dedicadas a su investigación y Gobiernos que destinen fondos para la pesquisa de esta enfermedad.

1.2 Objetivo general

Evaluar los niveles séricos de eritropoyetina, citologías, histopatologías, hemograma y morfología neoplásica, para el diagnóstico del Tumor Venéreo Transmisible (TVT) en caninos identificados en la provincia de Imbabura.

1.3 Objetivos específicos

- Evaluar los niveles séricos de eritropoyetina circulante a través de la técnica de Radio Inmuno Ensayo (RIA) aplicada en las instalaciones de los laboratorios “NationWide Specialist Laboratories®” ubicados en Sawston, Cambridge, Reino Unido.

- Analizar los tumores de los animales afectados con TVT utilizando la técnica de evaluación citológica realizada en los laboratorios de la Clínica Veterinaria UDLA, Ecuador y posterior confirmación histopatológica realizada en el laboratorio perteneciente al "Proyecto CTVT" de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.
- Comparar los parámetros hematológicos obtenidos mediante hemogramas de caninos con Tumor Venéreo Transmisible y relacionarlos con los resultados obtenidos en el grupo control de caninos.
- Determinar la posible asociación de los niveles séricos de eritropoyetina y la presencia de TVT así como una posible correlación de la morfología tumoral con dichos valores.

1.4 Hipótesis

H1: "El Tumor Venéreo Transmisible Canino causa cambios en las concentraciones de eritropoyetina sérica, afecta los valores normales del hemograma, hematocrito y hemoglobina, encontrándose correlacionados con su morfología"

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

2.1 Tumor Venéreo Transmisible Canino o Sarcoma de Sticker

2.1.1 Historia

El Tumor Venéreo Transmisible Canino fue descrito por primera vez por el médico ruso Nowinsky en 1876, después de comprobar la transmisión efectiva de tumores entre caninos no relacionados genéticamente de diferentes razas, al frotar tejido seccionado de masas genitales tumorales en la mucosa genital lesionada de animales susceptibles, lo cual asemejaba la lesión de mucosa genital causada por el violento movimiento realizado por los animales durante el coito (Nowinsky, 1876 citado por Das y Das, 2000, p. 546; Eze, Anyanwu y Kene, 2007, p.54 ; Murchison, 2009, p. 23; O'Neill, 2011, p. 1909). Posteriormente Anton Sticker realizó estudios confirmatorios de trasplante tumoral publicados en 1906 (Sticker, 1906 citado por Murchison, 2009, p. 24) de los cuales se deriva el epónimo del TVT, "Sarcoma de Sticker" (O'Neill, 2011, p. 1909).

En el año 1952, Karlson y Mann lograron trasplantar de manera exitosa el tumor a lo largo de 17 años en 40 generaciones de perros, usando en total 564 animales, de los cuales el 68% desarrolló el tumor y dentro del cual no se documentaron cambios en su histopatología (Karlson y Mann, 1952, pp. 1197-1213). Estas características hicieron que se tomara al Tumor Venéreo Transmisible Canino como modelo popular para los investigadores del cáncer, aunque a pesar de haber recibido más de 130 años la atención de la comunidad científica, muchas de sus inusuales características aún no han logrado entenderse (Murchison, 2009, p. 24).

2.1.2 Etiología

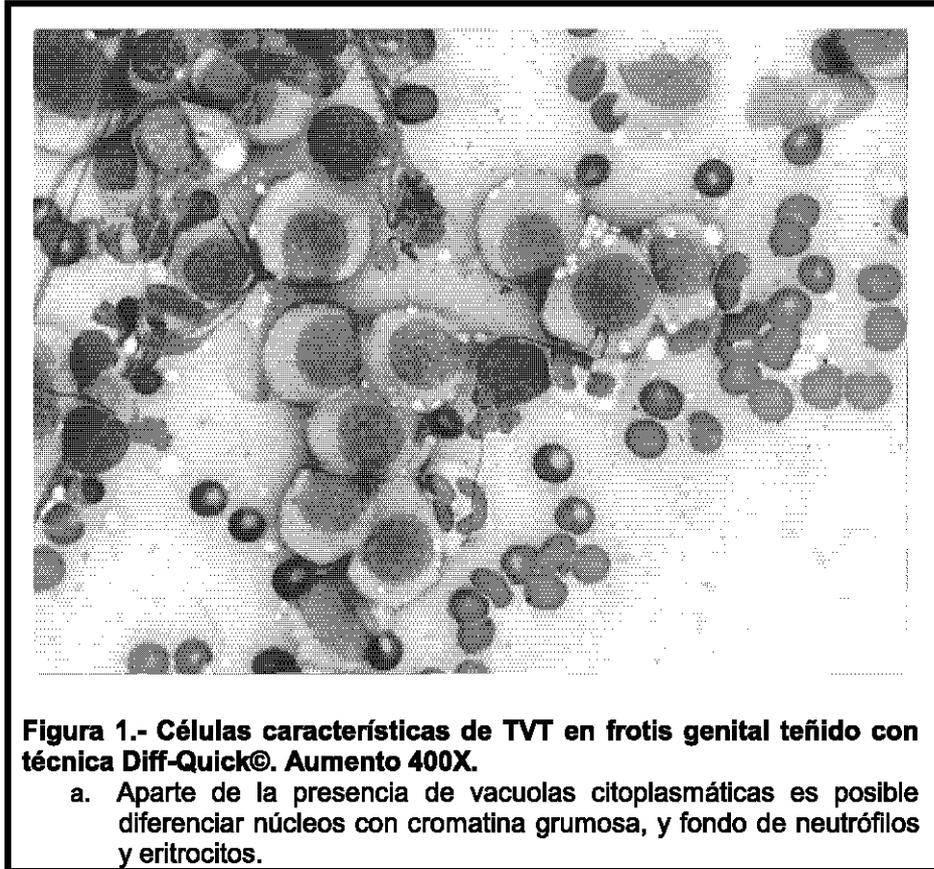
La primera teoría causal confirmada, fue el hecho de que este cáncer se transmitía de forma clonal, es decir por medio de la implantación de réplicas celulares exactas, puesto que en los estudios encabezados por Nowinsky y Sticker se demostraba que el TVT se podía transmitir por contacto directo entre animales susceptibles y animales enfermos no relacionados y porque estudios citogenéticos realizados en caninos de Japón (Makino, 1963 , pp. 1106 - 1122; Sofuni y Makino, 1963, pp. 54-149 ; Oshimura, Sasaki y Makino, 1973, pp. 1197-1203), Uganda (Wright, Peel, Cooper y Hughes, 1970, pp. 155-160), Jamaica (Thorburn, Gwynn, Ragbeer y Lee, 1968, pp. 720-727), Francia (Barski y Cornefert-Jensen, 1966, pp. 787-797), Estados Unidos (Weber, Nowell y Hare, 1965, p. 537-547 ; Murray, James y Martin, 1969, p. 565), Nigeria (Idowu, 1977, pp. 271-273) y Rusia (Kakpakova, Pogosyanz y Ponomarkov, 1968, pp. 43-50), demostraron que todos los tumores presentaban cariotipos de 57 – 59 cromosomas, en contraste al cariotipo normal canino, que presenta 78 cromosomas; demostrando que las células tumorales afectadas eran de hecho los verdaderos agentes infecciosos de transmisión (Eze et al, 2007, p. 56; Murchison, 2009, p. 24), denominándose “aloinjertos” por su acción directa sobre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de los animales afectados (O’Neill, 2011, p. 1909).

Aunque se creía que su contagio guardaba relación con partículas virales oncogénicas, como las presentadas por las serovariedades de Papillomavirus, estudios realizados en microscopio electrónico demostraron que las líneas celulares contagiadas en animales positivos a TVT, carecían de cualquier proteína vírica (Murray et al, 1969, p. 565; Das y Das, 2000, p. 546; Eze et al, 2007, p.56).

2.1.2.1 Características citogenéticas

El TVT es la línea celular somática más antigua conocida, en la actualidad se ha podido secuenciar su genoma y se ha demostrado que ha adquirido alrededor de 1,9 millones de mutaciones somáticas de sustitución y demuestra también la evidencia de la influencia de la luz ultravioleta. Este cáncer es bastante estable y no presenta heterogenicidad subclonal a pesar de que a lo largo de los años ha sufrido miles de cambios. Apareció por primera vez en un perro con heterocigocidad genómica baja hace aproximadamente 11000 años; el cáncer engendrado por este individuo se dispersó a todos los continentes hasta hace 500 años atrás y permanece presente en todo el mundo hasta la actualidad (Murchison et al., 2014, pp. 437-440). Como se ha descrito anteriormente, el TVT presenta un cariotipo completamente diferente al de los caninos domésticos, siendo en número menor (alrededor de 59 cromosomas) y conteniendo 12 – 15 cromosomas metacéntricos o submetacéntricos, mientras los perros poseen únicamente dos (Murchison, 2009, p. 24).

La evidencia final para sustentar la teoría de transmisión clonal, es la identificación de la inserción de un elemento LINE cerca del locus MYC en el genoma del TVT. Esta nueva disposición genómica ha sido identificada en un gran número de TVTs distribuidos de forma global, pero no se la ha encontrado en ningún otro tejido canino, por lo tanto se la considera evidencia diagnóstica para este tipo de cáncer (Murchison, 2009, p.24; O'Neill, 2011, p.1910).

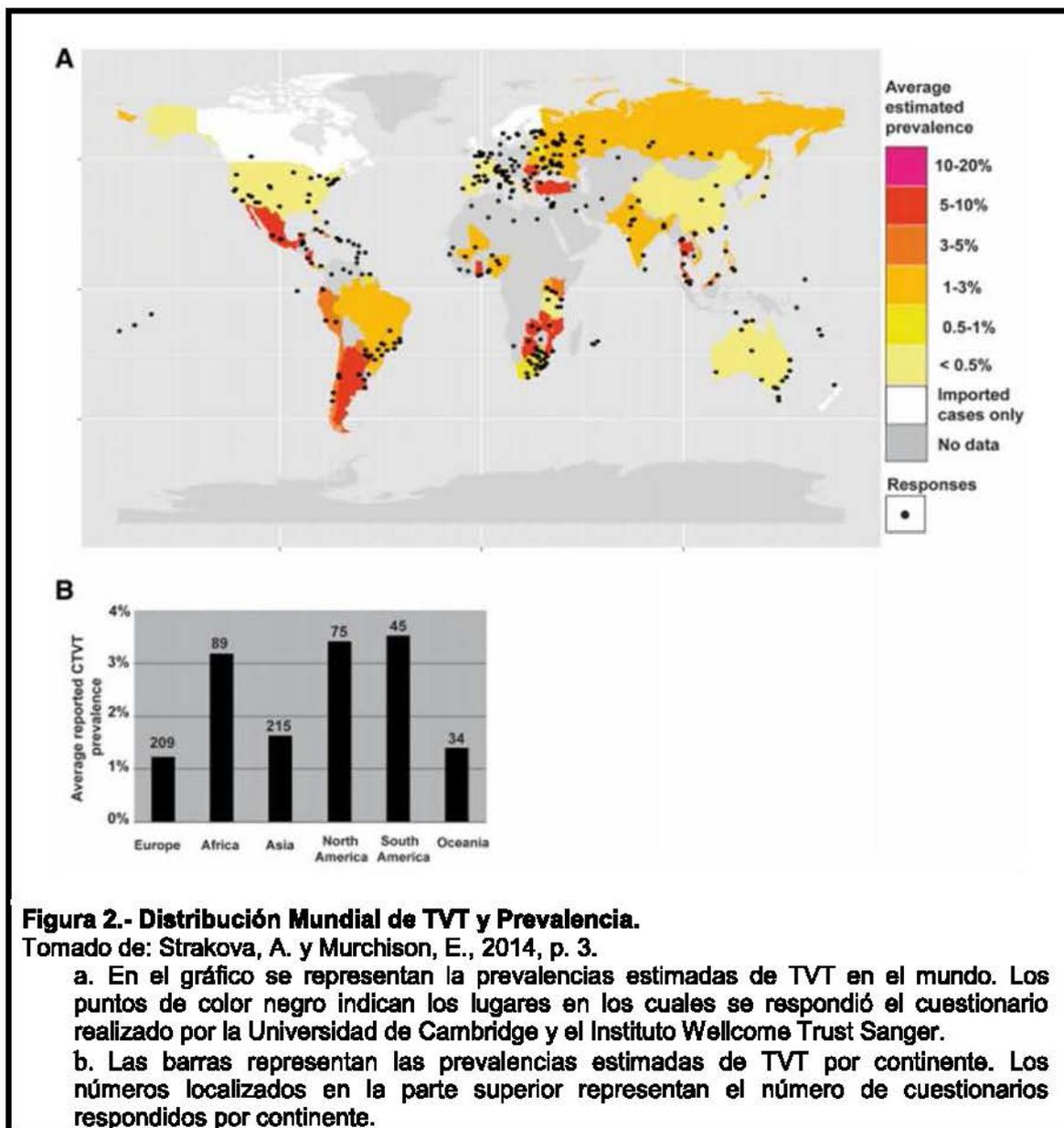


Microscópicamente las células del TVT se observan de forma redondeada a poliédrica, con núcleos centrales y prominentes nucléolos, y además vacuolas citoplasmáticas distintivas (Hernández-Jáurequi, González-Angulo y de la Vega, 1973, pp.1187-1196; Cockrill y Beasley, 1975, p. 667; Hill, Yang y Wachtel, 1984, p. 40; Murchison, 2009, p. 24), forma clásica de tumores de células redondas como el Linfoma, Plasmocitoma, Histiocitoma y Mastocitoma (Ogilvie y Moore, 2008, p.669). Aunque hasta la actualidad se las ha clasificado como células indiferenciadas, la expresión de lisozimas, alfa-1-antitripsina, NSE y vimentina, permiten sospechar que el TVT se deriva de la línea de los macrófagos (Sandusky, Carlton y Wightman, 1986, pp. 495 – 499; Gimeno, Massone, Marino e Idiart, 1995 publicado el 2009, pp. 645 -650; Mozos, Méndez, Gómez-Villamandos, Martín de las Mulas y Pérez, 1996, pp. 257 - 263; Marchal, Chabanne, Kaplanski, Rigal y Magnol, 1997, pp. 1 - 11; Mukaratirwa, Chimonyo, Obwolo, Gruys y Nederbragt, 2004, pp. 1117 - 1123; Murchison, 2009, p. 24), evidencia sustentada por el hecho de que estas células pueden ser parasitadas por *Leishmania infantum*, un microorganismo

que normalmente infecta macrófagos (Albanese, Poli, Milanta y Abramo, 2002, pp. 243 -246; Catone et al, 2003, pp. 549 - 553; Murchison, 2009, p. 24).

El TVT puede ser transmitido únicamente por células tumorales viables, estudios realizados han demostrado que el tumor no puede ser producido por células congeladas, calentadas, tratadas con glicerina, ni disecadas, ni tampoco con infiltrados carentes de células tumorales (Stubbs y Furth, 1934, pp. 280 - 283).

2.1.3 Epidemiología



El Tumor Venéreo Transmisible Canino es de distribución mundial, en una investigación realizada en el 2013, en base a un cuestionario publicado por el Instituto Wellcome Trust Sanger de Cambridge, Reino Unido, en su página oficial en conjunto con la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido, y basada en las respuestas de médicos veterinarios, ONG's y asociaciones veterinarias de diferentes países (Strakova, 2013, pp. 10 - 11), se observó que los países con mayor prevalencia de TVT fueron Lesoto, Marruecos, Costa de Marfil y Gambia, cuya cifra de caninos afectados se encontraba entre el 10 – 20%; países como Samoa, Belice, Botswana, Cambodia, Ecuador, Ghana, Granada, Honduras, Laos, Mauritius, México, Nicaragua, Rumania, Sri Lanka, Tailandia, Turquía, Venezuela y Zambia arrojaron prevalencias del 5 – 10%; Argentina, Chile, Costa Rica, Cuba, Dominica, Fiji, Guyana, Kenia, Malawi, Micronesia, Mozambique, Paraguay, Perú y Timor-Leste presentaron prevalencias entre 3-5%; por el contrario países localizados en Europa del Este, Norte y Central (Austria, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Alemania, Hungría, Malta, Holanda, Eslovenia, Suecia, Suiza y Reino Unido) se reportaron libres de CVTC a excepción del diagnóstico de casos provenientes de animales importados desde países localizados en Europa del Sur como Francia, España y Portugal; existe mayor diversidad de casos en Europa sur oriental, puesto que países como Bielorrusia y Estonia presentan prevalencias del 0,5%, Bulgaria, Grecia, Italia y Ucrania continúan la cifra con datos entre 0,5 – 1%; Macedonia presenta la mayor cifra Europea con un 5-10% de prevalencia (Strakova, 2013, pp. 10 - 11).

En el Ecuador, no existen datos de prevalencia de TVT, ni tampoco censos de población canina, por lo que los datos generados en el cuestionario se basan en la experiencia y observación de los médicos veterinarios tratantes que respondieron las preguntas del mismo.

Perros de cualquier raza, sexo o edad son susceptibles a la enfermedad (Kimeto y Mugeru, 1974 citado por Das y Das, 2010, p. 547; Betamuzi, 1992,

pp. 13 - 17), sin embargo los tumores son más comunes en caninos que se encuentran en períodos de máxima actividad sexual (Bashford, Murray y Cramer, 1905, pp. 33 - 37; Higgins, 1966, pp. 67 -71; Pandey, Dhawedkar y Patel, 1977, pp. 852 - 853; Das y Das, 2000, p. 547).

Algunos investigadores han aseverado que las hembras son más susceptibles porque un solo macho infectado puede aparearse con varias, y éstas no son sexualmente activas de manera permanente (Ajello, 1980, pp. 289 – 339; Singh, Rana, Pangawkar y Gupta, 1996, pp. 71 - 81; Murchison, 2009, p. 24); sin embargo, otros autores demuestran que no existe una diferencia significativa entre ambos sexos (Strakova, 2013, p. 13).

Se ha reportado también que el tumor tiene como huéspedes específicos al perro y al zorro (Rust, 1949, pp. 10 -14), pero no se descarta que la presencia de TVT en otros miembros de la familia Canidae pueda haber sido ignorada (Das y Das, 2010, p. 547), tomando en cuenta que en un estudio de comparación de las características genómicas de 86 razas de perros y 8 de lobos con las características del TVT mostraron una notoria agrupación al último grupo, sugiriendo que el primer portador de la enfermedad fue un lobo (Murchison, 2009, p. 24). Hasta la fecha no se ha demostrado susceptibilidad racial al TVT (Karlson y Mann, 1952, pp. 1197-1213; Betamuzi, 1992, pp. 13 - 17; Das y Das, 2000, p. 547; Eze et al, 2007, p. 56). No se han reportado casos de transmisión a otras especies animales, inclusive luego de su inoculación experimental en animales inmuno deprimidos (Stubbs y Furth, 1934, p. 282).

Si bien antes se sospechaba que la prevalencia de la enfermedad estaba altamente relacionada con la ubicación geográfica de los caninos, siendo aquellos que se encontraban más cercanos al ecuador más susceptibles (Hayes, 1983 citado por Strakova, 2013, pp. 12 - 13), estudios actuales señalan que no existe ninguna correlación entre ambos factores (Strakova, 2013, pp. 12 - 13). El factor determinante en la actualidad es la cantidad de

animales callejeros o ferales presentes en la zona, cuanto mayor es la cantidad, mayor la prevalencia; y el estado inmunológico de los animales, mientras menor es el mismo, aumenta la prevalencia (Strakova, 2013, p. 13). Aunque la morbilidad del TVT se describe como elevada en las zonas que reúnen los factores predisponentes, las tasas de mortalidad del mismo son bastante bajas (O'Neill, 2011, p. 1909), la muerte de los animales es causada generalmente por agentes no relacionados al tumor.

2.1.4 Mecanismos de transmisión

El TVT se transmite fácilmente durante la cópula mediante la transferencia de células tumorales de un animal afectado a otro susceptible, sin embargo puede ser contagiado también por conductas sociales como olfateo de genitales, apareciendo tumores localizados, en su mayoría, en cavidad nasal (Ogilvie y Moore, 2008, p.669; Eze et al, 2007, p. 55; Merck, 2013), el riesgo de contagio aumenta cuando los perros permanecen en coito prolongado ocasionado por la expansión del pene dentro de la cavidad vaginal, puesto que cuando los animales tratan de liberarse surgen lesiones en la mucosa genital (Rust, 1949, pp. 10 -14; Cohen, 1985, pp. 317 – 321 ; Murchison, 2009, p. 25). Se han reportado casos de transmisión horizontal cuando un animal susceptible lame los genitales de un animal enfermo y después lame los suyos, o los de otro animal susceptible (Bloom, 1954, p. 275).

Hasta la actualidad no se han descrito con exactitud los mecanismos de transmisión vertical asociados al TVT debido a que existen pocos estudios publicados relacionados a hembras gestantes portadoras del tumor, algunos autores sugieren que la baja incidencia de TVT en perras gestantes puede ser porque el período de incubación de las células tumorales es ligeramente mayor al tiempo de gestación normal, o porque se sospecha que se generan abortos en las primeras etapas de preñez que pasan desapercibidos por los propietarios (Strakova, 2013, p. 24). Aunque se cree que el TVT es altamente contagioso para los cachorros que entran en contacto constante con las

secreciones de madres infectadas, la autora de este documento pudo observar el desarrollo y crecimiento normal de dos cachorras, una nacida de una madre portadora de TVT y otra adoptada por la misma, que no han presentado signos de la enfermedad hasta el día de la redacción de este texto.

Experimentalmente el TVT puede ser inoculado por diversos mecanismos, tales como: 1) trasplante mecánico de células viables, desde el tumor de un animal enfermo adquirido de manera natural, a la mucosa de otro susceptible (Nowinsky, 1876 y Sticker, 1906 citados por Das y Das, 2000, pp. 545 - 546; Karlson y Mann, 1952, pp.1197-1213), dando como resultado masas localizadas o regionales con características similares a las desarrolladas de manera natural, 2) por medio de la inoculación de preparados de células tumorales por vía subcutánea (Hill, Yang y Watchel, 1984, pp. 39 – 45 ; Yang, Chandler y Dunne-Anway, 1988, pp. 131 – 134; Cheng-Chi et al, 2007, pp. 479 - 491), generando masas subcutáneas no ulcerativas que ingresan en fase de regresión espontánea, y 3) por medio de la inoculación de preparados celulares tumorales por vía intravenosa (Stubbs y Furth, 1934, p. 279), ocasionando presentación generalizada de masas cutáneas y metástasis tumoral.

2.1.5 Patogenia e inmunología

Los mecanismos mediante los cuales las células tumorales pueden injertarse de manera efectiva en los animales susceptibles de forma natural, no se encuentran claramente determinados hasta la actualidad. Existen numerosos estudios realizados bajo determinadas condiciones controladas en las cuales se demuestran diversos efectos de las células de TVT, dependiendo la edad y estado inmunológico de los animales usados como experimento (Yang et al, 1988, pp. 131 – 134; Cheng-Chi et al, 2007, pp. 479 - 491).

En resumen se ha demostrado que luego del contagio de células de viables, por cualquiera de los mecanismos explicados anteriormente en este trabajo, el

tumor puede tomar dos caminos: 1) luego de un período de crecimiento, entrar en fase de regresión en individuos inmuno competentes y generar en ellos inmunidad posterior, ó 2) generar metástasis e incluso la muerte de individuos inmuno deprimidos, natural o experimentalmente, por ejemplo: animales sometidos a radiación previo contagio, cachorros y neonatos (Yang et al, 1988, p. 131), localizándose principalmente en linfonodos regionales y minoritariamente en bazo, riñón, pituitaria, linfonodos mesentéricos y peritoneo (Merck, 2013).

El comportamiento del TVT en animales contagiados bajo condiciones naturales varía en algunos aspectos con relación a los animales experimentales, siendo en el Ecuador fundamentalmente las condiciones de vida de los perros un factor muy importante, muchos animales no presentan regresión tumoral o se desconoce si este proceso tarda más tiempo que el descrito en la literatura porque no se puede realizar un seguimiento específico en la mayoría de la población portadora de este tipo de cáncer. Sin embargo, los estudios realizados hasta la actualidad enfocados en la respuesta de animales afectados al TVT pueden ser de utilidad y extrapolables a la realidad mundial. La acción del sistema inmunológico de los animales se ha agrupado en dos grandes mecanismos que se describen a continuación.

2.1.5.1 Mecanismos involucrados en la evasión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de los animales afectados

La principal característica de los Cánceres Clonales Transmisibles es su propiedad de “aloinjerto”, es de interés común entre los científicos dedicados a la investigación de este tema, el determinar cómo es posible que estas células, se injerten, superen las barreras de histocompatibilidad y desarrollen en animales no relacionados genéticamente e incluso entre individuos de diferentes especies (perros, lobos, zorros). En 1987 Yang, Chandler y Dunne-Anway, inocularon experimentalmente la región subescapular subcutánea de hembras y machos caninos con preparados celulares tomados de un tumor

adquirido de manera natural, no se describe el número de animales o las características que se tomaron en cuenta para la selección de estos caninos (Yang et al, 1988, p. 131).

Luego de una exhaustiva evaluación de las fases de crecimiento y regresión de los tumores desarrollados, esta investigación llegó a la conclusión de que las células del TVT no generan una respuesta por parte de los glóbulos blancos del animal susceptible porque carecen de antígenos específicos para MHC Clase II. Se demostró también que las células tumorales carecen de la expresión de beta2-microglobulina, proteína fundamental para la expresión de antígenos específicos para MHC Clase I en la superficie celular (Yang et al, 1988, p. 133).

2.1.5.2 Mecanismos involucrados en la escasa reacción leucocitaria de los animales afectados

Una de las principales formas de evasión de la respuesta inmune de los organismos por parte de células tumorales, es la afectación de células dendríticas (CD), aparentemente debido a la secreción de isoleucinas inmunosupresoras tumorales (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000, pp. 220). Este mecanismo ha sido reportado en varios cánceres presentes en roedores y seres humanos, pero no hay muchos datos relacionados a cánceres en otros mamíferos, lo que dio paso a la investigación realizada en el 2007 por Cheng-Chi et al.

Las CD son las células presentadoras de antígeno más efectivas en el inicio y mantenimiento de respuestas inmunológicas (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000, pp. 209-211; García, 1997, p. 88; Cheng-Chi et al, 2007, p. 479), capaces incluso de procesar antígenos tumorales y transformarlos en antígenos específicos del MHC Clase I y Clase II (Onishi et al, 2004, pp. 1093 - 1100; Tourkova et al, 2005, pp. 3045 - 3052), modular la activación de linfocitos natural killer (NK), así como también de producir un amplio rango de

citoquinas y quimoquinas reguladoras (Nimura et al, 2006, pp. 431 - 443; Ferlazzo et al, 2002, pp. 343 - 351), siendo cruciales para mantener la inmunidad antitumoral. Estudios realizados en 1994 determinaron que las CD son generadas a partir de monocitos CD14⁺ (Cella, Sallusto y Lanzavecchia, 1997, pp. 10 - 16). Algunos cánceres como el carcinoma renal humano afectan a esta clase de monocitos impidiendo la formación de CD. En los caninos las células dendríticas son producidas a partir de monocitos y médula ósea (Cheng-Chi et al, 2007, p. 480).

Los mecanismos de inoculación y preparación de animales experimentales en el estudio realizado por Cheng-Chi et al, fueron similares a los realizados veinte años atrás por Yang, Chandler y Dunne-Anway. Finalmente este estudio llegó a la conclusión de que efectivamente las células del TVT, afectan a los monocitos y a las CD mediante varios mecanismos: 1) suprimiendo una gran cantidad de expresiones moleculares de superficie en las CD, 2) generando apoptosis de CD y disminución de la cantidad de monocitos, relacionadas a la elevada secreción de TGF-beta1 por parte del TVT, 3) ocasionando alteraciones en la funcionalidad de CD por anomalías mieloides y 4) eliminando células B circulantes por medio de la secreción de una proteína soluble, que también causa la muerte de monocitos y CD (Cheng-Chi et al, 2007, pp. 487 - 489).

Como se ha indicado con anterioridad, ambos estudios demuestran que luego de la etapa de crecimiento, existe infiltración de linfocitos T en el tumor luego de la recuperación de CD, entrando en fase de regresión espontánea y desapareciendo en máximo 4 meses (Cheng-Chi et al, 2007, pp. 479 - 491) (Ogilvie y Moore, 2008, p.669).

2.1.6 Signos Clínicos

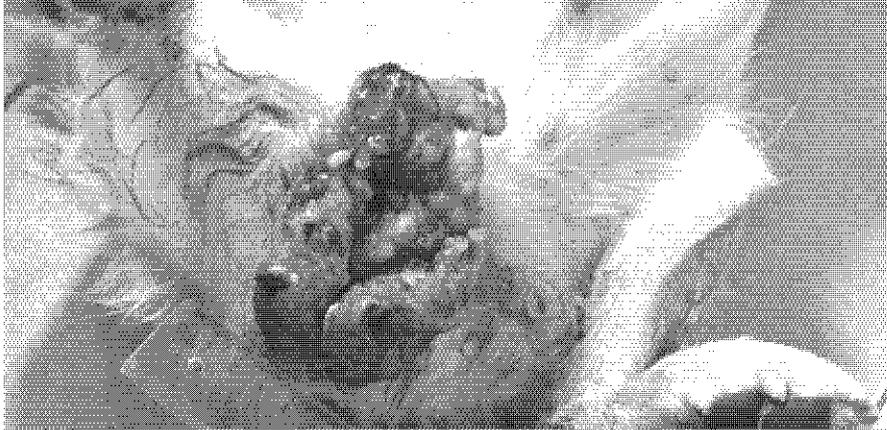


Figura 3.- Tumor Venéreo Transmisible, vulva, perra.

- a. La vulva presenta pérdida total de su arquitectura debido a una masa verrucosa proliferativa ulcerada y cubierta por restos celulares necróticos.

Las masas tumorales primarias se localizan en perros machos por lo general en la base del pene, con menos frecuencia desde la crura hasta el glande y ocasionalmente en el prepucio (Karlson y Mann, 1952, pp. 1197 - 1213). En las hembras, el TVT se localiza en la región posterior de la vagina, generalmente entre el vestíbulo y la vagina, a veces rodea el orificio uretral e incluso puede protruir desde la vulva (Moulton, 1990, pp. 498 - 502).

Generalmente los animales afectados no presentan signos claros en la etapa inicial de crecimiento del tumor, después las masas se presentan como pápulas hiperémicas tanto en machos como hembras, que posteriormente se muestran con una apariencia similar a una coliflor, pedunculada, nodular, papilar o multilobular; pueden encontrarse en un rango de tamaño desde nódulos pequeños de 5 mm de diámetro hasta masas de gran tamaño, mayores a los 10 cm de diámetro. Las masas son firmes pero friables cuya superficie se presenta por lo general ulcerada e inflamada (Brown, Calvert y MacEwen, 1980, pp. 983 - 986; Das y Das, 2000, p. 548; Eze et al, 2007, 57; Ogilvie y Moore, 2008, p. 669; Merck, 2013).

En la fase de crecimiento rápido del tumor, las masas se observan de color rojo brillante debido a su extensa vascularización, si existe una invasión profunda de la mucosa por parte del tumor, es muy común que se presente una infección bacteriana secundaria haciendo que existan descargas serosanguinolentas o hemorrágicas puras, que con el tiempo se muestran ulceradas con una apariencia necrótica (Das y Das, 2000, pp. 547 - 548; Ogilvie y Moore, 2008, p. 669). Si el tumor se localiza en la parte inicial de la uretra, o es demasiado grande, puede existir obstrucción del flujo de orina, y en hembras puede ocasionar distocias al momento del parto (Rust, 1949, pp. 10 - 14).

Aunque no muy frecuentemente, el TVT puede presentarse de manera extragenital, siendo la cavidad nasal uno de los sitios más comunes de infección secundaria, mientras el tumor crece genera lesión de la mucosa haciendo que el animal presente epistaxis, cuando las masas aumentan de tamaño se genera osteólisis y consecuentemente deformación facial (Pérez, Vergara, Ventura y Letelier, 1978, pp. 149 - 152; Rogers, Walker y Dillon, 1998, pp. 463 - 470; Levy et al, 2006, pp. 115 - 118). En boca y ojos se presenta como pápulas multilobulares, siendo muy parecido a las masas genitales cuando se halla en los labios y mucho más rojo y brillante si se encuentra en mucosa bucal y amígdalas (Boscós, Ververidis, Tondis, Stamou y Samartzi, 1998, pp. 167 - 170; Ogilvie y Moore, 2008, p. 669).

El TVT se describe como masas densas no encapsuladas, bien circunscritas y heterogéneas, cuando se localiza en la dermis, submucosa y tejido conectivo subcutáneo, bajo estas pápulas es frecuente encontrar tejido cicatricial, sugerente a lesiones producidas por mordeduras o rascado (Higgins, 1966, pp. 67 - 71), que son la vía principal de contagio de TVT en forma cutánea, también pueden hallarse ulceradas y sangrantes (Eze et al, 2007, pp. 55 - 56; Merck, 2013).

2.1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se debe iniciar con una exhaustiva anamnesis en la cual es necesario evaluar el entorno en el que se desarrolla el animal y los factores predisponentes a los que se encuentra expuesto (Das y Das, 2000, p. 550).

Generalmente, luego de una evaluación física, las características anatomopatológicas de las masas genitales son suficientes para confirmar la enfermedad si las particularidades ambientales corroboran el mismo. Sin embargo, es de vital importancia confirmar la sospecha diagnóstica mediante el uso de pruebas de laboratorio, la más utilizada es la citología, de fácil realización y que brinda un diagnóstico certero siempre y cuando se trate de masas genitales; los extendidos citológicos muestran al TVT como un tumor de células discretas (células redondas), cuyos núcleos contienen cromatina agregada, el citoplasma se presenta azul pálido o incoloro con varias vacuolas distintivas (Hernández-Jáurequi, González-Angulo y de la Vega, 1973, pp.1187-1196; Cockrill y Beasley, 1975, p. 667; Hill et al, 1984, pp. 39 – 45 ;Ogilvie y Moore, 2008, p. 669).

Puesto que los tumores de células redondeadas no solo abarcan al TVT, la citología puede no ser útil cuando se trata de masas extragenitales, sobre todo en aquellas producto de metástasis tumoral, o cuando la historia clínica del animal no es completamente clara. El diagnóstico definitivo puede darse por medio de biopsias de tejido sospechoso (Ogilvie y Moore, 2008, p.669). Si se desea realizar un análisis exhaustivo de las células sospechosas, pruebas como histoquímica y análisis con microscopio electrónico son capaces también de diagnosticar el TVT de manera efectiva (Das y Das, 2000, 550; Eze et al, 2007, pp. 59 - 60; Murchison, 2009, p. 24).

Los hallazgos radiológicos no son claros en el diagnóstico del TVT, pero en casos de presentación extragenital, como masas nasales, pueden brindar

signos clave para la sospecha del mismo junto con técnicas como la rinoscopía. Cuando la cavidad nasal se encuentra afectada se pueden presentar los siguientes signos radiográficos: 1) agrandamiento del proceso palatino, 2) desplazamiento del vómer, 3) densidad de tejido blando en la cavidad nasal con varias zonas radiolúcidas, 4) cuerpos extraños con densidad de metal en la cavidad nasal (Fallon y Swayne, 1984, pp. 415 - 418). Cabe recalcar que no son signos patognomónicos del TVT y se recomienda la confirmación del diagnóstico por medio de las técnicas antes descritas.

Otras pruebas de laboratorio como análisis completos de sangre, no presentan signos clave en el diagnóstico del TVT y varían en gran medida en relación al estado de salud del animal.

2.1.8 Diagnóstico diferencial

Cuando las masas no son notorias, sobre todo en etapas iniciales, el sangrado constante en hembras puede confundirse con estro o patologías como uretritis o cistitis. En los machos, las masas son aún más difíciles de notar a simple vista por la protección que brinda el prepucio, por lo que se puede sospechar de prostatitis, cuando el macho presenta incapacidad de protruir el pene debido a las masas que obstruyen su salida, se puede sospechar de fimosis, para fimosis o lesiones traumáticas del pene (Gordon et al, 1979 citado por Das y Das, 2000, p. 548) aunque el TVT puede ocasionar estas últimas patologías en machos crónicos (McLeod y Lewis, 1972, pp. 199 - 200). Cabe recalcar que el TVT predispone altamente a los animales a infecciones del tracto urinario, por lo que la realización de urocultivos puede mostrar gran variedad de colonias bacterianas, desviando al clínico del verdadero agente causal (Ogilvie y Moore, 2008, p.669). En animales de edad avanzada, se puede sospechar de otras neoplasias del tracto urogenital, como por ejemplo tumores uretrales o de la vejiga urinaria (Gordon et al, 1979 citado por Das y Das, 2000, p. 548). Al aumentar de tamaño las masas pueden confundirse con otros tumores del tracto reproductor, y en hembras callejeras o con historia

clínica desconocida, cuyo tumor ha protruido de la vulva, se puede sospechar de prolapso uterino.

La epistaxis ocasionada por TVT nasales, puede llevar a la sospecha de un amplio rango de diagnósticos que abarcan: lesiones traumáticas como golpes o atropellamientos, intoxicaciones por aceites naturales y rodenticidas, trastornos coagulativos como anemia hemolítica inmuno mediada, alteraciones en el factor de Von Willebrand o trombocitopenias, otra clase de tumores nasales, rinitis, infecciones fúngicas, pólipos nasales, masas metastásicas de diversas neoplasias como carcinomas renales, infecciones bacterianas como la bartonelosis y mycoplasmosis, entre otros (Bonagura, 2009, pp. 123, 153, 157, 175, 266, 277, 284, 292, 296, 352, 610, 613, 614, 615, 929, 949, 1243 y 1245). Las masas orales pueden confundirse con tumores bucales de otro origen, épuli (Bonagura, 2009, p. 318) y, en clínicos con poca experiencia en la enfermedad, incluso papilomas. El diagnóstico dermatológico del TVT, dependiendo el grado de lesión, localización y tipo de ulceración, puede sugerir patologías como: erupciones cutáneas ocasionadas por diversas clases de intoxicaciones, eritema multiforme o infestaciones parasitarias (Bonagura, 2009, pp. 561 y 1182). Las masas metastásicas, sobre todo las localizadas en ganglios linfáticos, pueden llevar a un diagnóstico erróneo de linfosarcoma si solo se basa en la observación de extendidos citológicos (Merck, 2013).

2.1.9 Tratamiento

Aunque el TVT presenta altas tasas de regresión espontánea en individuos inoculados experimentalmente (Yang et al, 1988, pp.131 - 134; Ogilvie y Moore, 2008, p. 669), mundialmente este fenómeno es escasamente descrito en condiciones naturales de infección (Murchison, 2009, pp. 25 - 26; Strakova, 2013, p. 1). Se han descrito varios métodos de tratamiento de acuerdo al grado de afectación y estado de salud del animal enfermo que se describen a continuación.

2.1.9.1 Cirugía

Existen numerosos estudios enfocados en el porcentaje de éxito de la escisión quirúrgica de masas tumorales pertenecientes a TVT, el primer punto a tomar en cuenta es que la remoción quirúrgica no es efectiva cuando el animal presenta metástasis o afectación sistémica, o cuando los tumores son demasiado grandes y ponen en riesgo la integridad del animal (Idowu, 1985, pp. 74 - 78). Si el clínico tratante desea realizar este procedimiento, debe efectuarse con electrobisturí o tratamiento crioquirúrgico con nitrógeno porque el corte mediante métodos convencionales pone en riesgo el trasplante de células viables a otras superficies corporales (Idowu, 1985, pp. 74 - 78). Un estudio realizado en 35 perros con TVT primario y metastático, demostró que 11 de los tumores escindidos, presentaron recurrencia dentro de los seis meses posteriores a la operación, por lo que esta modalidad no se considera como efectiva por sí sola, sino como complemento de otro tratamiento de elección. (Amber y Henderson, 1982, pp. 350 - 352; Ogilvie y Moore, 2008, pp. 669 – 670).

2.1.9.2 Terapia radiante

El TVT es sensible a la radioterapia, lográndose tasas de regresión tumoral del 100% luego de una sola dosis de 10 Gy (Osipov y Golubeva, 1976, pp. 97 - 98; Thrall, 1998, pp. 217 - 219; Ogilvie y Moore, 2008, p. 670), sin embargo este tratamiento requiere inmovilización química del animal (Boscos, 1988, pp. 10 - 15), no es efectivo si el tumor presenta metástasis (Thrall, 1998;Ogilvie y Moore, 2008, p. 670) y en algunos casos, no es económicamente accesible para el propietario, o el médico tratante no posee el equipamiento necesario para realizarla, por lo que no se la toma como tratamiento de elección.

2.1.9.3 Inmunoterapia

Inicialmente, antes de conocer los mecanismos específicos de afectación orgánica del TVT, varios investigadores usaron técnicas generales enfocadas en mejorar la respuesta inmune de los animales, mediante el uso de transfusiones de sangre entera y suero, pero los resultados fueron variables y no todos efectivos (Bergell y Sticker, 1907 citado por Das y Das, 2000, p. 551; Crile y Beebe, 1908, pp. 385 - 406; Prier y Johnson, 1964, pp. 1092 - 1094; Powers, 1968, pp. 1637 - 1645; Cohen, 1972, pp. 75 - 112). Otros clínicos han utilizado toxinas bacterianas para tratar la enfermedad demostrando efectos positivos y satisfactorios en las tasas de recuperación de los pacientes, incluyendo toxinas de *Chromobacterium prodigiosum* o en combinación con otros organismos (Carteaud, 1965, pp. 685 - 696; Bennet, Debelak-Fehir y Epstein, 1975, pp. 2942 - 2947), sin embargo son estudios aislados de tratamiento que no se han protocolizado y continúan en investigación hasta la actualidad.

2.1.9.4 Quimioterapia

Se ha medido la efectividad de diversos tratamientos medicamentosos a lo largo de los años, demostrándose que aquellos con carácter antimitótico son los más adecuados, incluso en animales con metástasis tumoral (Boscos, 1988, pp. 10 - 15). Dentro del grupo de quimioterapéuticos citotóxicos se han usado drogas como ciclofosfamida (Pandey, Chandpuria, Bhargava y Tiwari, 1989, pp. 510 - 513; Das, Das, Das y Das, 1991, pp. 249 - 252), metotrexato (Das et al, 1991, pp. 249 - 252), doxorubicina, vinblastina y vincristina (Calvert, Leifer y MacEwen, 1982, pp. 163 - 164), obteniendo resultados variados relacionados al estado de salud de los animales tratados y las dosis aplicadas.

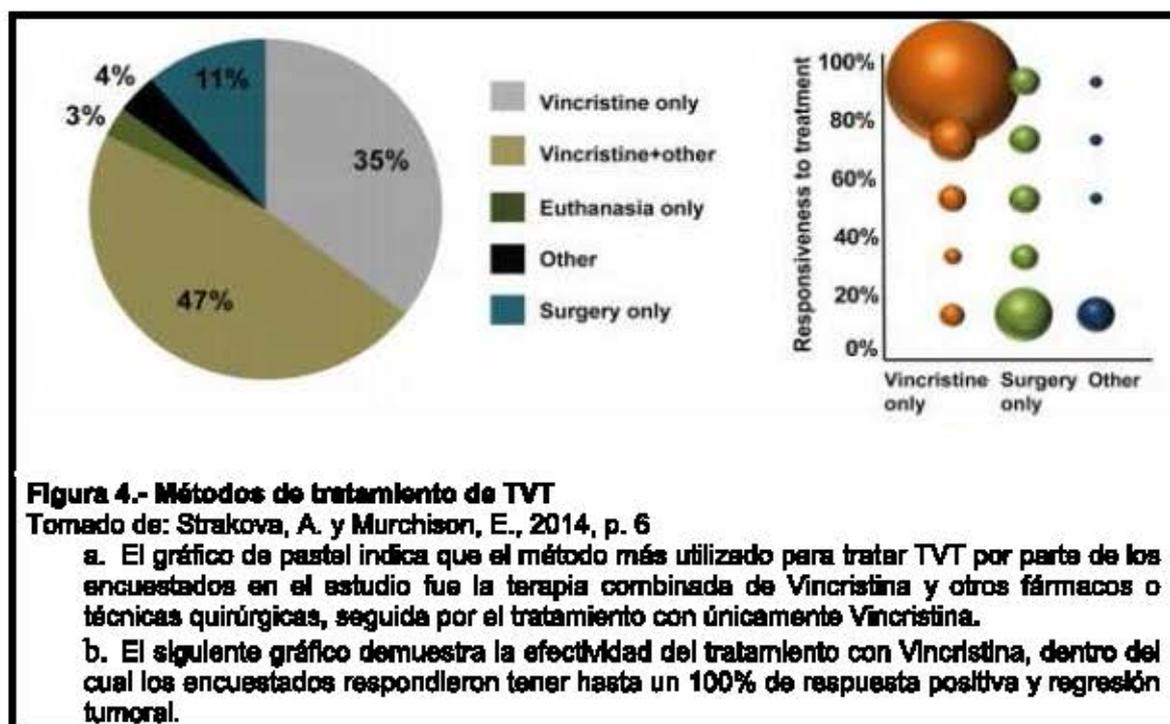
Algunos investigadores recurrieron al uso conjunto de agentes antineoplásicos en terapias combinadas, demostrando que el uso de ciclofosfamida, metotrexato y vincristina al mismo tiempo, era efectivo en el tratamiento del

TVT, sin recurrencia o efectos adversos, incluyendo remisión de tumores extragenitales (McAfee y McAfee, 1977, pp. 199 - 203; Brown, Calvert y MacEwen, 1980, pp. 983 - 986; Das et al, 1991, pp. 249 -252; Hoque, Pawde y Singh, 1995, p. 973 - 975).En 1977 y 1996, dos estudios señalaron que el uso de vinblastina intravenosa a dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal de manera semanal, lograba casi una completa recuperación de los pacientes luego de 4 o seis dosis (Wasecki y Mazur, 1977, pp. 142 - 143; Singh, Rana, Pangawkar y Gupta, 1996, pp. 71 - 81).Conforme se protocolizaron las terapias conjuntas, se demostró también la aparición de efectos no deseados en los pacientes caninos, tales como: anorexia, vómito y diarrea luego del uso de vinblastina (Wasecki y Mazur, 1977, pp. 142 - 143), mielosupresión (Theileny Madewell, 1987, pp. 183-196), sinergismo opuesto entre varios medicamentos (Bender y Hamel, 1991, p. 9 - 14), desarrollo de resistencia a drogas antineoplásicas causada por el metotrexato (Kamen y Winick, 1988, pp. 2713 - 2715) e inmunosupresión ocasionada también por el metotrexato (Horton, 1990, pp. 89 - 95).

En los años comprendidos entre 1980 y 2000, varios estudios llegaron a la conclusión de que el sulfato de vincristina solo, a dosis de 0,025 mg/kg semanales, era 100% efectivo en el tratamiento del TVT, tanto primario como metastásico (Calvert et al, 1982, pp. 163 - 164; Tuntinovich, 1983, pp. 104 - 121; Idowu, 1984, pp. 191 - 198; Das et al, 1991, pp. 249 - 252; Maiti, Roy, Ali y Ghosh, 1995, pp. 614 - 615; Singh et al, 1996, pp. 71 - 81), demostrándose que los efectos adversos, mencionados anteriormente, eran casi nulos.

Se pensaba entonces que este procedimiento evitaba también la generación de resistencia a la droga, por lo que se ha determinado a la terapia con vincristina como tratamiento de elección para el TVT a nivel mundial, aunque estudios recientes demuestran que varios animales han generado resistencia a la vincristina (Strakova, 2013, pp. 15 - 16), algunos autores recomiendan el cambio de agente antineoplásico si no existe respuesta después de la sexta administración de vincristina (Said, Silva, Albuquerque, Sousa-Neta y Lavinsky,

2009, pp.1-3), por lo que ha recomendado el uso de terapia radiante en masas primarias focalizadas o Adriamicina a dosis de 30 mg/m² cada tres semanas (Merck, 2013; Calvert et al, 1982, pp. 163 - 164).



2.1.10 Control y prevención

Hasta la actualidad no se han desarrollado vacunas o medicamentos que eviten la enfermedad o disminuyan las tasas de contagio. Puesto que se ha demostrado que la presencia de animales callejeros y ferales, es un gran factor determinante en la transmisión del TVT, se recomienda a los propietarios tener un elevado control de sus animales y evitar que éstos deambulen libremente.

La vigilancia reproductiva de animales es importante también en la prevención del TVT, cuya forma común de contagio es la genital. En animales no destinados a la reproducción, la esterilización y castración quirúrgica son métodos ideales de control, pues se disminuye el riesgo de contagio por monta y por actitudes sociales relacionadas a hormonas sexuales, como fugas, mordeduras, lamidos, etc. En criaderos de perros y centros de rescate,

hospedaje o lugares donde se favorezca el hacinamiento de caninos, es de vital importancia realizar evaluaciones físicas completas de los animales que se deseen ingresar, así como aprovechar al máximo períodos de cuarentena destinados a la evaluación de otras patologías infecto contagiosas para animales sospechosos de TVT (Head, 1967, pp. 251 – 275).

2.2 Eritropoyetina

En el campo de la oncología tanto humana como veterinaria, el uso de factores quimioterapéuticos genera también efectos adversos en el organismo de los pacientes tratados. Uno de los efectos más comunes es la aparición de anemia por mielosupresión o falla renal crónica iatrogénicas (Ogilvie y Moore, 2008, p.317). Con la finalidad de contrarrestar estos efectos y favorecer la recuperación del paciente, se emplean en la actualidad factores de crecimiento hematopoyéticos para reducir el número de transfusiones y estimular la eritropoyesis normal del organismo (Elmslie, Dow y Ogilvie, 1991, pp. 283 – 293; Yasuo et al, 2013, p. 481).

La Eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que se produce mayoritariamente en las células intersticiales peritubulares del riñón luego de la presencia de hipoxia. El hígado también puede aportar un 10 – 15% de su producción por parte de hepatocitos específicos y células Ito (Latimer, Mahaffey y Prasse, 2005, p.9; Acs et al, 2001, p. 3561).

Actúa mediante receptores específicos de Eritropoyetina (EPOR) y sus principales funciones incluyen: 1) inhibición de la apoptosis de células progenitoras y prorubricitos recién formados, permitiendo su diferenciación a eritrocitos maduros y, 2) estimulación de la síntesis de hemoglobina en las células eritrocitoides en división (Acs et al, 2001, p. 3561; Latimer, Mahaffey y Prasse, 2005, p.9). En la actualidad se ha demostrado la expresión de EPO y EPOR en tejidos no hematopoyéticos, sugiriendo un campo de acción más

amplio de esta proteína, incluyendo la regulación de crecimiento celular, sobrevivencia celular y angiogénesis (Acs et al, 2001, p. 3561).

2.2.1 Estudios realizados en pacientes oncológicos humanos y caninos

2.2.1.1 EPO como terapia selectiva en hipoxia tumoral

La hipoxia tumoral, ha sido una de las terapias de elección en el tratamiento del cáncer, sobre todo cuando se presentan masas sólidas, pues éstas tienden a ser más resistentes a terapias radiantes y químicas. El principio en el cual se basa esta terapia, es que la hipoxia estimula apoptosis celular, por lo tanto se desea reducir el número de células neoplásicas. Sin embargo, estudios han demostrado que la vascularización de tumores sólidos es frecuentemente reducida o abolida por diversas anomalías de los vasos tumorales, por la geometría de su difusión y/o microcirculación alterada, y gracias a diversos mecanismos involucrados, incluyendo modificaciones genéticas hipoxia-dependientes, la reducción de oxígeno en estas neoplasias aumenta su malignidad y porcentaje de metástasis (Kizaka-Kondoh, Inoue, Harada y Hiraoka, 2003, p. 1021).

Se pensaba que el uso de EPO en terapia combinada con agentes químicos y radiactivos podía resultar efectiva en terapias selectivas destinadas a la oxigenación de masas sólidas y disminución de tasas de mortalidad (Kizaka-Kondoh et al, 2003, p. 1024), pero otros autores han demostrado la presencia de EPO y EPOR en masas sólidas hipóxicas, sugiriendo una estrecha relación entre la presencia de esta glicoproteína y el aumento de la resistencia y supervivencia tumoral (Acs et al, 2001, p. 3563).

2.2.1.2 EPO como Factor de Crecimiento Eritropoyético

La EPO Recombinante Humana (rhEPO), es una droga de uso mundial, utilizada para tratar trastornos anémicos, renales y fatiga relacionados a

alteraciones oncológicas. Varios estudios han demostrado, sin embargo, que las tasas de mortalidad de pacientes tratados con EPO se elevaron, poniendo en duda la efectividad de esta proteína (Brower, 2003, p. 1).

Como se describió con anterioridad, la EPO actúa por medio de receptores específicos, perteneciendo a la familia de los receptores de citoquinas. Aunque los EPOR no presentan una actividad intrínseca como quinasa, tienen la capacidad de unir y activar tirosina-quinasa intracelulares, permitiendo que se liberen señales mitogénicas (Acs et al, 2001, p. 3561). Se creía que las únicas células que presentaban EPOR eran los eritrocitos (Latimer et al, 2005, p. 9), pero en la actualidad se conoce que células cancerígenas provenientes de tejido renal, cerebral, glándulas mamarias y tracto genital femenino son capaces de expresar EPO y EPOR (Acs et al, 2001, p. 3561).

Para demostrar la directa relación de la EPO con la tasa de malignidad neoplásica, se realizaron estudios en cáncer de mama humano, dentro de los cuales se determinó que las masas sólidas tumorales expresaban EPOR, en contraste con tejido mamario sano, dentro del cual ninguna célula presentaba estos receptores, sugiriéndose por tanto que solo células con mutaciones cancerígenas adquirirían la capacidad de expresarlos (Acs et al, 2001, p. 3563). El problema ocasionado por la aparición de estos receptores se relaciona directamente a las funciones que cumple la EPO en condiciones normales. Ya explicado en párrafos anteriores, esta glicoproteína es fundamental para la mantención de oxigenación tisular en condiciones de hipoxia; por lo tanto se ha demostrado que masas sólidas tumorales hipóxicas presentan alteraciones en el gen HIF-1, y éste a su vez estimula la presentación del gen de activación de EPO; con una disminución de oxígeno, la EPO genera en los tumores adaptación a la isquemia y angiogénesis, por medio de la estimulación del aumento del factor de crecimiento endotelial (Acs et al, 2001, pp. 3563 – 3564; Sytkowski, 2007, p. 1).

Otra función de la EPO, es evitar la apoptosis de células progenitoras hematopoyéticas, por lo tanto, reduce también las tasas de apoptosis celular en células cancerígenas con EPOR, aumentando el grado de supervivencia tumoral; hipótesis confirmada en el estudio de cáncer de mama, donde se observaron escasos núcleos apoptóticos en las muestras tumorales evaluadas (Acs et al, 2001, pp. 3563 – 3564).

Se sospecha entonces, que el aumento de mortalidad en pacientes tratados con rhEPO se debe al crecimiento de masas tumorales existentes y metástasis de las mismas (Acs et al, 2001, p. 3564). Un estudio reciente demostró, sin embargo, que el uso de otros factores de crecimiento eritropoyético como la epoyetina beta y darbepoyetina alfa, en sustitución de rhEPO, podía mejorar los trastornos anémicos de los pacientes con cáncer y disminuir los porcentajes de transfusiones sanguíneas, sin la presentación de los efectos colaterales descritos con anterioridad relacionados a la EPO, siempre y cuando se realice una exhaustiva evaluación de los pacientes para poder determinar si este presenta EPOR fuera del tejido hematopoyético (Yasuo et al, 2013, p. 484).

2.2.1.3 Uso de rhEPO en pacientes caninos

Los efectos de las terapias antineoplásicas en perros son muy similares a los descritos en seres humanos, por lo tanto el uso de factores de crecimiento hematopoyético son comunes en la clínica de especies menores. El uso de eritropoyetina recombinante canina (rcEPO), sin embargo, no es muy difundido puesto que no se encuentra ampliamente disponible a nivel mundial (Ogilvie y Moore, 2008, p. 318).

En 2004, Randolph y sus colegas probaron los efectos del uso de rhEPO en caninos y su nivel de seguridad, si bien el estudio no tomó en cuenta animales con cáncer y se basó en insuficientes renales, los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a las terapias oncológicas. Se evaluó entonces el rango de

efectividad de la rhEPO en 19 animales con insuficiencia renal crónica y anemia grave a consecuencia de la misma, demostrando buenos resultados. Aunque la rcEPO estimulaba la eritropoyesis sin mayores inconvenientes, la rhEPO podía ocasionar en algunos pacientes hipoplasia eritroide y desarrollo de anticuerpos; si bien los efectos no siempre eran los deseados, no se descarta el uso de rhEPO en perros cuando no se puede adquirir la versión canina de la misma, puesto que a pesar de las patologías que ocasiona, es capaz de mejorar el estado de salud del paciente (Randolph, Stokol, Scarlett y MacLeod, 2004, pp. 81 - 91).

No se ha reportado con exactitud, una directa relación entre la presencia de EPO/EPOR y tasas de mortalidad en pacientes caninos con cáncer, por lo que se recomienda profundizar el estudio del mismo en clínicas, hospitales y escuelas de Medicina Veterinaria a nivel mundial.

Capítulo III: Materiales y Métodos

3.1 Ubicación geográfica

En el Ecuador no existe un censo oficial de la población canina a nivel nacional ni provincial, tampoco se registra información de la prevalencia de TVT. El área de estudio fue escogida después de un análisis previo de casos identificados como sospechosos de TVT por parte de la autora de esta investigación.

El estudio se desarrolló en dos provincias del Ecuador. La primera provincia fue Imbabura, localizada en la región sierra norte del país, en las coordenadas 00° 07 y 00° 52 latitud norte; 77° 48' y 79° 12' longitud oeste (IGM, 2013), con una población total de 398244 habitantes (INEC, 2010), direccionando la toma de muestras a los cantones Antonio Ante, Otavalo, Cotacachi y Urcuquí. La segunda provincia fue Pichincha, localizada en la región sierra norte del Ecuador dentro de las coordenadas 0°15'00"S 78°35'00"O (IGM, 2013), con una población total de 2576287 habitantes (INEC, 2010) enfocando el estudio al cantón San Miguel de los Bancos.

3.1.1 Provincia de Imbabura

El cantón Antonio Ante está ubicado al noroeste de la provincia de Imbabura, 9 km al sur de la ciudad de Ibarra dentro de las coordenadas 0°19'12"N 78°12'36"O; posee una extensión de 79.26 km², que corresponde al 4% del total de la Provincia (IEE, 2013); los caninos muestreados se localizaron en las parroquias Andrade Marín y Chaltura, ubicadas a 2360 m.s.n.m., presentando una temperatura promedio de 18°C (IGM, 2013). El cantón Otavalo se localiza en la provincia de Imbabura, dentro de las coordenadas latitud N0°10'N0°20' y longitud W78°30', posee una extensión de 513,6 Km² (IGM, 2013); las parroquias escogidas en este cantón como centro de muestreo fueron Ilumán y San Luis de Otavalo, localizadas a 2550 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 14°C (IGM, 2013). El cantón Cotacachi perteneciente a Imbabura,

se ubica en las coordenadas $0^{\circ}18'00''N$ $78^{\circ}16'00''O$ con una extensión de 1809 Km^2 , siendo la más grande de la provincia (IGM, 2013); se muestrearon animales pertenecientes a la parroquias Quiroga y San Francisco, localizadas a 2450 m.s.n.m. con temperaturas que oscilan entre los 12 y $15^{\circ}C$ (Gobierno Municipal de Cotacachi, 2009). Urcuquí es un cantón de la provincia de Imbabura localizado en las coordenadas $0^{\circ}25'13''N$ $78^{\circ}11'50''O$ con una extensión de 767 Km^2 (GAD Municipal de San Miguel de Urcuquí, 2014), se evaluaron animales pertenecientes a la parroquia San Miguel de Urcuquí, localizada a 2307 m.s.n.m con una temperatura promedio de 14 a $19^{\circ}C$ (GAD Municipal de San Miguel de Urcuquí, 2014).

3.1.2 Provincia de Pichincha

La parroquia de Mindo, perteneciente al cantón San Miguel de Los Bancos fue centro de muestreo en la provincia de Pichincha, se encuentra localizada a 1250 m.s.n.m. con una temperatura promedio de $20^{\circ}C$. Está ubicada 80 Km al noroeste de la capital del país, en las coordenadas $0^{\circ}03'04.29''S$ $78^{\circ}46'41.89''W$ (IGM, 2013).

3.2 Diseño del estudio

El estudio es de corte transversal, en el cual se evaluaron los niveles séricos de EPO circulante en caninos portadores de TVT mediante la técnica de RIA, además se compararon los parámetros hematológicos obtenidos mediante hemogramas en caninos portadores de TVT y se los relacionó con aquellos obtenidos en caninos control, así como también se determinó la posible asociación entre los valores obtenidos en hemograma con los niveles séricos de EPO en animales enfermos y control. Para alcanzar estos objetivos, se evaluaron clínicamente un total de 589 caninos, determinándose como "unidad experimental" al grupo de animales que compartieron características en común de interés para el estudio, clasificándose en 3 grupos.

Siendo factores determinantes: la falta de datos asociados a población canina y prevalencia de TVT en el país, se estableció que todo animal que resulte positivo a TVT al examen clínico efectuado durante la Jornada de Esterilización masiva organizada por la Fundación Protección Animal Ecuador PAE– Capítulo Ibarra, durante los días 31 de julio del 2014 al 21 de agosto del mismo año, ingresará a formar parte del grupo de caninos “Positivos a examen clínico”, asegurándose de que la altura sobre el nivel del mar de los sitios a muestrear no presente variantes significativas que pudiesen interferir en los resultados de la investigación.

3.2.1 Grupo 1: “Positivos al examen clínico”

Conformado por 11 caninos diagnosticados como clínicamente positivos a TVT durante las Jornadas de Esterilización. Los animales fueron categorizados dentro de la unidad experimental luego de presentar signos clínicos similares a los descritos en el Capítulo 2 para casos de animales con TVT genital.

3.2.2 Grupo 2: “Control Imbabura”

Conformado por 31 caninos clínicamente sanos que compartieron características similares como: tamaño, sexo, edad, raza, entre otras, a los caninos del grupo 1 “Positivos al examen clínico” (Martínez, 2014, entrevista personal a Elizabeth Murchison Ph.D). Este grupo control se encuentra dividido en tres, con la finalidad de abarcar una extensión geográfica similar a la ubicación de los animales enfermos. El lugar de muestreo y número de animales dentro de esta unidad experimental se relacionó con las facilidades logísticas y estado de salud de los animales de la zona. Se muestrearon: 13 caninos provenientes de la parroquia Illumán, cantón Otavalo, 8 caninos provenientes de la parroquia San Luis de Otavalo, cantón Otavalo; y 10 caninos provenientes de la parroquia San Francisco, cantón Cotacachi.

3.2.3 Grupo 3: “Control Pichincha”

Conformado por 14 caninos clínicamente sanos con características similares a los caninos abarcados en el Grupo 2, localizados geográficamente en una zona con menor altitud sobre el nivel del mar, ~1000 m.s.n.m., en relación a los animales de las dos primeras unidades experimentales. El número de animales muestreados se encuentra directamente relacionado a la disponibilidad logística y estado de salud de los animales de la zona.

Tabla 1.- Distribución geográfica y por género de los caninos evaluados y los caninos seleccionados como control (Grupos 2 y 3).

Provincia	Cantón	Caninos Hembra Evaluados	Caninos Macho Evaluados	Caninos Hembra Control	Caninos Macho Control
Imbabura	Antonio Ante	172	22	0	0
	Otavalo	154	18	26	5
	Cotacachi	141	19	6	4
	Urcuquí	28	5	0	0
Pichincha	San Miguel de los Bancos	25	5	9	5
Total		520	69	41	14

3.3 Materiales

3.3.1 Materiales de Campo

- 100 jeringas 10 ml Fortune Medical®
- 1 caja de agujas hipodérmicas 20G NIPRO®
- 1 caja de guantes de examinación, talla S SuperCare®
- 1 caja de mascarillas descartables SUMBOW®

- 100 gasas estériles HERENCO®
- 1 rasuradora portátil WAHL®
- 1 tijera curva aguda-roma
- 250 ml alcohol
- 250 ml savlón
- 100 ml formol al 10%
- 1 tijera curva aguda-roma
- 50 hojas de bisturí #10 ETROS®
- 1 pinza anatómica diente de ratón
- 1 fonendoscopio LANE®
- 1 termómetro digital Hansaplast®
- 1 marcador multiuso Sharpie®
- 1 cuaderno pequeño espiral Norma®
- 1 esfero Bic®
- 1 cooler mediano Rubbermaid®
- Hielo químico
- Filipina
- Mandil

3.3.2 Materiales de Laboratorio

- 332 cryotubos de 2 ml Thermo Fischer Scientific®
- 100 tubos sin anticoagulante tapa roja 10 ml Vacutainer®
- 150 tubos con anticoagulante EDTA pediátricos, 1 ml MiniCollect®
- 100 pipetas Pasteur®
- 100 hisopos mango largo Caricia®
- 200 portaobjetos MedicLife®
- 200 cubreobjetos KnittelGlass®
- 11 recipientes para histopatología Cellstor®
- 1 centrífuga Clay Adams, Becton Dickinson & Co®.
- Tinción Diff-Quick®

- Resina sintética para extendidos celulares
- Roxicaína al 2% en Spray
- Contador Hematológico BC3200 Mindray®
- 42 microcapilares con anticoagulante
- 1 masilla selladora de microcapilares Bra-Seal®
- 1 microcentrífuga TG12M, Madell Technology Corporation®
- 1 tabla de lectura para microhematocrito
- 1 Recombigen EPO kit®
 - EPO Yodada (I¹²⁵)
 - Antisuero de conejo antieritropoyetina (Epoietina Alfa)
 - Antisuero de cabra anti IgG de conejo.
 - EPO estándar A (0 mIU/mL)
 - EPO estándar B (5 mIU/mL)
 - EPO estándar C (10 mIU/mL)
 - EPO estándar D (25 mIU/mL)
 - EPO estándar E (50 mIU/mL)
 - EPO estándar F (100 mIU/ mL)
 - EPO estándar G (200 mIU/mL)
 - EPO Control #1
 - EPO Control #2
- 1 micropipeta Eppendorf® de 1000 ul serie J21532C
- 1 pipeta Eppendorf Multipette®
- 50 tubos para inmuno ensayo (12 x 75 mm)
- 1 mezclador Vortex VWR®, VX-2500
- 1 incubadora Grant® W38
- 1 gamma contador RIASTAR N01, Packard®
- 1 centrífuga refrigerante (2000 xg) MISTRAL 3000, Meadowrose®
- Agua purificada
- Gradillas para tubos de diferentes tamaños
- Cronómetro Dual®.

3.4 Métodos

3.4.1 Examen clínico

Previa toma de muestras, se evaluaron clínicamente 559 caninos en la provincia de Imbabura. La inspección se dividió en dos partes y se llevó a cabo durante las jornadas de esterilización.

La primera parte fue realizada antes de la cirugía de esterilización tomando en cuenta el siguiente protocolo (Anexo 1):

- **Anamnesis:** En el momento de la inscripción del animal y toma de datos del propietario, se evaluaron aspectos relacionados a:
 - Estado de salud general del animal: vacunaciones, desparasitaciones, enfermedades previas.
 - Estado reproductivo: período estral, número de camadas, último celo/parto, duración de celo, entre otras.
 - El entorno en el cual se desenvuelve: lugar donde vive, animales con los cuales convive.
 - Factores que pudiesen predisponer al canino a contraer la enfermedad: animales sueltos en la zona, presencia de animales con lesiones sospechosas en el lugar.
 - Signos de alerta que el propietario pudo haber notado en el estado físico de su mascota: sangrado excesivo genital, masas de carácter desconocido, secreciones genitales anormales, entre otras.

Cualquier factor considerado de interés para la autora de la investigación fue escrito dentro del área de observaciones en la hoja de registro del animal para posteriormente ser tomado en cuenta por parte del personal involucrado (Anexo 1).

- Examen físico: Una vez registrado el animal, se evaluó su estado físico considerando condición corporal, porcentaje de deshidratación, valoración óculo-nasal, de membranas mucosas bucales, genitales y rectales, chequeo dermatológico en búsqueda de lesiones sospechosas y condición de nódulos linfáticos. Animales con signos clínicos sugerentes a TVT fueron separados del grupo antes de ser operados.

La segunda parte de la inspección fue realizada en el área de recuperación postoperatoria, estableciendo nuevamente un intenso examen físico, para confirmar o descartar el diagnóstico establecido antes de la cirugía (Anexo 1). Posterior a las Jornadas de Esterilización, se evaluaron 30 caninos en la provincia de Pichincha siguiendo el mismo protocolo de anamnesis y examen físico descritos anteriormente con la finalidad de descartar en ellos la presencia de cualquier patología clínicamente diagnosticable y clasificarlos dentro del Grupo 3 "Control Pichincha".

3.4.2 Categorización de caninos

Todo canino con signos clínicos sugerentes a TVT genital fue separado del grupo de animales a esterilizar antes de la realización de la cirugía. Se ejecutó nuevamente una intensa evaluación física del animal, tomando en cuenta estado de mucosas y calidad de las masas genitales que presentaba (Anexo 1). Las masas tumorales sospechosas fueron clasificadas como sugerentes a TVT luego de presentar características concordantes con la descripción físico-clínica de la patología en el Capítulo 2, confirmando la sospecha con la anamnesis realizada previamente en búsqueda de factores altamente predisponentes relacionados a: sector donde se desenvuelve el animal y estado reproductivo del mismo; el procedimiento se fundamentó en la recomendación realizada por Goldschmidt y Hendrick, dentro del cual se establece que todo tumor de localización genital con características típicas de TVT, es diagnosticado como tal hasta que se demuestre lo contrario por medio

de técnicas de laboratorio específicas que incluyen tinciones especiales, microscopía electrónica o inmunohistoquímica (Meuten, 2002, p.115).

Los caninos establecidos como parte de la unidad experimental “Grupo 2: Control Imbabura” fueron escogidos en relación a las facilidades logísticas presentadas durante las jornadas de esterilización. Aquellos animales que no presentaron signos de alerta de ninguna patología durante la inspección inicial fueron evaluados nuevamente, y tomando en cuenta los mismos factores analizados en los animales sospechosos, fueron diagnosticados como libres de TVT. Los caninos clasificados dentro de la unidad experimental “Grupo 3: Control Pichincha” fueron seleccionados después de no presentar signos clínicos sugerentes a ninguna patología luego del examen físico, añadiéndose al mismo la evaluación de presencia de garrapatas que pudieran predisponer al canino a patologías hemoparasitarias.

3.4.3 Toma de muestras

Antes de la toma de muestras, se recolectó información de cada animal, para lo cual se elaboró un registro de los caninos del estudio, tanto enfermos como control, en el cual se describieron los siguientes aspectos: código del animal, nombre del canino, fecha de toma de datos, peso, condición corporal, raza, sexo, edad, estado reproductivo, propietario, temperatura rectal, estado de mucosas, frecuencia cardíaca, ritmo cardíaco, frecuencia respiratoria, ritmo respiratorio, estado de nódulos linfáticos, evaluación óculo-nasal y dermatológica, y evaluación de reflejos tusígeno y deglutorio (Anexo 3 y Anexo 5).

Se extrajeron 7 ml de sangre venosa yugular de todos los caninos, tanto sospechosos a TVT como control Pichincha e Imbabura, con una jeringa de 10 ml y una aguja 20G. 6 ml fueron colocados en un tubo sin anticoagulante tapa roja y 1 ml fue colocado en un tubo pediátrico con anticoagulante EDTA tapa morada (Anexo 2).

El protocolo de sujeción de animales y extracción de sangre fue basado en la técnica especificada en el “Manual para Auxiliares Técnicos Veterinarios” de la Asociación Británica de Veterinarios de Pequeños Animales (BSAVA) que se describe a continuación:

Sujeción para venopunción yugular (Moore y Simpson, 2003, p. 160)

- El ayudante se coloca a la izquierda del paciente.
- Mantener al animal sentado en el borde de la mesa para acceder bien a la vena.
- El brazo derecho del ayudante se pasa por encima del dorso del paciente y alrededor de las extremidades delanteras para controlarlas.
- El brazo izquierdo se usa para controlar y sujetar la cabeza.
- Rasurar y preparar asépticamente una zona sobre la vena.
Aplicar presión en la vena con el pulgar, tensando el exceso de piel con los dedos de la misma mano.
- Obtener la muestra con una aguja y jeringa estériles.
- Liberar la oclusión de la vena antes de retirar la aguja de la misma.
- Ejercer presión inmediata con el pulgar sobre el punto de presión.
- Nota: puede existir una variante con el animal recostado de forma lateral, en la cual se extienden los cuatro miembros del canino hacia caudal y la cabeza se dirige cranealmente para facilitar la observación de la vena.

Luego de la toma de muestras sanguíneas se realizaron otros procedimientos de toma de datos y muestreo en los Grupos 1 y 2, que se describen a continuación:

3.4.3.1 Otros procedimientos de toma de muestras realizados

Grupo 1

Se posicionó al animal en decúbito dorsal para favorecer la evaluación tumoral. A parte del registro creado con anterioridad, se añadieron a un nuevo registro datos relacionados a la masa genital comprendiendo: alto, ancho y profundidad del tumor, localización exacta de la neoplasia, presencia de masas secundarias, presencia de secreciones y otras observaciones (Anexo 2). Con un portaobjeto previamente etiquetado se procedió a realizar una impronta tumoral y con un hisopo mango largo se realizaron dos frotis genitales con la finalidad de confirmar la sospecha de TVT citológicamente (Anexo 2). Raskin y Meyer, describen la técnica de frotis genital como efectiva en el diagnóstico de esta enfermedad (Raskin y Meyer, 2010, p. 293). Posteriormente se procedió a tomar una biopsia de la masa sospechosa luego de la aplicación de Roxicaína en Spray en la mucosa tumoral. Las biopsias fueron almacenadas en un cryotubo con 2ml de formol al 10% a temperatura ambiente.

Grupo 2

Con un hisopo mango largo se procedieron a realizar tres frotis genitales en portaobjetos previamente etiquetados para confirmar citológicamente la ausencia de células tumorales características de TVT.

3.4.4 Procesamiento de muestras

3.4.4.1 Obtención de suero y alícuotas

El primer procedimiento realizado fue la extracción de muestras de sangre y la obtención de sueros sanguíneos y alícuotas de las muestras pertenecientes a los Grupos 1 y 2, siendo escogido como lugar de ejecución el "Laboratorio Clínico Pasteur", localizado en la parroquia Atuntaqui, cantón Antonio Ante,

provincia Imbabura. Las muestras de sangre tomadas en tubos sin anticoagulante durante las jornadas de esterilización, fueron almacenadas en un contenedor sin hielo, dejándolas reposar sin movimiento hasta la formación de un coágulo sanguíneo y posteriormente transportadas para su procesamiento. Los tubos fueron centrifugados durante 7 minutos, y el suero resultante fue extraído con una pipeta Pasteur y alicuotado en un cryotubo de 2 ml, para ser almacenado luego a -20°C en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Animal perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

Las muestras obtenidas del Grupo 3 fueron almacenadas en un recipiente sin hielo, siguiéndose el mismo método de reposo que el descrito en el párrafo anterior y procesadas en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizándose el protocolo explicado con anterioridad, incluyendo criterios de almacenamiento y congelación.

3.4.4.2 Hemograma

El segundo procedimiento fue la realización de hemogramas a las muestras tomadas de los Grupos 1 y 2. Se seleccionaron como lugares de ejecución los laboratorios: "Clínico del Valle" localizado en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, y "Clínico Automatizado" localizado en la parroquia Atuntaqui, cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura. Una vez analizada la metodología de ambos laboratorios, se determinó que utilizaban los mismos procedimientos de procesamiento sanguíneo y por lo tanto la distribución de muestras a cada uno se basó en las facilidades logísticas que se presentaron durante los días de muestreo. Para evitar alteraciones en los resultados obtenidos en el hemograma relacionadas al conteo de células blancas, se realizó una confirmación de los datos mediante conteo manual en frotis sanguíneo.

El protocolo de procesamiento de hemogramas que se realizó en la investigación se detalla a continuación:

- Inmediatamente después de la extracción de sangre y colocación de la misma en el tubo con EDTA, se procedió a homogeneizar la muestra mediante movimientos suaves durante 20 segundos antes de colocarla en el cooler con hielo químico para su traslado al laboratorio.
- En el laboratorio se volvieron a homogeneizar las muestras lentamente y en repetidas ocasiones, comprobando la ausencia de coágulos sanguíneos que pudiesen interferir con los resultados obtenidos.
- Una vez homogeneizada la muestra, se procedió a realizar un frotis sanguíneo y a teñirlo con la técnica Wright – Giemsa.
- Se procesó el resto de la muestra en el contador hematológico BC3200 Mindray®
- Para confirmar el conteo de glóbulos blancos se realizó la diferenciación de los mismos mediante técnica manual siguiendo las recomendaciones de la Doctora Joy Archer, directora de laboratorio del Hospital Veterinario de la Universidad de Cambridge.

3.4.4.3 Hematocrito

Los tubos con muestras sanguíneas obtenidos del Grupo 3 fueron almacenados en un cooler con hielo químico y procesados en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Para la obtención de valores de hematocrito se tomó como referencia el protocolo descrito en el libro “Pruebas de Laboratorio y Procedimientos de Diagnóstico” que se detalla a continuación:

- Colocar el extremo abierto de un tubo microcapilar en una muestra de sangre bien mezclada con EDTA y permita que la acción capilar llene el

tubo. Si se sostiene el tubo en forma horizontal o se coloca ligeramente hacia abajo, se facilitará el llenado.

- Llenar aproximadamente dos tercios a tres cuartos del tubo y sellar uno de los extremos con masilla impermeabilizadora, presionando el tubo contra el sellador.
- Colocar el tubo dentro de la centrífuga microcapilar, con la arcilla hacia afuera y centrifúguelo a alta velocidad (10000 rpm) durante 5 minutos.
- Utilice un dispositivo de lectura de tubos para medir el hematocrito (Vaden, Knoll, Smith y Tilley, 2011, p. 338) (Anexo 3).

3.4.4.4 Frotis e Improntas genitales

Las placas con extendidos celulares se secaron a temperatura ambiente con movimientos de abanico inmediatamente después de su preparación, una vez comprobada su integridad y ausencia de humedad se almacenaron una sobre otra en una caja destinada al propósito hasta su respectiva tinción y lectura. Las citologías fueron procesadas en las instalaciones de la Clínica Veterinaria Universidad de las Américas, localizada en la parroquia Quito, cantón Quito, provincia Pichincha, bajo la supervisión del Dr. Julio Ortiz, docente de anatomía patológica veterinaria.

Las placas genitales se tiñeron mediante la técnica Diff-Quick®, descrita en el libro "Medicina Laboratorial Veterinaria, Interpretación y Diagnóstico" detallada a continuación (Anexo 3):

- Colocar la muestra en la "solución fijadora" durante 60 – 120 segundos.
- Retirar el exceso de líquido y colocar el portaobjetos en la "solución 1" (color rojo) durante 30 – 60 segundos.
- Retirar nuevamente el exceso de colorante con papel absorbente y colocar la muestra en la "solución 2" (color azul) durante 5 – 60 segundos, no exceder los 60 segundos con esta última solución.
- Lavar el exceso de colorante con un ligero chorro de agua.

- Secar al aire y examinar (Meyer y Harvey, 2007, p. 369).

Luego de haber comprobado que las placas teñidas se encontraban completamente secas y con la finalidad de preservar su integridad, se procedió a montar placas cubreobjetos sobre los extendidos citológicos, posterior aplicación de resina sintética en los mismos, dejándolos secar por 24 horas y finalmente almacenándolos en una caja destinada al propósito.

3.4.4.5 Histopatología

Las muestras tumorales almacenadas en formol al 10% fueron transportadas a temperatura ambiente hacia las instalaciones del Laboratorio perteneciente al Proyecto CTVT de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, Reino Unido. En el laboratorio, las muestras fueron transferidas a nuevos contenedores con formol al 10%, se realizaron cortes histológicos y tinción Hematoxilina / Eosina, dentro de las instalaciones del Laboratorio de Patología animal de la misma (Anexo 3).

La técnica de corte y tinción de los tejidos se basó en la descrita en el libro "Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular" resumida a continuación:

- Fijar el tejido mediante el uso de formalina al 37%
- Lavar y deshidratar el tejido mediante el uso de soluciones alcohólicas de concentración creciente hasta alcanzar alcohol al 100%.
- Aclarar la muestra mediante el uso de xileno o tolueno.
- Incluir la muestra en parafina fundida, una vez fría y endurecida, formar un bloque de tamaño adecuado.
- Colocar el bloque en un micrótopo para la realización de cortes específicos.
- Montar los cortes obtenidos en portaobjetos a los que previamente se añadió albúmina.

- Disolver la parafina de la placa con xileno o tolueno
- Hidratar la muestra con soluciones alcohólicas decrecientes.
- Teñir la placa con hematoxilina en agua.
- Deshidratar nuevamente la placa con soluciones alcohólicas crecientes.
- Teñir la placa con eosina en alcohol.
- Luego de la tinción pasar nuevamente la placa en xileno o tolueno, colocarla en un medio de montaje no acuoso.
- Colocar placa cubreobjetos sobre la muestra para lograr un preparado permanente (Ross y Pawlina, 2006, p. 2-3).

3.4.4.6 Radio Inmuno Ensayo (RIA)

Las muestras de suero obtenidas de los Grupos 1 y 2, almacenadas a -20°C en las Instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas fueron empaquetadas y transportadas a 4°C hacia las instalaciones del laboratorio perteneciente al Proyecto "CTVT" de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Cambridge, Reino Unido.

En el laboratorio, bajo la supervisión de la Dra. Elizabeth Murchison Ph.D., se crearon nuevas alícuotas de todos los sueros sanguíneos, 1 tubo de 500 ul y 10 tubos de 200 ul por cada suero (Anexo 3). Las muestras usadas en el RIA fueron todas las pertenecientes al Grupo 1 y 13 pertenecientes al Grupo 2; el criterio de selección de los últimos sueros se basó en el grado de hemólisis y lipemia de los mismos, aquellos que no presentaron ninguna de las alteraciones anteriores fueron seleccionados para el ensayo. Las nuevas alícuotas fueron separadas en dos cajas, la primera conformada por todos los tubos con muestras de 500 ul y la segunda por todos los tubos con muestras de 200 ul, ambas cajas fueron almacenadas a -20°C .

La caja con alícuotas de 500 ul fue transportada en un cooler con hielo químico a las instalaciones de los Laboratorios Veterinarios "NationWide Specialist Laboratories®", localizados en Sawston, Cambridge, Reino Unido. Bajo la

supervisión de la Gerente de Operaciones y Servicios Veterinarios Helen Evans BSc Hons, se procedió a realizar la prueba RIA tomando en cuenta las especificaciones realizadas por el fabricante del Kit “Recombigen EPO Mitsubishi”, que se detallan a continuación (Anexo 3):

Preparación de Reactivos:

1. EPO Yodada (I^{125}): Añadir 11 ml de agua purificada al tubo y mezclar suavemente hasta disolver.
2. Anticuerpo Anti-EPO: Añadir 26 ml de agua purificada al tubo y mezclar suavemente hasta disolver.
3. Reactivo B/F de separación: Almacenar en la refrigeradora hasta su uso, mezclar delicadamente para no crear burbujas.
4. EPO estándar A: Añadir 2 ml de agua purificada al tubo y mezclar delicadamente hasta disolver.
5. EPO estándares B, C, D, E, F y G: Añadir 1 ml de agua purificada al tubo y mezclar delicadamente hasta disolver.
6. EPO Control #1 y Control #2: Añadir 1 ml de agua purificada al tubo y mezclar delicadamente hasta disolver.

Realización del Ensayo:

1. Colocar 200 ul de muestra, EPO estándares A – G, y EPO Control #1 y #2, en tubos destinados al ensayo.
2. Colocar 250 ul de anticuerpo EPO en cada tubo y mezclar.
3. Incubar por dos horas a 37°C.
4. Colocar 100 ul de EPO Yodada (I^{125}) en cada tubo y mezclar, asegurándose de colocar el reactivo en todos los tubos incluyendo uno nuevo para conteo total (T) en un período de tiempo no mayor a 10 minutos.
5. Incubar por tres horas a 37°C.
6. Colocar 1 ml de reactivo B/F de separación en cada tubo y mezclar.

7. Centrifugar los tubos a 2000xg a 2-8°C durante 15 minutos.
8. Remover los sobrenadantes por completo mediante decantación o aspiración (Anexo 4).
9. Medir la radiactividad de cada tubo mediante un gamma contador durante 1 minuto.
10. Calcular el porcentaje de B/B_0 , y realizar la curva estándar de los resultados junto curva de EPO estándar. La concentración de EPO en una muestra dada está determinada por la curva estándar.

Nota: Para calcular B/B_0 , usar la fórmula: $\text{Conteo de cada tubo B} / \text{Conteo de EPO estándar A} \times 100$.

3.4.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Con la finalidad de confirmar el diagnóstico citológico e histopatológico de los caninos positivos a TVT, se realizó la prueba qPCR a todas las biopsias tumorales posterior extracción de ADN de los tejidos estudiados. El procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio perteneciente al proyecto "CTVT" localizado en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, y fue realizado por la candidata a Ph.D y licenciada en patología animal Andrea Strakova, bajo la supervisión de la Dra. Elizabeth Murchison.

El objetivo de esta prueba fue determinar la presencia de LINE-MYC en los tejidos tumorales, descrito como método de diagnóstico específico de TVT en el Capítulo 2.

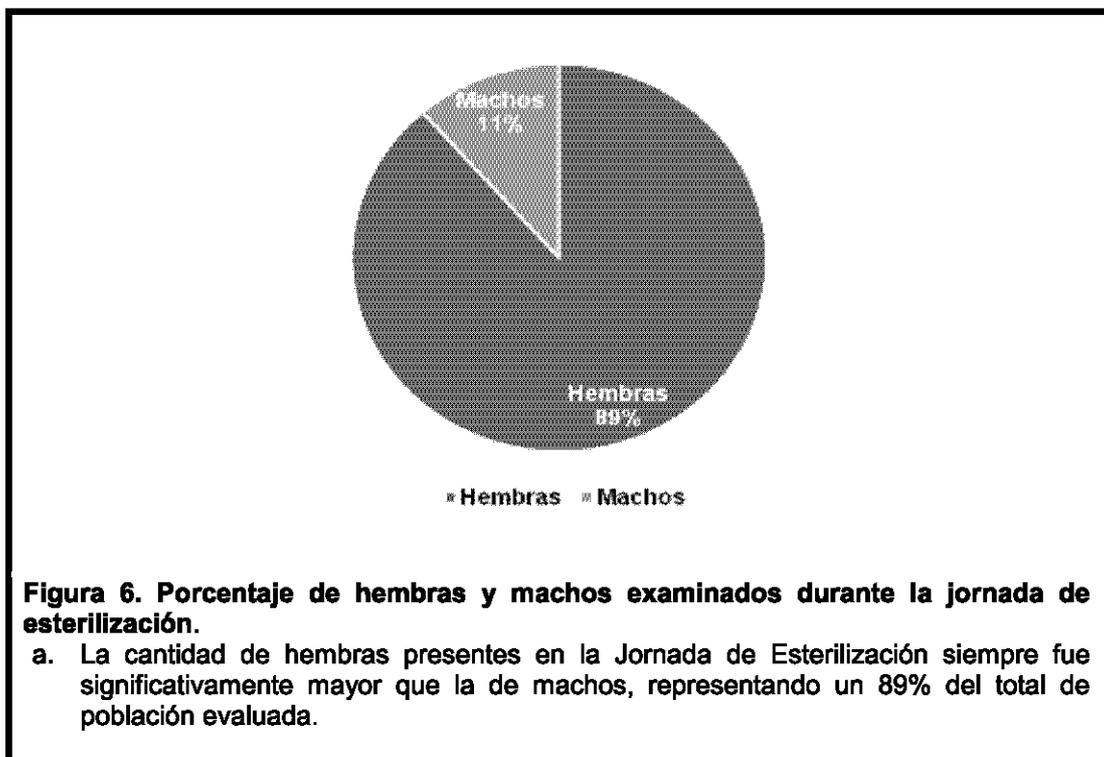
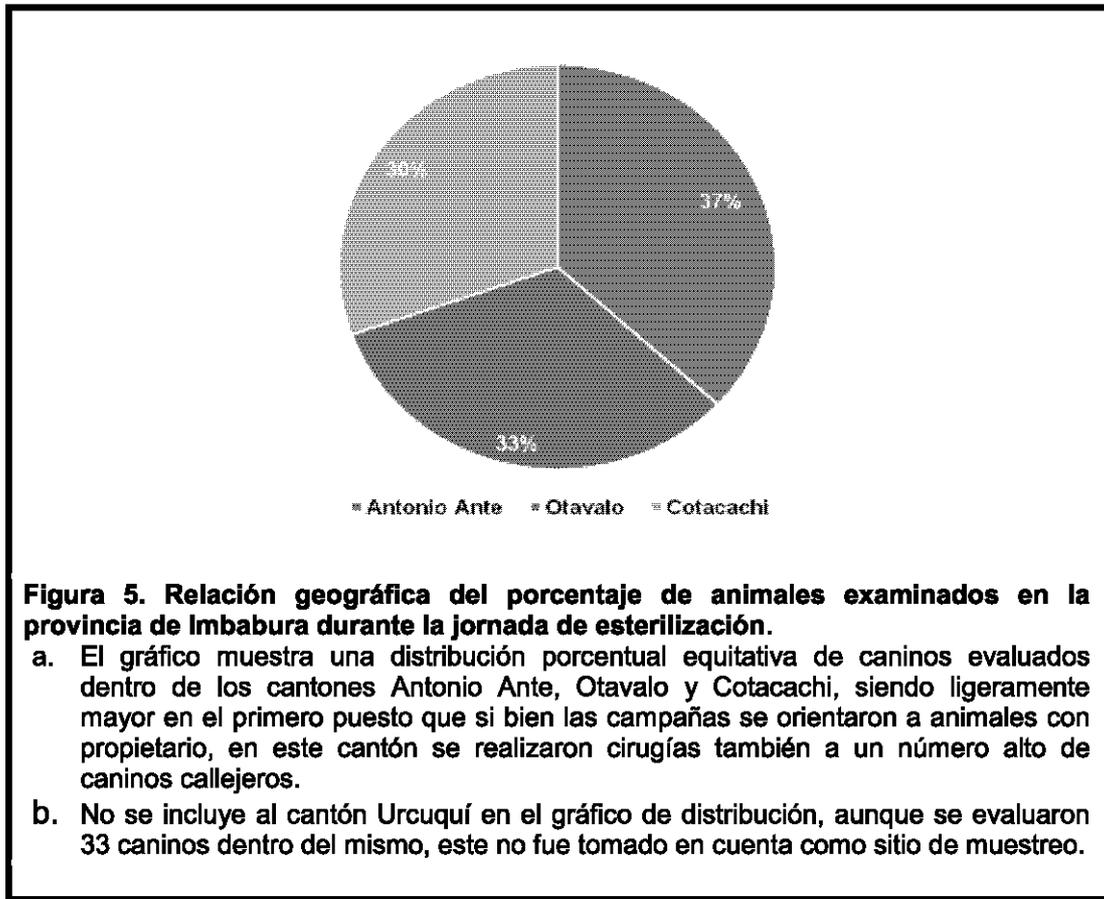
3.4.4.8 Método de análisis estadístico

El principal método de análisis de los resultados obtenidos en la investigación fue la comparación porcentual de todos los resultados. Para la determinación de significancia en los resultados obtenidos en el RIA referentes a las concentraciones séricas de EPO se utilizó la prueba "t de Student" entre los valores pertenecientes a los animales positivos a TVT y aquellos escogidos como control.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos en este estudio. Los porcentajes que se describirán referentes a valores poblacionales, se aplican al lugar, espacio y tiempo detallados en el siguiente párrafo; debido a que el estudio se realizó en un área específica, no representan completamente la realidad nacional de la enfermedad, sin embargo, estos datos muestran una guía importante en la identificación de la problemática inicial en caninos de los cantones estudiados, así como presentan valores aplicables a nuevas investigaciones en el país, no únicamente enfocadas en el Tumor Venéreo Transmisible Canino, sino también en estudios poblacionales, redacción de justificaciones de campañas de profilaxis y esterilización, análisis de otras patologías, entre otros.

En total se valoraron clínicamente 559 caninos en la provincia de Imbabura, de los cuales 194 se localizaron en el cantón Antonio Ante, 172 en Otavalo, 160 en Cotacachi y 33 en Urcuquí (Figura 5) durante el período comprendido entre el 31 de julio del 2014 al 21 de agosto del mismo año, mientras se ejecutaba la Jornada de Esterilización Masiva organizada por la Fundación Protección Animal Ecuador – Capítulo Ibarra. La distribución de género durante la campaña fue de 495 hembras y 64 machos examinados clínicamente (Figura 6).



La excesiva cantidad de hembras caninas presentes en la mayoría de campañas de esterilización en el país, en comparación con el número de machos, responde a motivos socioculturales, comunes en todo el territorio ecuatoriano; es necesario trabajar en campañas de socialización, educación y concienciación de personas, previa la realización de estas campañas para evitar este problema, puesto que si bien se disminuye la cantidad de camadas no deseadas al esterilizar una hembra, el período reproductivo de los machos no es cíclico y éstos se encuentran sexualmente activos durante todo el año.

Es fundamental la creación de un censo de población canina nacional oficial con la finalidad de poder correlacionar y calcular prevalencias más precisas relacionadas a patologías y enfermedades zoonóticas en el Ecuador, con esta información se podrían determinar porcentajes de efectividad en campañas de esterilización así como también establecer la cantidad de población abarcada en determinado estudio; se recomienda evaluar la prevalencia de enfermedades infecciosas en caninos y tasas de mortalidad asociadas a las mismas que pudiesen alterar la cantidad de animales muestreados en una población.

4.1 Diagnóstico clínico de TVT

Se evidenciaron signos clínicos sugerentes a TVT genital, clasificándose como clínicamente positivos a la enfermedad al 2% (11/559) del total de caninos evaluados durante las Jornadas de esterilización (Figura 7). De los 11 positivos, 8 fueron hembras y 3 fueron machos; distribuyéndose 7 caninos en Cotacachi, 3 en Antonio Ante, y 1 en Otavalo (Tabla 2).

En Ecuador no se han desarrollado estudios de prevalencia de TVT, así que no se pueden comparar los resultados de esta investigación con datos referentes al país, por lo tanto los valores obtenidos se han comparado con información de artículos científicos publicados por investigadores de otros países.

En el estudio realizado por Strakova y Murchison referente a la epidemiología del TVT, se estima que el Ecuador tendría entre un 5 – 10% de prevalencia de esta enfermedad (Strakova, 2013, p.10-11); la diferencia entre la prevalencia obtenida en esta investigación y la descrita en dicho estudio se centra principalmente en el hecho de que la primera es producto de una investigación realizada durante un mes en Jornadas de Esterilización enfocadas mayoritariamente a animales con propietario en tres cantones de la sierra ecuatoriana, mientras que la segunda responde al punto de vista médico basado en la experiencia de tratamiento de casos durante un tiempo indefinido en varias ciudades de la costa ecuatoriana, donde los animales viven en mayores condiciones de hacinamiento y las características ambientales son más extremas, poniendo siempre en riesgo su sistema inmunitario; ningún resultado es errado, por el contrario, se recomienda realizar mayores estudios para poder determinar si existen diferencias significativas entre los porcentajes de prevalencia de esta enfermedad en todo el país.

Tabla 2.- Distribución geográfica y por género de caninos evaluados y caninos diagnosticados clínicamente como positivos a TVT.

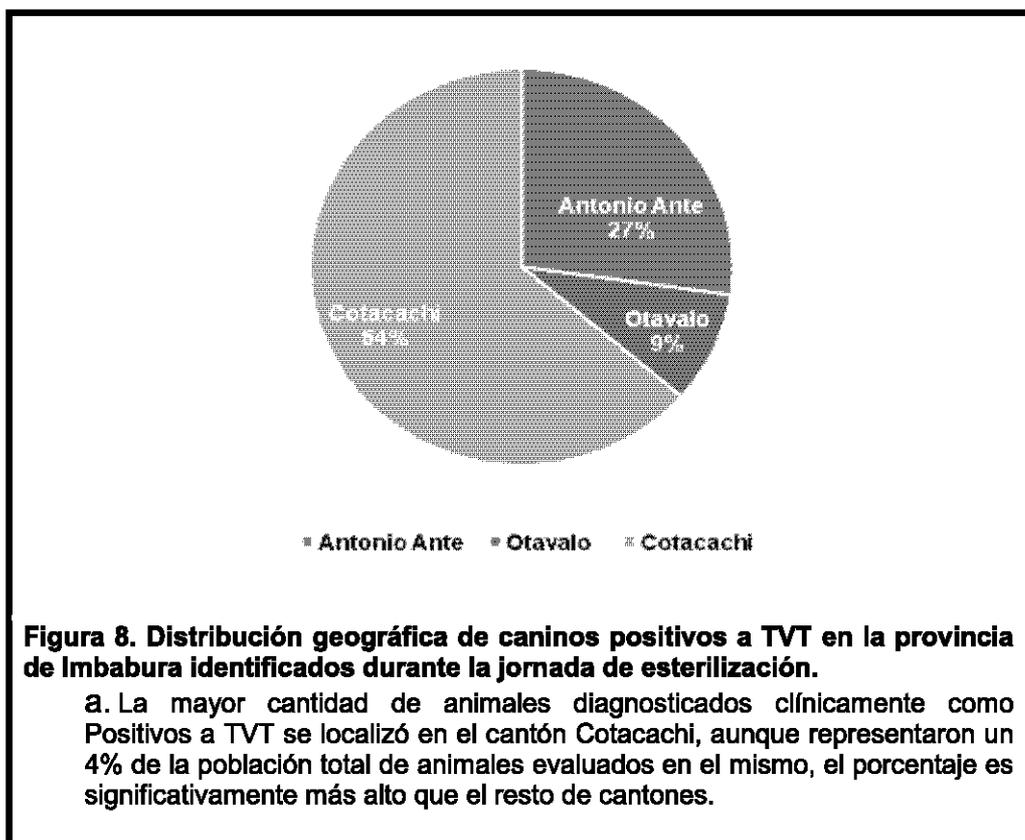
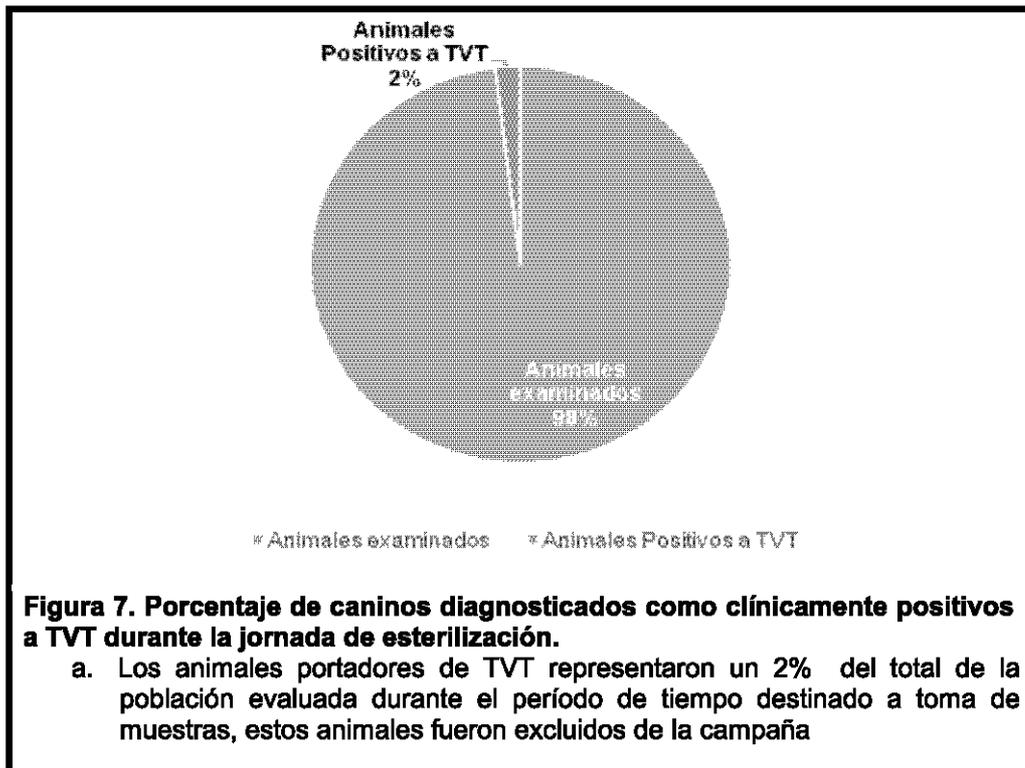
Provincia	Cantón	Caninos Hembra Evaluados	Caninos Macho Evaluados	Caninos Hembra Positivos a TVT	% Hembras Positivas a TVT	Caninos Macho Positivos a TVT	% Machos Positivos a TVT
Imbabura	Antonio Ante	172	22	2	1,16 (2/172)	1	4 (1/22)
	Otavalo	154	18	1	1,54 (1/154)	0	0
	Cotacachi	141	19	5	3,55 (5/141)	2	10 (2/19)
	Urququí	28	5	0	0	0	0
Total		495	64	8	1,62 (8/495)	3	4,69 (3/64)

Aunque el número de machos evaluados durante las campañas fue relativamente menor al de hembras (64 vs 495), la prevalencia de TVT en los mismos fue superior con un 4,69%(3/64) de machos diagnosticados como

positivos frente a un 1,62%(8/495) de hembras diagnosticadas como positivas en relación a la población total de machos y hembras respectivamente. Estos valores deben tomarse como indicadores importantes en próximas investigaciones relacionadas a la epidemiología del TVT puesto que los tumores presentes en machos no son igual de visibles que en hembras y pueden pasar desapercibidos por sus propietarios durante largos períodos de tiempo, además como se mencionó con anterioridad, la castración de machos es una práctica no muy aceptada en el país y por lo tanto se corre el riesgo de que caninos portadores de TVT no sean diagnosticados y continúen diseminando la enfermedad.

El TVT es una enfermedad que no siempre debe asociarse a caninos callejeros, como se demuestra en este estudio el 81,8% (9/11) de los animales positivos a esta enfermedad tenían propietario; debe tomarse en cuenta la cantidad de caninos sueltos que deambulan en las calles, debido a que el contacto frecuente entre los mismos es la principal vía de contagio de esta enfermedad (Strakova y Murchison, 2014, p.4). En el país es común observar que los propietarios de caninos permitan que sus animales salgan a las calles, la autora de la investigación pudo evidenciar que en numerosas ocasiones esta práctica se ve aumentada luego de que el animal ha sido esterilizado, pues al ver que las hembras ya no corren riesgo de preñeces indeseadas, se les permite salir con mayor frecuencia empeorando la problemática.

El 25% (2/8) de las hembras diagnosticadas con TVT genital se encontraban previamente esterilizadas, por lo que se sospecha que en el momento de la cirugía, las caninas ya eran portadoras de la enfermedad, ya sea en período de incubación o las masas tumorales no eran lo suficientemente grandes como para ser diagnosticadas por el clínico tratante. Los propietarios de estas dos perras indicaron que inmediatamente después de la esterilización los tumores se hicieron visibles por lo que se presume que la inmuno supresión ocasionada por el proceso quirúrgico, pudo haber favorecido el crecimiento de las neoplasias.



El cantón Cotacachi presentó el mayor número de animales positivos a TVT, existen numerosos factores que afectan las condiciones de vida de las personas y por tanto animales que se encuentran en el mismo. Dentro de la provincia de Imbabura, este es el cantón de mayor superficie geográfica, abarcando incluso zonas de subtrópico de la costa ecuatoriana (IGM, 2013), así como también es el cantón que mayor cantidad de población rural presenta, con un porcentaje de 77,9%, en contraste con Otavalo que presenta un 62,5% y Antonio Ante que posee 51,1% (INEC, 2010).

Strakova y Murchison (2014), determinan en su estudio que la prevalencia de TVT guarda relación con el nivel de ingresos per cápita de los países analizados, puesto que los mismos se traducen en los esfuerzos que genera cada gobierno en el control de fauna urbana mediante la inversión de recursos financieros destinados al propósito, así como también determinan el nivel de calidad de vida de las personas y por lo tanto de sus mascotas (Strakova y Murchison, 2014, p. 4), esta aseveración puede ser confirmada con la temática situacional de la fauna urbana en la provincia de Imbabura, los Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales de los cantones Antonio Ante y Otavalo, destinan recursos al manejo de fauna urbana y control de animales callejeros en sus respectivas circunscripciones territoriales, sin embargo el GAD Municipal de Cotacachi no se encuentra envuelto en acciones similares y, a experiencia de la autora del trabajo de investigación, las condiciones de vida de los caninos en el cantón son más críticas, existiendo un número mayor de animales deambulando en las calles, aun cuando estos tienen propietario.

4.2 Examen clínico y categorización

Una vez establecidos los Grupos 1, 2 y 3 de muestreo bajo los criterios especificados en el Capítulo 3 y creados los registros presentados en el Anexo 3, se determinó que después de examinar clínicamente 589 caninos, se escogieron como aptos para muestreo a 56 de ellos. Distribuidos en 11 del Grupo 1, 31 del Grupo 2 y 14 del Grupo 3.

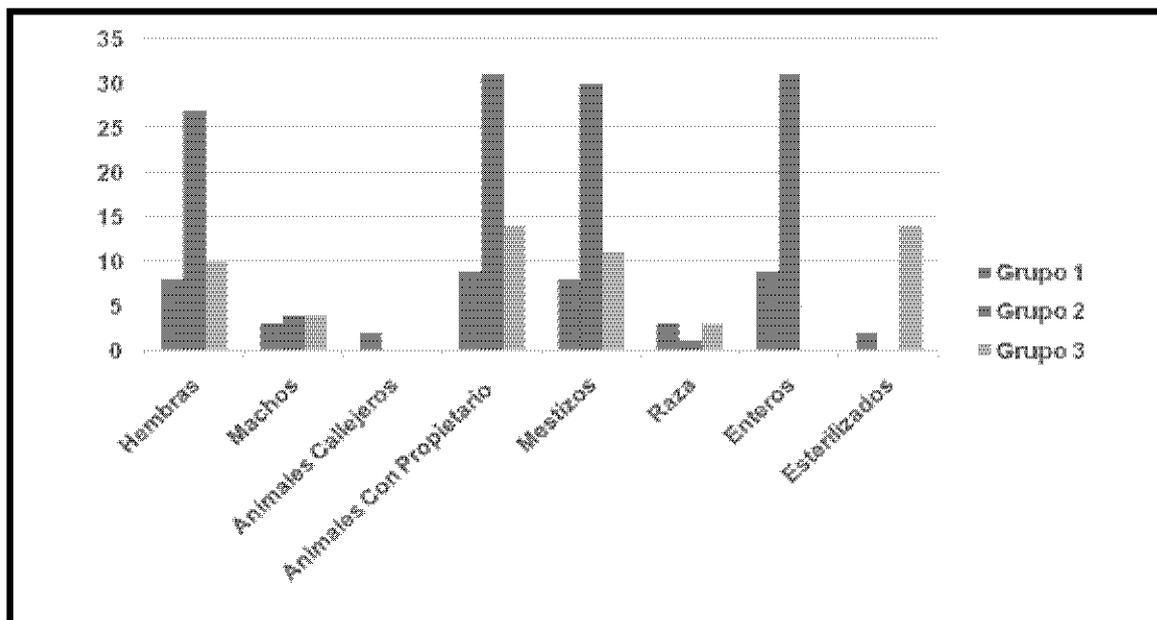


Figura 9. Distribución por sexo, propietario, raza y estado reproductivo de animales categorizados en el estudio.

- En esta figura se puede observar que la mayor cantidad de animales muestreados de los tres grupos fueron hembras, del mismo modo casi todos los caninos (incluidos aquellos diagnosticados como positivos a TVT) tenían propietario y cerca de su totalidad fueron mestizos.
- El estado reproductivo de los caninos fue diferente en los tres grupos, encontrándose animales esterilizados y enteros en el Grupo 1. El Grupo 2 presentó caninos enteros que fueron esterilizados durante las Jornadas y finalmente todos los animales pertenecientes al Grupo 3 se encontraban previamente esterilizados.

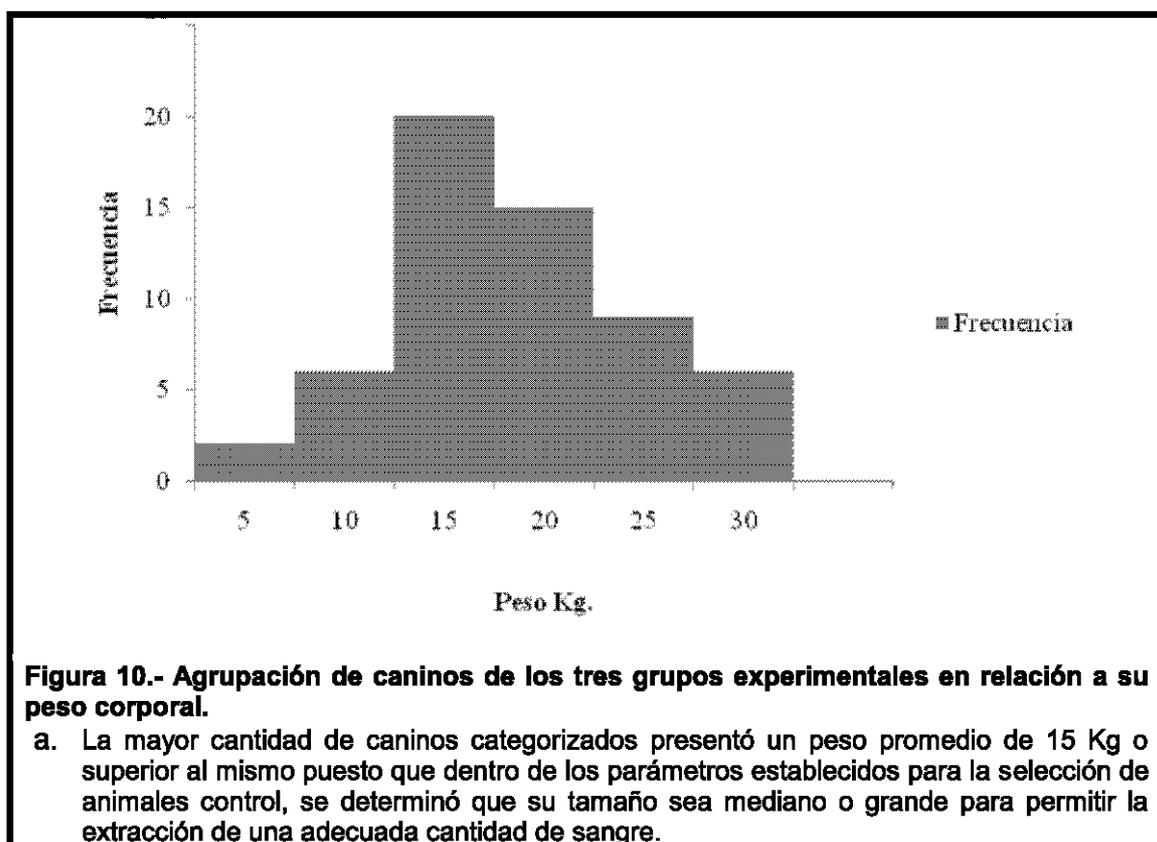
Tabla 3.- Determinación de valores promedio de las constantes fisiológicas evaluadas en los Grupos Experimentales 1, 2 y 3.

	Edad promedio (años)	Peso promedio (Kg)	Temp. rectal promedio (°C)	Frecuencia cardíaca promedio (lpm)	Frecuencia respiratoria promedio (rpm)
Grupo 1	5	14,24	38,5	132	40
Grupo 2	3	15,16	38,3	138	38
Grupo 3	4	20,46	38,7	102	26

Nota: Durante la categorización de caninos se buscó clasificar animales con pesos, edades y constantes fisiológicas similares, el Grupo 1 y 2 pertenecen a la misma provincia y fueron examinados durante condiciones de estrés diferentes a los animales del Grupo 3.

*lpm: latidos por minuto; rpm: respiraciones por minuto

El estado de salud general de los animales categorizados fue también un factor importante a tomar en cuenta durante la creación de registros, se evaluaron parámetros clínicos y fisiológicos que pudieran alertar la presencia de diversas patologías (Tabla 3 y Anexo 2). Los caninos pertenecientes al Grupo 1, en su mayoría (8 vs 11) no presentaron signos de enfermedad clínica grave o de otras enfermedades durante el examen físico (nódulos linfáticos, mucosas y constantes dentro los rangos normales) a pesar de ser portadores de TVT, aun cuando las masas tumorales eran de gran tamaño y presentaban tejido necrótico; se presume sin embargo que las alteraciones que 3 caninos presentaron en el examen clínico relacionadas a deshidratación y nódulos linfáticos reactivos se encontraban vinculadas a los cuidados otorgados por sus propietarios referentes a nutrición y profilaxis, mas no a la presencia de TVT (Anexo 5). Ninguno de los caninos pertenecientes a los tres grupos experimentales presentó alteraciones óculo-nasales, dermatológicas o de mucosas importantes que sugieran la presencia de otras masas tumorales o infecciones que pudiesen alterar los resultados obtenidos en los exámenes sanguíneos.



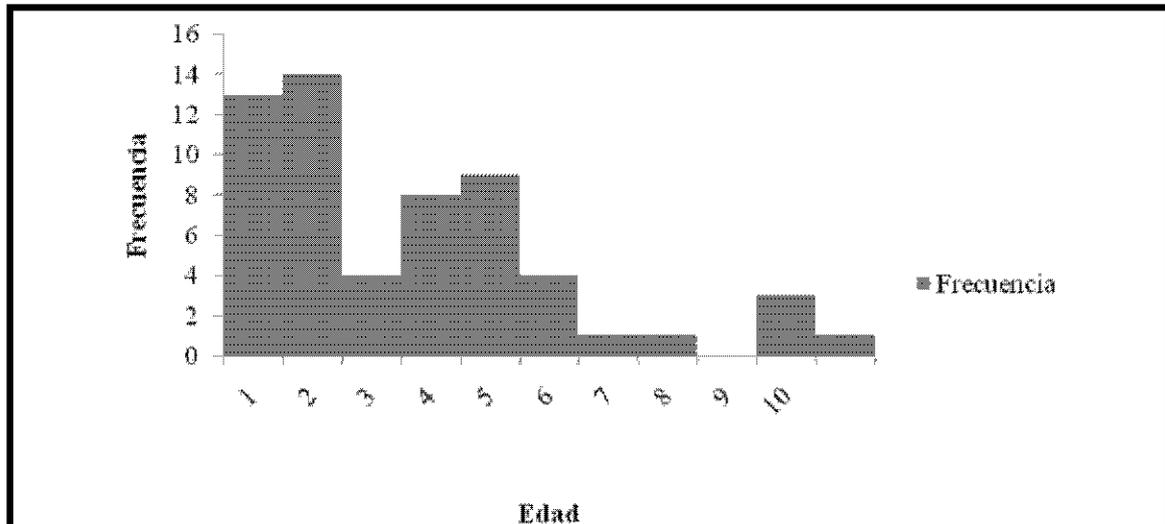


Figura 11.- Agrupación de caninos de los tres grupos experimentales en relación a su edad.

- Los animales muestreados fueron en su mayoría caninos jóvenes en edad reproductiva.
- Los animales pertenecientes a los Grupos 2 y 3, fueron elegidos al determinar que su rango etario era similar o cercano a los caninos pertenecientes al Grupo 1.

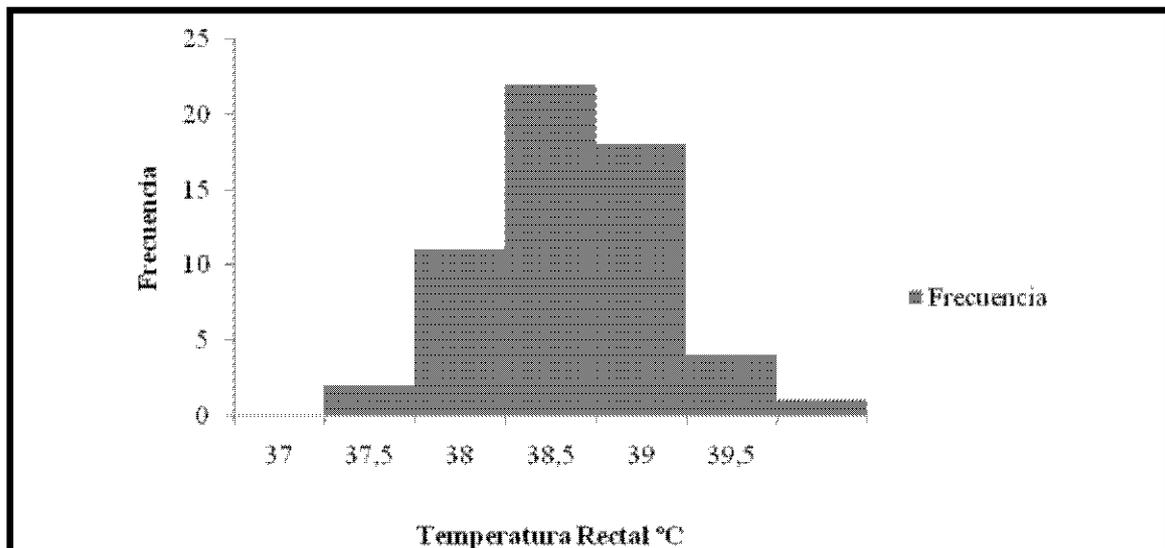


Figura 12.- Agrupación de caninos de los tres grupos experimentales en relación a su temperatura rectal.

- Los rangos de temperatura rectal de todos los caninos evaluados se encontraron dentro de los límites establecidos como normales.
- Las variaciones encontradas pueden ser producto de factores extrínsecos tales como: estrés, ejercicio, condiciones ambientales de la zona de muestreo, entre otros.

4.3 Hemograma

Todas las muestras sanguíneas obtenidas de caninos de los Grupos 1 y 2 fueron procesadas con la finalidad de comparar los valores de hemograma, y así buscar evidencia que pudiera brindar características clave en el desarrollo del TVT. Se tomaron como factores de evaluación: recuento eritrocitario, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina celular media (HCM) y concentración celular media de hemoglobina (CCMH).

Después de analizar las muestras y los resultados obtenidos en los hemogramas, se estableció un rango de referencia elaborado a partir de los promedios de los datos pertenecientes a los valores absolutos obtenidos en los exámenes realizados al Grupo 2 (Control Imbabura), puesto que los valores de referencia establecidos en literatura así como en otros laboratorios clínicos veterinarios del país, no agrupan en conjunto los factores a los cuales los animales fueron expuestos durante las Jornadas de Esterilización y posterior muestreo, pudiendo crear así, sesgos en la comparación de valores, aplicación de análisis estadístico y conclusiones finales.

No se deben pasar desapercibidas las características geográficas y ambientales únicas en el país durante el establecimiento de valores de referencia laboratoriales, puesto que aquellos datos descritos en libros o artículos científicos no representan la realidad del Ecuador, así como tampoco los datos utilizados en determinadas regiones del país pueden representar los factores que influyen a los animales en otras regiones del mismo. Se recomienda establecer valores propios mediante el estudio de constantes en una cantidad considerable de animales control de zonas específicas para evitar errores en el diagnóstico de patologías.

Tabla 4.- Comparación valores de referencia en hemograma, utilizados en un laboratorio clínico veterinario de la ciudad de Quito versus valores promedio obtenidos del Grupo 2

		Valores de Referencia		
		Laboratorio Clínico		Promedio Grupo 2
		Min	Max	
Leucocitos	mm³	6000	17000	14345
Eritrocitos	x 10⁶ mm³	5,5	8,5	6,2
Hemoglobina	g/dL	12	18	14,7
Hematocrito	%	37	55	45,6
VCM	um³	60	77	69,8
HCM	pg	20	25	22,6
CCMH	g/dL	32	36	32,1
Neutrófilos	mm³	3000	11500	8872
Eosinófilos	mm³	100	900	793
Basófilos	mm³	0	0	0
Linfocitos	mm³	1000	4800	4391
Monocitos	mm³	100	1400	248,8

Nota: Antes de establecer los datos promedio del Grupo 2 como valores de referencia para la comparación de resultados con el Grupo 1, se confirmó que los mismos se encuentren dentro de los rangos establecidos como normales en otros laboratorios clínicos veterinarios del país. Situación visiblemente notoria en esta tabla.

- a. El laboratorio clínico veterinario de referencia utilizado fue el perteneciente a la Dra. Gabriela Chávez R.

Luego de analizarse individualmente los valores de hemograma de los caninos pertenecientes al Grupo 1, se determinó que 8 de ellos no presentaban alteraciones significativas en el conteo de células rojas y datos relacionados a las mismas que sugieran el curso de otras patologías o alteraciones en el estado de salud del animal (Figura 13 y Anexo 5). Las caninas T005 y T010 presentaron niveles bajos de hematocrito y hemoglobina en relación a los valores referenciales, con la sospecha de la presencia de anemia microcítica hipocrómica enmascarada por el porcentaje de deshidratación (Anexo 5), se debe tomar en cuenta que fueron también los animales que menor índice de condición corporal y mayor volumen tumoral en relación a masa corporal

presentaron (Anexo 5). La canina T003 presentó valores de hemograma normales en el rango mínimo establecido y aunque su índice de condición corporal y porcentaje de deshidratación se encontraban dentro de los valores normales (Anexo 5), no se puede descartar la sospecha de inicios de anemia microcítica hipocrómica a causa de la hemorragia constante ocasionada por el tumor. Para poder comparar los resultados con los valores referenciales establecidos a partir del Grupo 2, se determinaron valores promedio de cada unidad y se la comparó con su referencial. Como puede observarse en la Tabla 5, no existen diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 5.- Comparación valores promedio obtenidos en los hemogramas pertenecientes a caninos del Grupo 1 vs los valores referenciales obtenidos del promedio de hemogramas pertenecientes al Grupo 2

	Valores promedio Grupo 1	Valores referenciales Grupo 2
Eritrocitos (mm³)	6,3	6,2
Hemoglobina (g/dL)	13,69	14,7
Hematocrito (%)	43,24	45,6
VCM(um³)	68,92	69,8
HCM(pg)	22,21	22,6
CCMH(g/dL)	31,65	32,1

Nota: En esta tabla únicamente se toman en cuenta datos relacionados a células rojas ya que esta investigación se centra principalmente en dichos valores, los valores relacionados a células blancas se analizaron por separado.

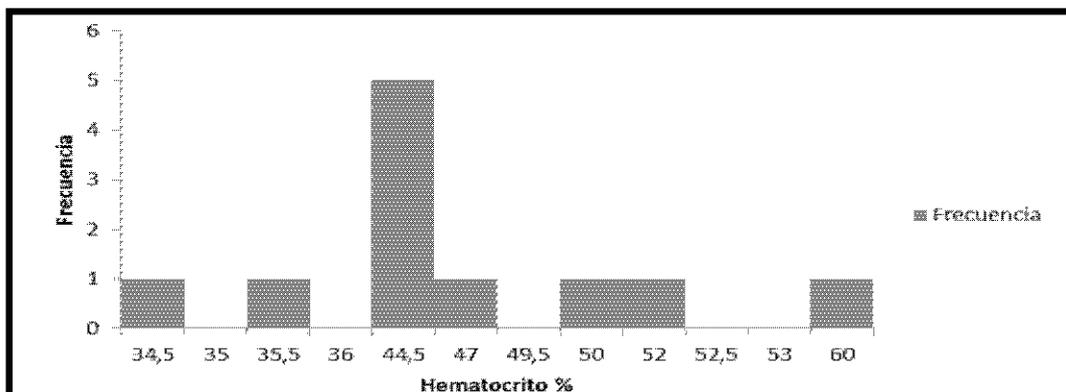


Figura 13.- Histograma perteneciente a valores de hematocrito del Grupo 1

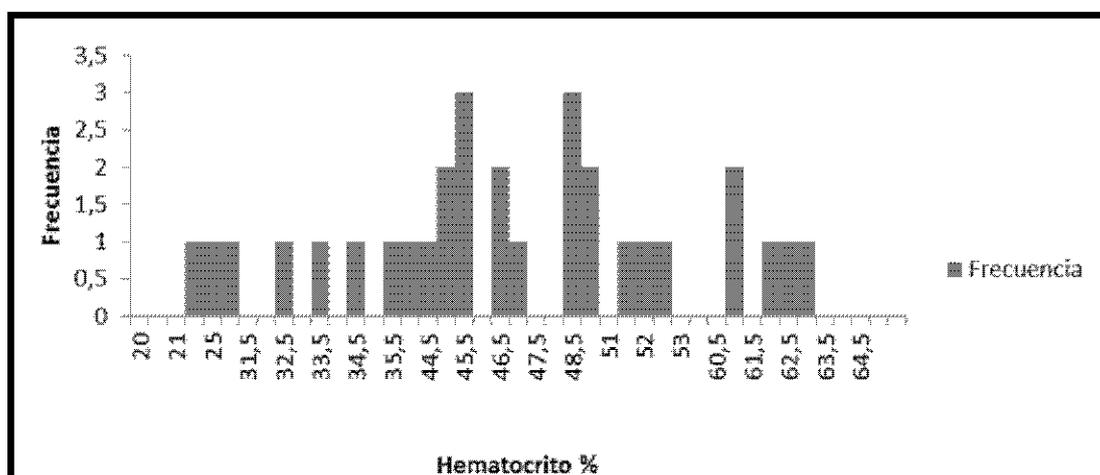


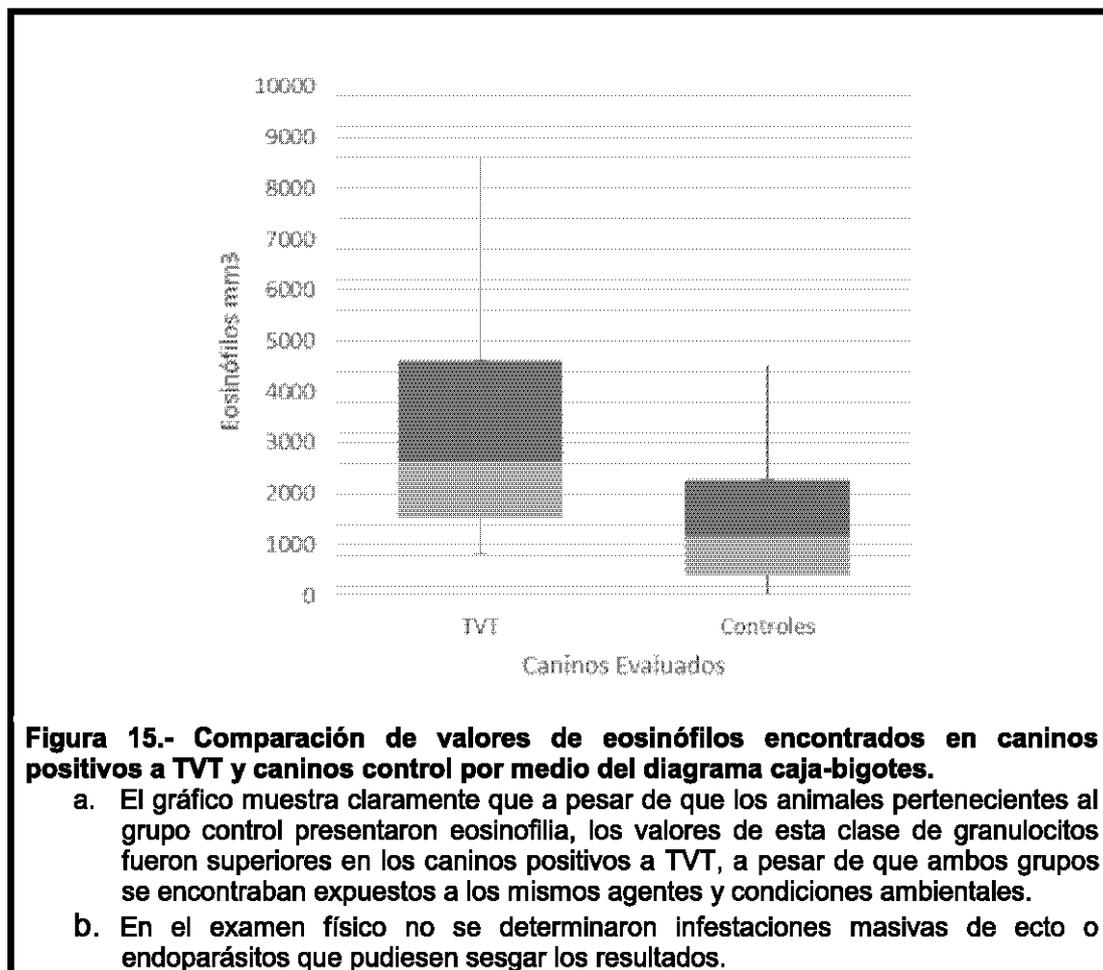
Figura 14.- Histograma perteneciente a valores de hematocrito del Grupo 2

Los valores de hematocrito del Grupo 1 no presentaron variaciones significativas en relación a los valores obtenidos en el Grupo 2. Como puede observarse en los gráficos, la mayor cantidad de animales presentaron porcentajes entre 44,5 – 50%, determinados como normales. A pesar de encontrarse a una menor altitud geográfica en relación a los caninos de los Grupos 1 y 2, los caninos del Grupo 3 presentaron valores de hematocrito normales y similares a los caninos, control del Grupo 2. Basándose en los resultados obtenidos en los hemogramas realizados a los caninos durante esta investigación, se recomienda la realización de frotis sanguíneo con sangre fresca preferentemente inmediatamente después de realizar la punción para

evitar alteraciones celulares que pudiesen mal interpretarse en los equipos de diagnóstico. Se determinó que una vez que se homogeneiza la sangre con EDTA, los núcleos de los neutrófilos tienden a hincharse pudiendo ser confundidos con otros glóbulos blancos como monocitos o linfocitos. Así mismo, se estableció que si se utilizan equipos contadores de uso humano, es necesario realizar una confirmación manual del conteo de células blancas para evitar errores en la interpretación y diagnóstico.

Con la colaboración de la Dra. Joy Archer Ph.D, profesora de Patología Clínica y directora del laboratorio clínico veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge y el Dr. Tim Williams Ph.D, patólogo clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, se analizaron los frotis sanguíneos pertenecientes a los caninos diagnosticados como positivos a TVT con la finalidad de confirmar los valores de células blancas obtenidos en los hemogramas. Se pudo evidenciar que el 73% (8/11) de los caninos presentaron eosinofilia, sugiriéndose una alteración paraneoplásica y planteándose la hipótesis de que el TVT podría secretar también factores quimiotácticos de los eosinófilos, específicamente Interleucina 5 (IL-5).

Para evitar sesgos en la determinación de los resultados descritos en el párrafo anterior se estableció una comparación con los valores de hemograma obtenidos en el Grupo 2, puesto que en el examen físico se determinó que todos los caninos presentaban parásitos externos, mayoritariamente pulgas y por lo tanto la presencia de endoparásitos asociados que ocasionen eosinofilia fue tomada en cuenta. La Figura 15 muestra los resultados obtenidos en el estudio.



4.4 Citologías y análisis histopatológico

Posterior a su recolección y tinción, las 94 muestras citológicas genitales pertenecientes a los Grupos 1 y 2 fueron analizadas en las instalaciones de la Clínica Veterinaria de la Universidad de las Américas, confirmando el diagnóstico de los 11 casos sospechosos pertenecientes al Grupo 1, mediante la observación de células con características concordantes a las especificadas por Raskin y Meyer, autores del libro *Canine and Feline Cytology*: “grandes, redondeadas, con núcleos de gran tamaño y cromatina grumosa, generalmente localizados excéntricamente con vacuolas características de células pertenecientes a TVT” (Raskin y Meyer, 2010, p. 294) (Figura 16). El diagnóstico obtenido fue confirmado en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cambridge, determinándose también variables en el número de vacuolas y tamaño celular en muestras de un mismo animal así como

también la presencia de bacterias intracelulares y extracelulares, descritos en el Anexo 4.

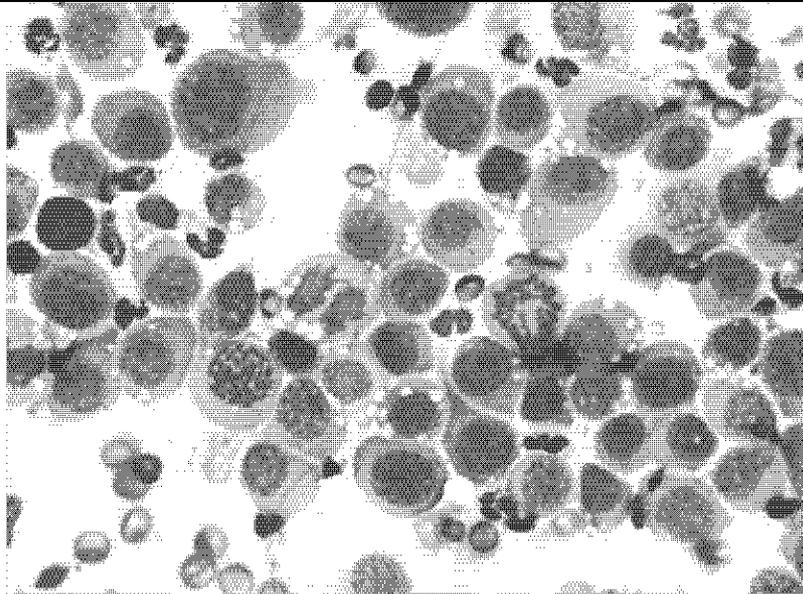


Figura 16.- Citología perteneciente a la canina T005. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400x.

- a. Se evidencian claramente células características de TVT, varias de ellas en proceso de mitosis.
- b. La variación en la cantidad de vacuolas citoplasmáticas así como tamaño celular y núcleos con cromatina grumosa es claramente observable en esta figura.
- c. Placa procesada en las instalaciones de la Clínica Veterinaria "Universidad de las Américas"

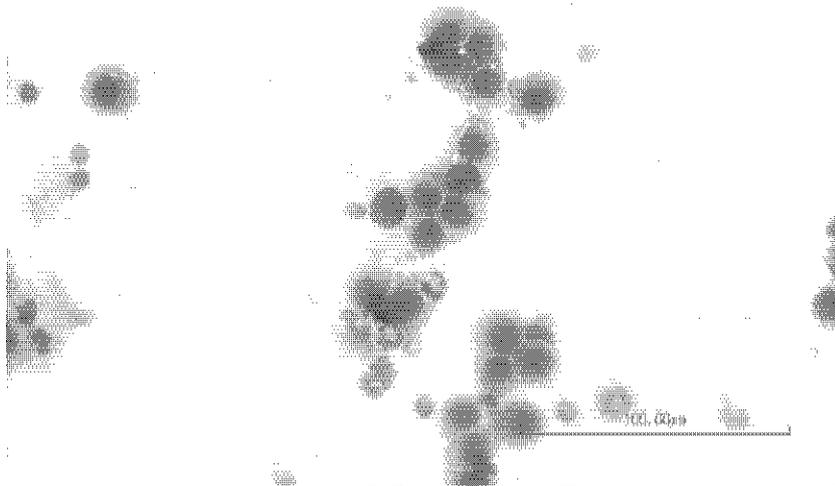


Figura 17.- Citología perteneciente a la canina T005. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400x.

- a. Confirmación del diagnóstico realizada en las instalaciones del laboratorio perteneciente al proyecto "CTVT" de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Cambridge.
- b. Las células características son nuevamente observables así como sus vacuolas y núcleos agrandados.

Para reducir el nivel de contaminación de las placas citológicas tomadas por medio de improntas superficiales, se recomienda realizar una ligera excoriación de tejido tumoral con una gasa hasta generar sangrado no profuso previa realización del procedimiento.

Las 11 placas histológicas resultantes de las biopsias tumorales fueron analizadas en las instalaciones del laboratorio perteneciente al proyecto "CTVT" de la Universidad de Cambridge, se encontraron hallazgos característicos de TVT que se describen en la Figura 18.

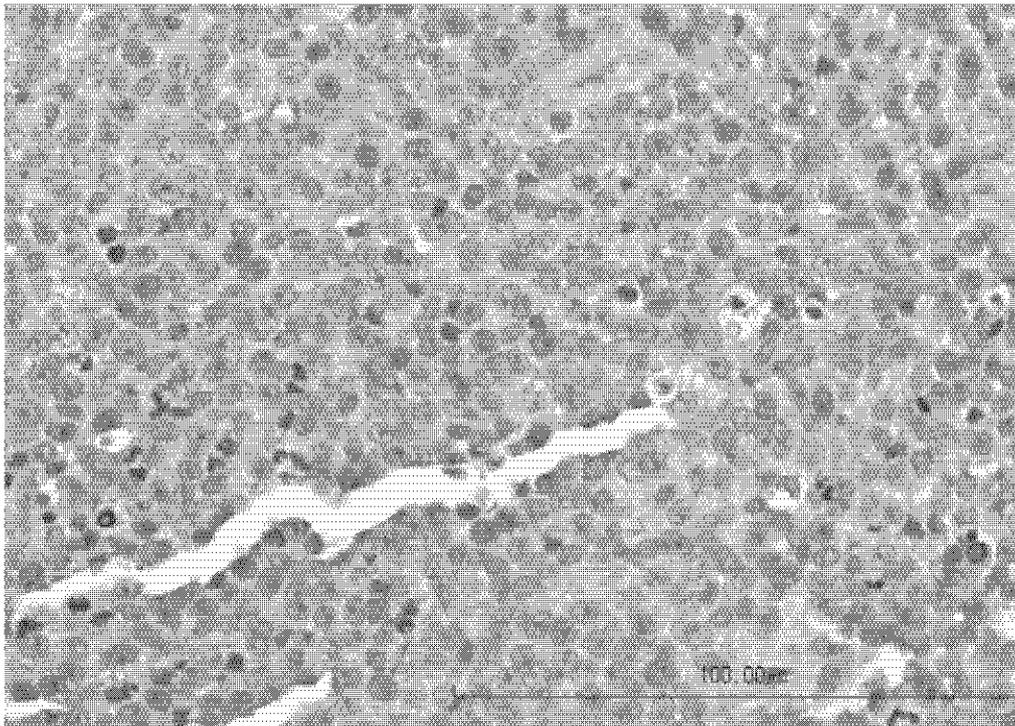
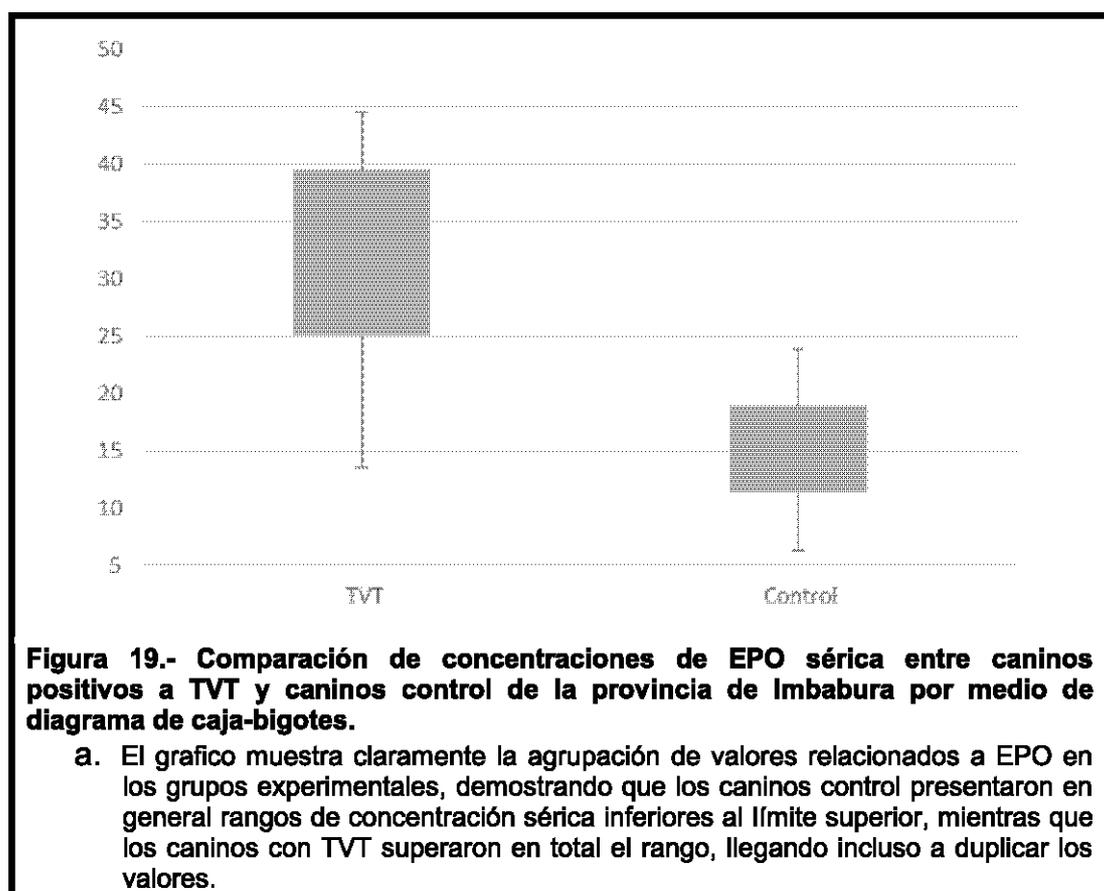


Figura 18.- Histología perteneciente a biopsia tumoral de canina T005. Tinción H&E. Aumento 400X.

- a. En el corte se presentan células típicas de TVT, de forma uniforme redondeada a ovalada, con núcleo vesicular, presencia de vacuolas y dispersión no uniforme de hebras de tejido fibroso.

4.5 Eritropoyetina Sérica

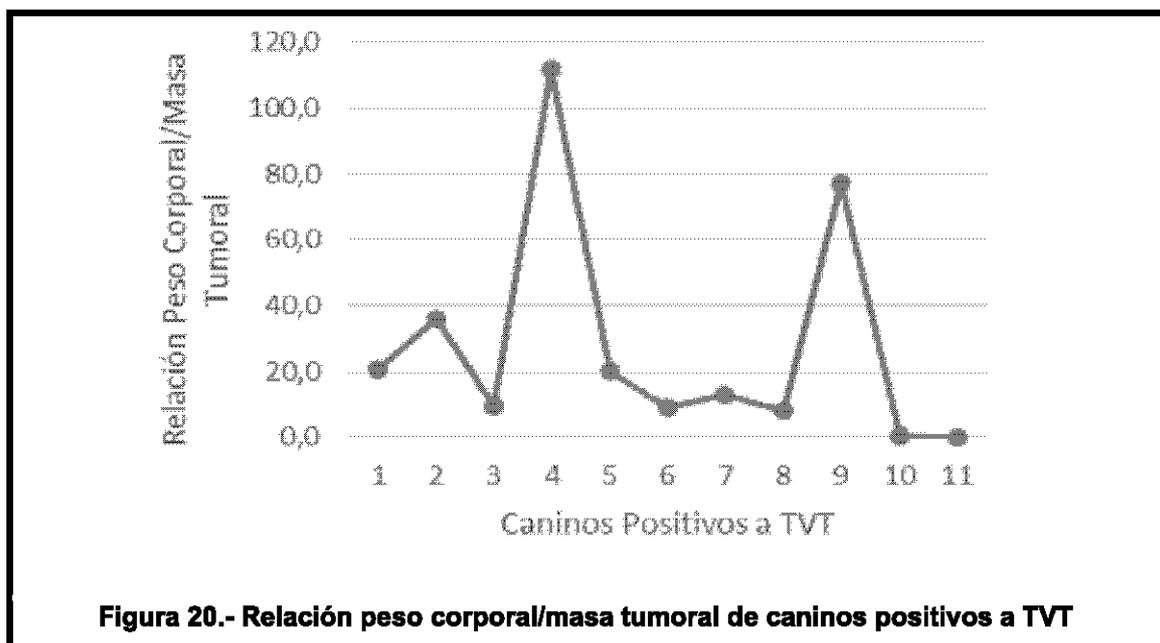
Los resultados obtenidos al Radio Inmuno Ensayo en muestras séricas escogidas fueron comparados con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones de EPO sérica entre caninos portadores de TVT y caninos control.

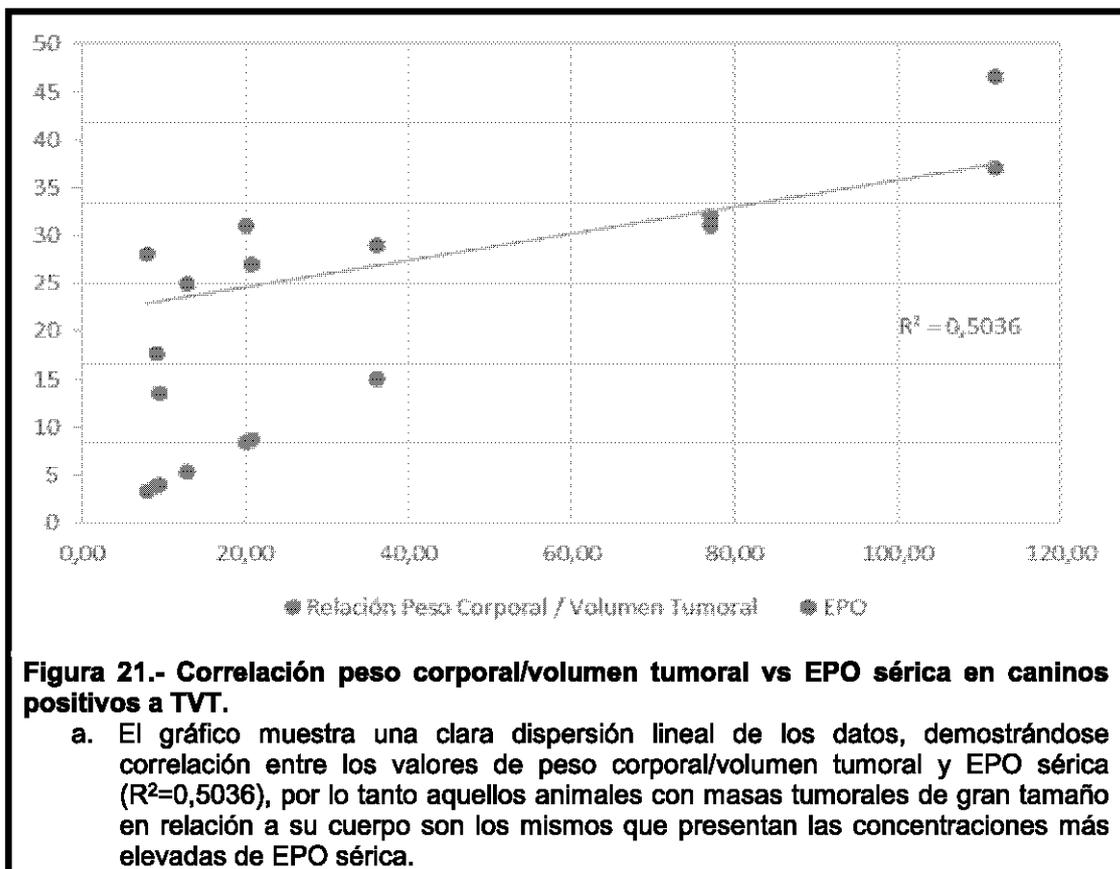


En la Figura 19, puede observar una clara diferencia entre las concentraciones de EPO circulante entre ambos grupos estudiados, siendo mayor en caninos confirmados como positivos a la enfermedad. Todos los valores obtenidos de los animales control se encontraron dentro del rango establecido como normal para EPO sérica canina por medio del laboratorio que ejecutó el análisis (10 – 20 mUI/ml), mientras que los animales enfermos superan en su mayoría el límite máximo o se encuentran cerca del mismo (Anexo 5 y Anexo 6). La media

de concentración sérica de EPO en los caninos positivos a TVT fue mayor que la de los animales control y al análisis de t student se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos ($P = <0,05$) confirmándose la hipótesis establecida en este estudio.

Se estableció una relación entre el peso de los caninos portadores de TVT y el volumen de las masas tumorales que presentaron con la finalidad de encontrar una correlación con los valores de EPO sérica. En las Figuras 20 y 21, puede observarse que los animales con las neoplasias de mayor tamaño en relación a su peso corporal fueron aquellos que presentaron los niveles más elevados de concentración de EPO sérica, confirmándose una posible correlación entre el tamaño de las neoplasias y los valores de EPO sérica, y sugiriéndose por lo tanto que probablemente son las células tumorales y no el organismo del animal afectado, quienes secretan esta hormona durante el curso de la enfermedad.





A pesar de que algunos caninos portadores de TVT presentan masas sangrantes y hemorragias profusas, no se determinan cambios significativos en sus valores de hematocrito y hemoglobina, como puede observarse en el Anexo 5. La canina con código T003 presentó una masa de gran tamaño con sangrado profuso, no mostró signos de deshidratación grave al examen clínico y su hemograma no presentó valores críticos o alarmantes de hematocrito o hemoglobina. Es probable que los valores elevados de EPO sérica en estos caninos afecten directamente la cantidad de glóbulos rojos presentes en su organismo, como lo expuesto en el Capítulo 2, y por lo tanto se compense la cantidad de células sanguíneas perdidas en la hemorragia.

4.6 LINE-MYC

Los resultados obtenidos en la prueba qPCR confirmaron el diagnóstico citológico positivo del 63% de biopsias tumorales evaluadas (7/11), por medio de la presencia de LINE-MYC en el ADN analizado.

A pesar de que el 37% (4/11) restante resultaron negativos, la confirmación de diagnóstico de TVT no se descarta siempre y cuando se haya sustentado en un procedimiento citológico, puesto que en numerosas ocasiones, las biopsias tumorales, especialmente de masas muy superficiales, presentan elevado grado de contaminación por parte de tejido huésped, principalmente leucocitos, cuyo ADN puede alterar la determinación de LINE-MYC en qPCR (Martínez, 2015, entrevista personal a E. Murchison).

Tabla 6.- Confirmación de diagnóstico positivo a TVT de los caninos evaluados por medio de cuatro métodos clínicos y de laboratorio

Código	Examen clínico	Citología	Histopatología	qPCR
T001	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
T003	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T004	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T005	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T006	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T007	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
T008	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T009	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T010	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
T011	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
T012	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Nota: Los factores tomados en cuenta para clasificar a un animal como positivo a TVT fueron:

- Masas tumorales cuyos signos anatomopatológicos eran concordantes a los descritos en el capítulo 2 al examen físico.
- La presencia de células características de TVT descritas también en el capítulo 2 al análisis citológico e histopatológico de frotis y biopsias genitales.
- La aparición de LINE-MYC en el ADN extraído de biopsias tumorales luego de la realización de qPCR.

Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- En este estudio se determinó que la presencia de TVT es muy común en áreas donde no existe control de la población canina y los animales deambulan libremente por las calles favoreciéndose un contacto frecuente entre los mismos, por medio de conductas sociales y reproductivas, agravándose cuando las condiciones sanitarias en las que se desenvuelven los caninos se hallan en detrimento de su sistema inmune.
- La evaluación citológica e histopatológica son métodos efectivos de confirmación en el diagnóstico del TVT, puesto que muestran características específicas de la enfermedad, siendo el análisis citológico el más recomendado por su poca agresividad en la toma de muestras, facilidad de preparación, bajo costo y mayor definición de elementos celulares, pudiendo ser considerada como Gold standard en la determinación de caninos positivos a TVT.
- La eosinofilia puede ser un indicador relacionado a la presencia de células de TVT en el hemograma, siempre y cuando existan más signos clínicos concordantes con la patología, y el diagnóstico de la misma se haya realizado por otros métodos más efectivos descritos en esta investigación. Aunque todos los animales evaluados en este estudio presentaron eosinofilia, se ha reportado que no todos los caninos portadores de TVT muestran esta alteración
- Los caninos positivos a TVT presentan valores elevados de EPO sérica en relación a caninos sanos localizados geográficamente a la misma altura sobre el nivel del mar. De la misma manera existe una relación directa entre el tamaño de la masa tumoral/peso corporal del canino con la

cantidad de EPO sanguínea circulante en su organismo y por lo tanto, la actividad normal de esta hormona compensa los porcentajes de células rojas, presentándose valores normales de hematocrito y hemoglobina a pesar de la presencia de pérdidas sanguíneas profusas.

- La esterilización no es un método efectivo en la prevención de la enfermedad si no se realizan estudios poblacionales y capacitación a los propietarios previa su realización, esta investigación demostró que en el país los machos son capaces de diseminar la enfermedad a un mayor número de caninos porque su control reproductivo no es una práctica aceptada socioculturalmente sobre todo en zonas rurales, así como también se demostró que hembras esterilizadas portadoras de TVT que deambulan en las calles, también pueden diseminar la enfermedad.

5.2 Recomendaciones

- Los caninos diagnosticados como positivos a TVT deben ser inmediatamente tratados o, si los recursos económicos del propietario o fundación de rescate no lo permiten, deben ser eutanasiados bajo las normas de bienestar animal descritas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), con la finalidad de evitar una mayor propagación de la enfermedad a otros caninos y el sufrimiento del animal portador de la neoplasia.
- Con la finalidad de evaluar las características específicas del TVT en el Ecuador, es necesario que todo médico veterinario que diagnostique la enfermedad, realice una confirmación citológica e histopatológica de la misma, cree un registro de casos y los reporte de manera obligatoria al organismo de control de fauna urbana vigente en su circunscripción territorial. Esta información contribuirá al establecimiento de un programa de control, a través de la identificación de casos y su localización.

- La realización de un perfil sanguíneo completo es de suma importancia en la valoración clínica de pacientes portadores de TVT, antes, durante y después del tratamiento de la enfermedad. Para poder determinar el estado de salud real del canino es necesario complementar los resultados obtenidos mediante hemograma con valoración de bioquímica sanguínea, proteínas totales, factores de coagulación, entre otros datos que el médico veterinario tratante considere de importancia.

Referencias

- Acs, et al. (2001). Erythropoietin and Erythropoietin Receptor Expression in Human Cancer. *Cancer Research*. 61. p. 3561 – 3565.
- Ajello, P. (1980). *Sticker's tumour or transmissible venereal sarcoma. A review, with reference to 590 cases seen at Messina, Italy since 1931.* *Annali de la Facolta di Medicina Veterinaria, Messina*. 27. p. 289-339.
- Albanese, F., Poli, A., Milanta, F. y Abramo, F. (2002). Primary cutaneous extragenital canine transmissible venereal tumour with Leishmania-laden neoplastic cells: a further suggestion of histiocytic origin?. *Veterinary Dermatology*. 13 (5).
- Amber, E. y Henderson, R. (1982). Canine transmissible venereal tumor: Evaluation of surgical excision of primary and metastatic lesions in Zaria-Nigeria. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1882.
- Barski, G. y Cornefert-Jensen, F. (1966). Cytogenetic Study of Sticker Venereal Sarcoma in European Dogs. *Journal of The National Cancer Institute*. 37 (6). p. 787-797.
- Bashford, E., Murray, J. y Cramer, W. (1905). Comparison between the transmission of an infected granuloma of the dog and carcinoma of the mouse. *Imperial Cancer Research Fund*. 2.
- Bender, R. y Hamel, E. (1991). Vinca Alkaloids. *Review Chimicaoggi*. July-August.
- Bennet, B., Debelak-Fehir, K. y Epstein, R. (1975). Tumor-blocking and – inhibitory Serum Factors in the Clinical Course of Canine Venereal Tumor. *Cancer Research*. 35.

- Betamuzi, E. (1992). Risk factors associated with canine TVT in Tanzania. *Preventive Medicine*. 13.
- Bloom, F. (1954). *Pathology of the Dog and Cat*: Frank Bloom. American Veterinary Publications.
- Boscos, C. (1988). Transmissible venereal tumour in the dog: clinical observations and treatment. *Animalis Familiaris*. 3.
- Brown, N., Calvert, C. y MacEwen, E. (1980). Chemotherapeutic management of transmissible venereal tumors in 30 dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 176 (1).
- Bonagura, J. (2009). *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. Missouri, Estados Unidos: Elsevier, Inc.
- Boscos, C., Ververidis, H., Tondis, D., Stamou, A. y Samartzi, F. (1998). Ocular involvement of transmissible venereal tumor in a dog. *Veterinary Ophthalmology*. 1 (2-3).
- Brower, V. (2003). Erythropoietin may impair, not improve, cancer survival. Recuperado el 14 de febrero del 2014 de: <http://www.nature.com/nm/journal/v9/n12/full/nm1203-1439.html>. *Nature Medicine*. 9.
- Calvert, C., Leifer, C. y MacEwen, G. (1982). Vincristine for treatment of transmissible venereal tumours in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 181.
- Catone, G., Marino, G., Poglayen, G., Gramiccia, M., Ludovisi, A. y Zanghi, A. (2003). Canine Transmissible Venereal Tumour Parasitized by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications*. 27 (7).

- Carteaud, J. (1965). Some Immunological aspects of the transmissible venereal tumour of the dog. *Comparative Physiology Pathology Skin*.
- Cella, M., Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. 9.
- Cheng-Chi, L. et al. (2007). Transient downregulation of monocyte-derived dendritic-cell differentiation, function, and survival during tumoral progression and regression in an in vivo canine model of transmissible venereal tumor. *Cancer Immunol Immunother*. 57.
- Cockrill, J. y Beasley, J. (1975). Ultrastructural characteristics of canine transmissible venereal tumor at various stages of growth and regression. *American Journey of Veterinary Research*. 36 (5).
- Cohen, D. (1972). Detection of humoral antibody to the transmissible venereal tumour of the dog. Publicado en línea el 18 de julio del 2006. *International Journal of Cancer*. 10 (1).
- Cohen, D. (1985). The canine transmissible venereal tumor: A unique result of tumor progression. *Advanced Cancer Research*. 43.
- Crile, G. y Beebe, S. (1908). Transfusion of Blood in the Transplantable Lymphosarcoma of Dogs. *Journal of Medical Research*. 18 (3).
- Das, U., Das, A., Das, D. y Das, B. (1991). Clinical report on the efficacy of chemotherapy in canine transmissible venereal sarcoma. *Indian Veterinary Journal*. 68.
- Das, U. y Das, A. (2000). Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. *Veterinary Research Communications*. 24 (8).

- Deakin, J. et al. (2012). Genomic Restructuring in the Tasmanian Devil Facial Tumour: Chromosome Painting and Gene Mapping Provide Clues to Evolution of a Transmissible Tumour. *PLoS Genetics*. 8 (2).
- Elgue, V., Piaggio, J., Amaral, C. y Pessina, P. (2012). Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer atendidos en el Hospital de la Facultad de Medicina Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria Montevideo*. 48 (187).
- Elmslie, R., Dow, S. y Ogilvie, G. (1991). Interleukins: Biological properties and therapeutic potential. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 5. p. 283 - 293.
- Eze, C., Anyanwu, H. y Kene, R. (2007). Review of canine transmissible venereal tumour (TVT) in dogs. *Nigerian Veterinary Journal*. 28 (19).
- Fallon, R. y Swayne, D. (1984). Canine transmissible venereal tumor: a diagnostic dilemma. *Kongelige Veterinaer- og Landbohøjskole*.
- Ferlazzo, G. et al. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via NKp30 receptor by activated NK cells. *Journal of Experimental Medicine*. 195.
- Flores, E. (1986). Epidemiología del cáncer en el perro y gato. *Monografías de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile*. 8 (2).
- Díaz-Rubio, E. y García-Conde, J. (2000). *Oncología Clínica Básica*. Madrid, España: Arán Ediciones, S.A.
- García, F. (1997). *Fundamentos de Inmunobiología*. México Distrito Federal, México: Universidad Autónoma de México.

- Gimeno, E., Massone, A., Marino, F. e Idiart, J. (1995). Intermediate filament expression and lectin histochemical features of canine transmissible venereal tumour. Publicado en línea el 15 de agosto del 2009. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 103 (7-8).
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Otavalo. (2013). Situación Geográfica. Recuperado el 4 de septiembre del 2014 de: http://www.visitotavalo.com/?page_id=10.
- Gobierno Municipal de Antonio Ante. (2014). Información General. Recuperado el 4 de septiembre del 2014 de: http://www.antonioante.gob.ec/web/?page_id=9
- Gobierno Municipal de Cotacachi. (2009). Parroquias. Recuperado el 4 de septiembre del 2014 de: <http://www.cotacachi.gob.ec/>.
- Grant, M. (2007). Pathology of Domestic Animals. Quinta Edición. Missouri, Estados Unidos: Elsevier, Inc.
- Head, K. (1967). Breed and geographical variations in the occurrence of tumours in domesticated mammals. Pzifer Medical Monographs, Edinburgh UniversityPress. 2
- Hernández-Jáurequi, P., González-Angulo, A. y de la Vega, G. (1973). Ultraestructural and Histochemical Pattern of Regressing Canine Venereal Lymphoma After Cyclophosphamide Treatment. Journal of the National Cancer Institute. 51 (4). p. 1187-1196.
- Higgins, D. (1966). Observations on the canine venereal transmissible tumour as seen in the Bahamas. Veterinary Record. 79 (3).

- Hill, D., Yang, T. y Wachtel, A. (1984). Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Tumor Cell and Infiltrating Leukocyte Ultrastructure at Different Growth Stages. *Veterinary Pathology*. 21.
- Horton, R. (1990). Methotrexate-An immunomodulator with expanding indications. Publicado en línea el 28 de junio del 2008. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 15 (2).
- Hoque, M., Pawde, A. y Singh, G. (1995). Combination chemotherapy in canine transmissible venereal tumour. *Indian Veterinary Journal*. 72.
- Idowu, A. (1977). The chromosomes of the transmissible venereal tumour of dogs in Ibadan, Nigeria. *Research in Veterinary Science*. 22 (3). p. 271-273.
- Idowu, A. (1984). A retrospective evaluation of four surgical methods of treating canine transmissible venereal tumour. *Journal of Small Animal Practice*. 25.
- Idowu, A. (1985). Cryosurgery in canine transmissible venereal tumour. *Tropical Veterian*. 3.
- Instituto Espacial Ecuatoriano. (2013). Memoria Técnica Cantón Antonio Ante: *Proyecto "Generación de Geoinformación para la Gestión del Territorio a Nivel Nacional, Escala 1:25.000"*. Infraestructura y Servicios. p.8
- Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica Antonio Ante, Escala 1:50.000. Recuperado el 16 de septiembre del 2014 de: <http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEII.htm>

Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica Imbabura, Escala 1:50.000. Recuperado el 16 de septiembre del 2014 de: <http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEII.htm>

Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica San Miguel de los Bancos, Escala 1:50.000. Recuperado el 16 de septiembre del 2014 de: http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEII_E3.htm

Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica Pichincha, Escala 1:50.000. Recuperado el 16 de septiembre del 2014 de: <http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEIII.htm>

Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica Otavalo, Escala 1:50.000. Recuperado el 16 de septiembre del 2014 de: http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEII_F1.htm

Instituto Geográfico Militar. (2013). Carta Topográfica Mindo, Escala 1:50.000. Recuperado el 4 de septiembre del 2014 de: http://www.igm.gob.ec/cms/files/cartabase/enie/ENIEIII_A1.htm

Instituto Nacional de Estadística y Censo. (2010). Estructura de la Población. Resultados del Censo 2010 de población y vivienda en el Ecuador, Fascículo Provincial Imbabura. p. 1.

Instituto Nacional de Estadística y Censo. (2010). Estructura de la Población. Resultados del Censo 2010 de población y vivienda en el Ecuador, Fascículo Provincial Pichincha. p. 1.

Kakpakova, E., Pogosyanz, E. y Ponomarkov, V. (1968). Peculiarities of the karyotype of the transmissible sarcoma cells in the dog. Vop. Onkol. 14 (11). p. 43-50.

- Kamen, B. y Winick, N. (1988). High dose methotrexate therapy: Insecure rationale? *Biochemical Pharmacology*. 37 (14).
- Karlson, A. y Mann, F. (1952). The Transmissible Venereal Tumor of Dogs: Observations on Forty Generations of Experimental Transfers.. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 54. p. 1197-1213.
- Kennedy, J., Yang, T. y Allen, P. (1977). Canine Transmissible Venereal Sarcoma: Electron microscopic changes with time after transplantation. *British Journal of Cancer*. 36.
- Kimeto, B. y Mugeru, M. (1974). Transmissible venereal tumour of dog in Kenya. Citado por Das y Das (2000) en *Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma*. *Veterinary Research Communications*. 24 (8).
- Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H. y Hiraoka, M. (2003). Tumor hipoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Sci*. 94 (12). p. 1021 – 1028.
- Latimer, K., Mahaffey, E. y Prasse, K. (2005). *Patología Clínica Veterinaria*. Cuarta Edición. Barcelona, España: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Levy, E. et al. (2006). Nasal and oral masses in the dog. *Veterinary Clinical Pathology*. 35 (1).
- Maiti, S., Roy, S., Ali, S. y Ghosh, R. (1995). Therapeutic management of TVT with vincristine in a dog-case report. *Indian Veterinary Journal*. 72.
- Makino, S. (1963). Some epidemiologic aspects of the venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies. *Annales of the New York Academy of Sciences*. 108. p. 1106-1122.

- Marino, G., Barna, A., Quartuccio, M., Cristarella, S., Ajello, A. y Zhang, A. (2008). Alternative vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumour. *Veterinaria Cremona*. 22 (4). p. 13 – 18.
- Marchal, T., Chabanne, C., Kaplanski, D., Rigal, J. y Magnol, J. (1997). Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 57 (1-2).
- Martínez, M. [entrevistador]. Entrevista personal a Murchison, E. 15 de enero del 2014.
- McAfee, L. y McAfee, J. (1977). Transmissible venereal tumour: surgery and chemotherapy. *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician*. 2.
- McLeod, C. y Lewis, J. (1972). Transmissible venereal tumor with metastases in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 161 (2).
- Meuten, D. (2002). *Tumors in Domestic Animals*. Cuarta Edición. Iowa, Estados Unidos: Iowa State Press.
- Moulton, J. (1990). *Tumours of Domestic Animals*. University of California Press. 3 (10).
- Mozos, E., Méndez, A., Gómez-Villamandos, J., Martín de las Mulas, J. y Pérez, J. Immunohistochemical Characterization of Canine Transmissible Venereal Tumor. *Veterinary Pathology*. 33.
- Murchison, E. (2009). Clonally transmissible cancers in dogs and Tasmanian devils. *Oncogene*. 27 (S19-S30).

- Murchison, E., Tovar, C., Hsu, A., Bender, H., Pouya, K., Rebbeck, C., Obendorf, D., Conlan, C., Bahlo, M., Blizzard, C., Pyecroft, S., Kreiss, A., Kellis, M., Stark, A., Harkins, T., Marshall, J., Woods, G., Hannon, G. y Pappenfuss, A. (2010). The Tasmanian Devil Transcriptome Reveals Schwann Cell Origins of a Clonally Transmissible Cancer. *Science*. 327 (5961).
- Murchison, E. et al. (2011). Genome Sequencing and Analysis of the Tasmanian Devil and Its Transmissible Cancer. *Cell*. 148.
- Murchison, E. et al. (2014). Transmissible Dog Cancer Genome Reveals the Origin and History of an Ancient Cell Lineage. Recuperado el 18 de abril del 2014 de: <http://www.sciencemag.org/content/343/6169/437>. *Science*. 343 (6169).
- Murray, M., James, Z., y Martin, W. (1969). A study of the cytology and karyotype of the canine transmissible venereal tumour. *Research in veterinary science*. 10 (6).
- Mukaratirwa, S., Chimonyo, M., Obwolo, M., Gruys, E. y Nederbragt, H. (2004). Stromal cells and extracellular matrix components in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. *Histology and Histopathology*. 19 (4).
- Mukaratirwa, S., Chiwome, T., Chitanga, S., y Bhebhe, E. (2006). Canine Transmissible Venereal Tumour: Assesment of Mast Cell Numbers as Indicators of the Growth Phase. *Veterinary Research Communications*. 30.
- Nimura, F. et al. (2006). Cross-linking cell surface chemokine receptors leads to isolation, activation and differentiation of monocytes into potent dendritic cells. *Experimental Biology and Medicine*. 231.

- Nowinsky, M. (1876). ZurFrageuber die impfung der Krebsigengeschulste. Citado en: Review of Canine Transmissible Venereal Sarcoma. Veterinary Research Communications. 24 (8).
- O'Neill, I. (2011). Concise Review: Transmissible Animal Tumors as Models of the Cancer Stem-Cell Process. StemCells. 29.
- Ogilvie, G. y Moore, A. (2008). Manejo del Paciente Canino Oncológico: Guía práctica para la atención compasiva. Buenos Aires, Argentina: Intermédica Editorial.
- Onishi, H. et al. (2004). Monocyte-derived dendritic cells that capture dead tumor cells secrete IL-12 and TNF-alpha through IL-12/TNF-alpha/NF-kappa B autocrine loop. Cancer Immunol Immunother. 53.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). Datos y Cifras sobre el Cáncer. Recuperado el 14 de febrero del 2014 de: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Oshimura, M., Sasaki, M. y Makino, S. (1973). Chromosomal Banding Patterns in Primary and Transplanted Venereal Tumors of the Dog. Journal of the National Cancer Institute. 51 (4). p. 1197-1203.
- Osipov, N. y Golubeva, V. (1976). Diagnosis and treatment of transmissible sarcoma. Veterinariia. 7.
- Owen, L. (1991). Identifying and treating cancer of geriatric dogs. Journal of Veterinary Medicine. 88.

- Pandey, S., Dhawedkar, R. y Patel, M. (1977). Canine transmissible venereal sarcoma: Clinical trial with autogenous formolized vaccine. *Indian Veterinary Journal*. 54.
- Pandey, S., Chandpuria, V., Bhargava, M. y Tiwari, S. (1989). Incidence, treatment, approach and metastasis of canine venereal sarcoma. *Indian Journal of Animal Sciences*. 59.
- Pérez, L., Vergara, K., Ventura, J. y Letelier, I. (1978). Tratamiento quirúrgico y quimioterapico del tumor venéreo transmisible de localización nasal en caninos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 10 (2).
- Prefectura de Imbabura. (2014). Datos Generales. Recuperado el 13 de septiembre del 2014 de: <http://www.imbabura.gob.ec/imbabura/datos-generales.html>.
- Prier, J. y Johnson, J. (1964). Malignancy in a canine transmissible venereal tumour. *Journal of the American Veterinary Association*. 145.
- Powers, R. (1968). Immunologic properties of canine transmissible venereal sarcoma. *American Journal of Veterinary Research*. 29.
- Randolph, J., Stokol, T., Scarlett, J. y MacLeod, J. (2004). Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronical renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18 (1). p. 81 – 91.
- Raskin, R. y Meyer, D. (2009). *Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide*. Segunda Edición. Missouri, Estados Unidos: Elsevier, Inc.

- Rogers, K., Walker, M. y Dillon, H. (1998). Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 34.
- Ross, M. y Pawlina, W. (2006). *Histología: texto y atlas con biología celular y molecular*. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Rust, J. (1949). Transmissible lymphosarcoma in the dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 114 (862).
- Said, R., Silva, L., Albuquerque, A., Sousa-Neta, E. y Lavinsky, M. (2009). Efficacy and side effects of vincristine sulphate treatment on canine transmissible venereal tumour. *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009*.
- Sandusky, G., Carlton, W. y Wightman, K. (1987). Diagnostic Immunohistochemistry of Canine Round Cell Tumors. *Veterinary Pathology*. 24.
- Singh, J., Rana, J., Pangawkar, P. y Gupta, P. (1996). Clinico-pathological studies on the effect of different anti-neoplastic chemotherapy regimens on transmissible venereal tumours in dogs. *Veterinary Research Communications*. 20 (1).
- Sofuni, T. y Makino, S. (1963). A supplementary study on the chromosomes of venereal tumors of the dog. *Gann*. 54.
- Sticker, A. (1906). Transplantables Rundzellensarkom de Hundes. *Zeitschrift für Krebsforschung*. 4 (2).

- Strakova, A. (2013). The global distribution and epidemiological features of Canine Transmissible Venereal Tumour. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Cambridge. Cambridgeshire, Reino Unido.
- Strakova, A. y Murchison, E. (2014). The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. BMC Veterinary Research. 10. 168
- Stubbs, E. y Furth, M. (1934). Experimental Studies on Venereal Sarcoma of the Dog. The American Journal of Pathology. 10 (2).
- Sytkowski, A. (2007). Does erythropoietin have a dark side? EPO signaling and cancer cells. Recuperado el 14 de febrero del 2014 de: <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans;2007/395/pe38>. Science's Signal Transduction Knowledge Environment. 2007 (395).
- Theilen, G. y Madewell, B. (1987). Veterinary Medicine. Clinical Application of Cancer Chemotherapy. Filadelfia, Estados Unidos: Lea and Febiger.
- Thrall, D. (1998). Orthovoltage radiotherapy of canine transmissible venereal tumors. Veterinary Radiology. 23.
- Thorburn, M., Gwynn, R., Ragbeer, M. y Lee, B. (1968). Pathological and Cytogenetic observations on the naturally occurring Canine Venereal Tumour in Jamaica (*Sticker's Tumour*). British Journal of Cancer. 22 (4).
- Tourkova, I. et al. (2005). Restoration by IL-15 of MHC class I antigen-processing machinery in human dendritic cells inhibited by tumor-derived gangliosides. J Immunol. 175.
- Tuntinovich, P. (1983). Chemotherapeutic treatment of transmissible venereal tumour. Thai Journal of Veterinary Medicine. 13.

- Valenciano, A. y Cowell, R. (2013). *Diagnostic Cytology and Haematology of the Dog and Cat*. Cuarta Edición. Missouri, Estados Unidos: Elsevier, Inc.
- Wasecki, A. y Mazur, O. (1977). *Use of vinblastine in the treatment of Sticker's transmissible venereal tumours*. *Medycyna Westernaryjna* 33.
- Weber, W., Nowell, P. y Hare, W. (1965). Chromosome studies of a transplanted and a primary canine venereal sarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 35 (3).
- Welsh, J. (2011). Contagious Cancer. *The Oncologist*. 16
- Wright, D., Peel, S., Cooper, E. y Hughes, D. (1970). Transmissible venereal sarcoma of dogs. A histochemical and chromosomal analysis of tumours in Uganda. *European Journal of Clinical and Biological Research*. 15. p. 155-160.
- Yang, T., Chandler, J. y Dunne-Anway, S. (1987). Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. *Machmillan Press*. 55.
- Yasuo, et al. (2013). Meta-analysis of epoietin beta and darbepoietinalfa treatment for chemotherapy-induced anemia and mortality: Individual patient data from Japanese randomized, placebo-controlled trials. *CancerScience*. 104 (4). p. 481 – 485.

ANEXOS

Anexo 1: Creación de registros y valoración clínica de caninos



Anexo 1, Figuras 1 y 2.- Realización de registro de animales y examen clínico, antes y después de la cirugía de esterilización por parte de la autora del trabajo de investigación. Fotos cortesía: PAE-Ibarra.

Pae		PROTECCIÓN ANIMAL ECUADOR		FICHA DE ESTERILIZACIÓN	
Fecha:	12/09/2019	No de Ficha:	28	ID.	
Datos del Propietario					
Nombre y Apellido:			C.I / Pasaporte:		
Blanca			100		
Teléfono:			Dirección:		
0997			Cotacachi		
Datos de la Mascota					
Nombre:		Especie:		Raza:	
Maya		Canino		Gran Danes	
Sexo:		Edad:		Peso:	
F		5 años			
Anamnesis:					
Revisar Vulva.					

Anexo 1, Figura 3.- Ficha de registro utilizada durante las Jornadas de Esterilización.

Cortesía: PAE-Ibarra

- La figura muestra solo una sección de la ficha correspondiente a los datos del canino y su propietario.
- El animal presentaba una masa extraña en la vulva que posteriormente fue diagnosticada como TVT.



Anexo 1, Figura 4.- Evaluación clínica profunda posterior sospecha de TVT.

Anexo 2.- Registro de datos y constantes fisiológicas evaluadas en los caninos de los Grupos 1, 2 y 3 respectivamente

Código	Nombre	Cantón	Fecha	Peso Kg	Raza	Sexo	Edad	Estado Rep	Prop.	T. Rectal	Mucosas	FC
T001	Conchita	Antonio Ante	05/08/2014	26 Kg.	Pastor Alemán	H	6 años	Entera	si	39,2	Rosadas	150
T003	Desconocido	Otavaló	08/08/2014	14 Kg.	Mestiza	H	> 10 años	Desconocido	No	37,9	Rosa Pálido	132
T004	Suko Suarez	Antonio Ante	14/08/2014	12Kg.	Mestizo	M	6 años	Entero	Si	38,7	Rosadas	140
T005	Chiripa	Cotacachi	15/08/2014	3 Kg	French Poodle	H	5 años	Entera	Si	37,7	Pálidas	155
T006	Desconocido	Cotacachi	15/08/2014	13.6 Kg	Mestiza	H	> 10 años	Entera	Si	39,9	Rosadas	148
T007	Desconocido	Cotacachi	17/08/2014	23 Kg	Mestiza	H	4 años	Desconocido	No	38,5	Rosadas	143
T008	Maya	Cotacachi	18/08/2014	28 Kg	Weimaranner	H	4 años	Entera	Si	38,8	Rosadas	146
T009	Laika	Cotacachi	21/08/2014	15 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	37,9	Rosadas	145
T010	Pequitas	Antonio Ante	24/10/2014	5 Kg.	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Desc.	38,9	Pálidas	140
T011	Rocky	Cotacachi	24/10/2014	10 Kg.	Mestizo	M	3 años	Entero	Si	38,3	Rosadas	96
T012	Goofy	Cotacachi	24/10/2014	7 Kg.	Mestizo	M	1 a 4 m	Entero	Si	37,5	Rosadas	56

Código	RR	Linfonodos	L. Dermatológicas	Óculo nasal	R. Tusígeno	R. Deglutorio
T001	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T003	Normal	Poplíteos +	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T004	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T005	Normal	Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T006	Normal	No reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T007	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente

T008	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
T009	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
T010	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
T011	Normal	No Reactivos	DAPP	Nada	Ausente	Presente
T012	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente

Código	Nombre	Lugar	Fecha	Peso	Raza	Sexo	Edad	Estado Rep.	Propietario	T. Rectal	Mucosas	FC
C001	Desconocido	Otavaló	08/08/2014	14 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	38,7	Rosadas	144
C002	Barby	Otavaló	08/08/2014	18.3 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	38,4	Rosadas	135
C003	Lacy	Otavaló	08/08/2014	22.2 Kg	Mestiza	H	3 años	Esterilizada	Si	38	Rosadas	136
C004	Lacy	Otavaló	08/08/2014	24.1 Kg.	MESTIZA	H	2 años	Esterilizada	Si	38,6	Rosadas	135
C005	Wicha	Otavaló	08/08/2014	17.4 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,2	Rosadas	140
C006	Princesa	Otavaló	08/08/2014	7.3 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	38,5	Rosadas	140
C007	Pinina	Otavaló	08/08/2014	13.3 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	37,6	Rosadas	136
C008	Maya	Otavaló	08/08/2014	19.6 Kg.	Mestiza	H	3 años	Esterilizada	Si	38,6	Rosadas	145
C009	Gaby	Otavaló	08/08/2014	13.2 Kg.	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Si	37,5	Rosadas	135
C010	Chiqui	Otavaló	08/08/2014	8.4 Kg.	Mestiza	H	11 meses	Esterilizada	Si	38,8	Rosadas	138
C011	Sharik	Otavaló	08/08/2014	15.4 Kg.	Shar Pei	H	2 años	Esterilizada	Si	38	Rosadas	136
C012	Yani	Otavaló	08/08/2014	18.5 Kg.	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Si	38,1	Rosadas	140
C013	Puchi	Otavaló	08/08/2014	7.9 Kg.	Mestizo	M	4 años	Castrado	Si	38,5	Rosadas	142
C014	Mariposa	Otavaló	08/08/2014	12.1 Kg	Mestiza	H	7 años	Esterilizada	Si	37,9	Rosadas	142
C015	Tomasa	Otavaló	08/08/2014	13.5 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,7	Rosadas	138
C016	Princesa	Otavaló	08/08/2014	26.7 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38	Rosadas	134
C017	Kiruba	Otavaló	08/08/2014	13.5 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,8	Rosadas	136
C018	Abril	Otavaló	08/08/2014	17.3 Kg.	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Si	38,2	Rosadas	142

C019	Yoko	Otavaló	08/08/2014	11.7 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,5	Rosadas	139
C020	Rosario	Otavaló	08/08/2014	9.3 Kg	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	37,9	Rosadas	140
C021	Moka	Otavaló	08/08/2014	16.4 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,8	Rosadas	140
C023	Luli	Cotacachi	15/08/2014	16.3 Kg.	Mestiza	H	4 años	Esterilizada	Si	38,6	Rosadas	136
C024	Blacky	Cotacachi	15/08/2014	17.5 Kg.	Mestizo	M	4 años	Castrado	Si	38,5	Rosadas	138
C025	Mac	Cotacachi	15/08/2014	20.5 Kg	Mestizo	M	5 años	Castrado	Si	37,9	Rosadas	140
C026	Negro	Cotacachi	15/08/2014	11.5 Kg.	Mestizo	M	2 años	Castrado	Si	38,4	Rosadas	135
C027	Canela	Cotacachi	15/08/2014	14.3 Kg.	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	38,3	Rosadas	136
C028	Jhina	Cotacachi	15/08/2014	15.1 Kg.	Mestiza	H	6 años	Esterilizada	Si	38,1	Rosadas	132
C029	Kika	Cotacachi	15/08/2014	12.5 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	38,1	Rosadas	136
C030	Desconocido	Cotacachi	15/08/2014	13 Kg.	Mestiza	H	4 años	Esterilizada	Si	37,9	Rosadas	138
C031	Desconocido	Cotacachi	15/08/2014	14.1 Kg.	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	38,2	Rosadas	140

Código	RR	Linfonodos	L. Dermatológicas	Óculo nasal	R. Tusígeno	R. Deglutorio
C001	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C002	Normal	No Reactivos	Pulgás	Nada	Ausente	Presente
C003	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C004	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C005	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C006	Normal	No Reactivos	Pulgás	Nada	Ausente	Presente
C007	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C008	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C009	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C010	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente

C011	Normal	No Reactivos	Normal	Entropión	Ausente	Presente
C012	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C013	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C014	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C015	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
C016	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C017	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C018	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
C019	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C020	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C021	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C023	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C024	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C025	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C026	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C027	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C028	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C029	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C030	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
C031	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente

Código	Nombre	Lugar	Fecha	Peso	Raza	Sexo	Edad	Estado Rep.	Propietario	T. Rectal	Mucosas	FC
M001	Max	Los Bancos	05/10/2014	23.6 Kg	Mestizo	M	15 años	Castrado	Si	38.7	Rosadas	48
M003	Nobel	Los Bancos	05/10/2014	28 Kg	Mestizo	M	1 a 6 m	Castrado	Si	38.5	Rosadas	96
M004	Lobo	Los Bancos	05/10/2014	17.4 Kg	Mestizo	M	1 a 6 m	Castrado	Si	38.4	Rosadas	80
M005	Mia	Los Bancos	05/10/2014	13 Kg	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	39	Rosadas	104
M006	Linda	Los Bancos	05/10/2014	20 Kg	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	39.1	Rosadas	104
M007	Blacky	Los Bancos	05/10/2014	25.8 Kg	Mestizo	M	> 10 años	Castrado	Si	38.2	Rosadas	124
M008	Chantal	Los Bancos	05/10/2014	30.7 Kg	Boxer	H	8 años	Esterilizada	Si	38.8	Rosadas	108
M009	Mimi	Los Bancos	05/10/2014	29 Kg	Mestiza	H	5 años	Esterilizada	Si	39.1	Rosadas	76
M010	Chirimoya	Los Bancos	05/10/2014	15.3 Kg	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Si	38.4	Rosadas	88
M011	Lily	Los Bancos	05/10/2014	14.9 Kg	Mestiza	H	2 años	Esterilizada	Si	38.7	Rosadas	104
M012	Pipa	Los Bancos	05/10/2014	18,6 Kg	Mestiza	H	1 año	Esterilizada	Si	39.2	Rosadas	144
M013	Visky	Los Bancos	05/10/2014	27.7 Kg	Boxer	H	1 a 6 m	Entera	Si	38.2	Rosadas	140
M014	Nena	Los Bancos	05/10/2014	13.9 Kg	Mestiza	H	4 años	Esterilizada	Si	38.6	Rosadas	116
M015	Ashiry	Los Bancos	05/10/2014	32 Kg	Pitbull	H	2 años	Esterilizada	Si	39	Rosadas	92

Código	RR	Linfonodos	L. Dermatológicas	Óculo nasal	R. Tusígeno	R. Deglutorio
M001	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M003	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M004	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M005	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
M006	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M007	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M008	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente

M009	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M010	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M011	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M012	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
M013	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente
M014	Normal	No Reactivos	Pulgas	Nada	Ausente	Presente
M015	Normal	No Reactivos	Normal	Nada	Ausente	Presente

Anexo 2, Tabla 2.- Registro de datos tumorales caninos Grupo 1

Código	Nombre	Fecha	Dimensiones Tumor (cm)					Localización	Masas Secundarias
			Alto	Ancho	Profundidad	Área (cm ²)	Volumen (cm ³)		
T001	Conchita	05/08/2014	7	7	11	49	539	Vagina	No
T003	Desconocido	08/08/2014	12	7	6	84	504	Vulva y Vagina	No
T004	Suko Suarez	14/08/2014	5	4,5	5	22,5	112,5	Base pene	No
T005	Chiripa	15/08/2014	6	8	7	48	336	Vagina	No
T006	Desconocido	15/08/2014	6	6,5	7	39	273	Vagina	No
T007	Desconocido	17/08/2014	6	6	5,8	36	208,8	Vagina	No
T008	Maya	18/08/2014	8,5	6	7	51	357	Vagina y Vulva	No
T009	Laika	21/08/2014	5,9	4,5	4,5	26,55	119,5	Vagina y Vulva	No
T010	Pequitas	24/10/2014	11	5	7	55	385	Vagina y Gl. Perianal	No
T011	Rocky	24/10/2014	2,5	1	1	2,5	2,5	Glande	No
T012	Guffy	24/10/2014	0,5	1,5	0,5	0,75	0,38	Glande	No

Secreciones	Observaciones
Sangre	Vulva intacta
Sangre, Pus	Genitales desfigurados
Sangre	Prepucio intacto, dificultad en protruir el pene
Sangre	Vulva intacta, afectación uretra
Sangre	Vulva intacta, ligera exteriorización
Sangre	Vulva intacta, ligera exteriorización, afectación uretra
Sangre	Desfiguración genital, exteriorización
Sangre	Desfiguración genital, exteriorización
Sangre, Pus	Exteriorización
Sangre	Prepucio intacto, dificultad en protruir el pene
Sangre, Esmegma	Prepucio intacto

Anexo 3: Toma y procesamiento de muestras



Anexo 3, Figura 5.- Toma de muestra sanguínea yugular.



Anexo 2, Figura 6.- Hisopado genital.



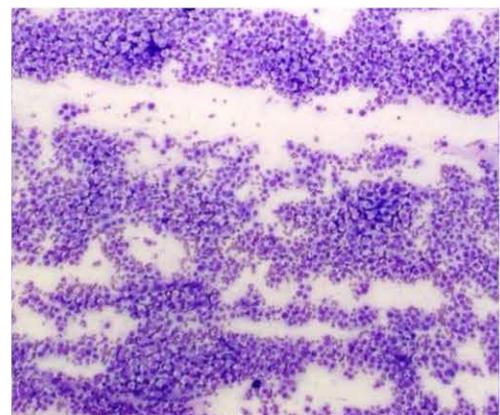
Anexo 3, Figura 7.- Lectura de microhematocrito Grupo 3.



Anexo 3, Figura 8.- Frotis genitales pert



Anexo 3, Figura 9.- Confirmación citológica de casos sospechosos en la Clínica Veterinaria Universidad de las Américas.



Anexo 3, Figura 10.- Frotis perteneciente a canina T006. Tinción Diff-Quick®. Aumento 100X. Se puede observar una gran cantidad de células características de T



Anexo 3, Figura 11.- Separación de muestras destinadas a histopatología.



Anexo 3, Figura 12.- Creación de nuevas alícuotas de suero sanguíneo.



Anexo 3, Figura 13.- Alícuotas de suero sanguíneo.



Anexo 3, Figura 14.- Kit para medición de EPO sérica mediante RIA.



Anexo 3, Figura 15.- Tubos de inmuno ensayo con muestras de suero sanguíneo y yodo radiactivo.

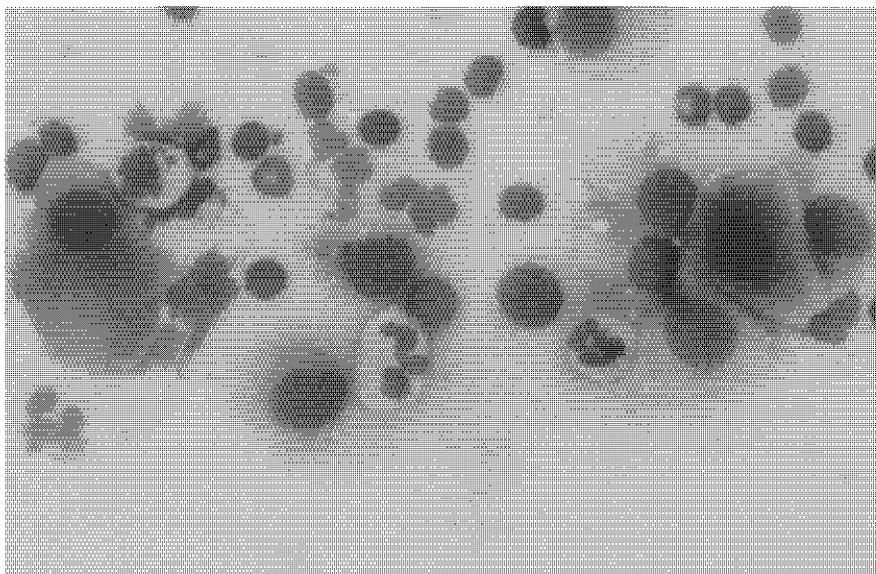


Anexo 3, Figura 16.- Separación de sobrenadantes previa lectura en gamma contador.



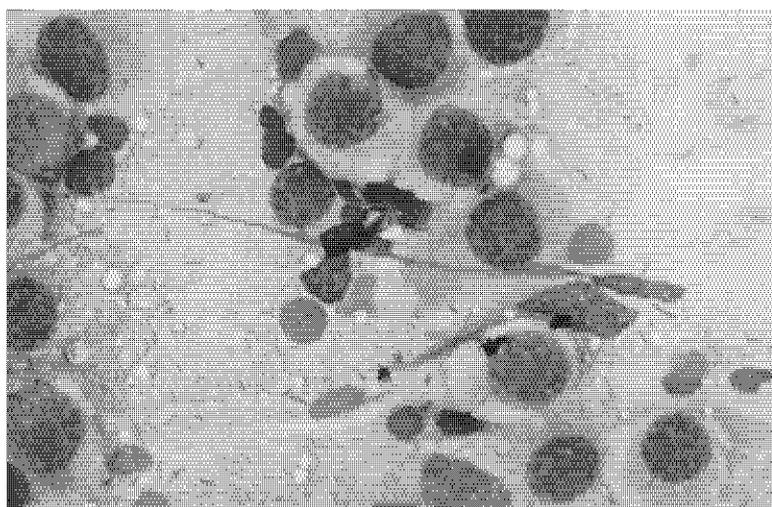
**Anexo 3, Figura 15.- Gamma contador y muestras
previa medición de radiactividad.**

Anexo 4: Resultados citológicos e histopatológicos



Anexo 4, Figura 19.- Citología perteneciente a canina T003. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400X.

a. A parte de la visualización de células características de TVT localizadas a la derecha de la fotografía, se pueden observar diplococos en el interior de un neutrófilo localizado en la región superior izquierda.



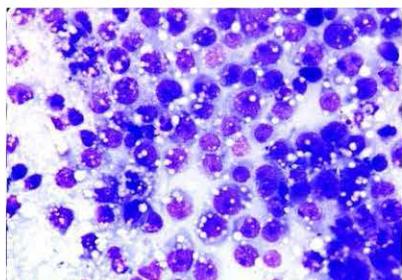
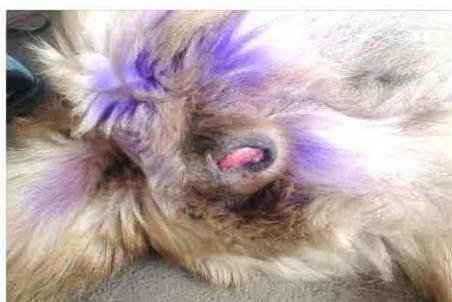
Anexo 4, Figura 20.- Citología perteneciente a canina T006. Hisopado genital. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400x.

a. Es posible observar la presencia de espiroquetas rodeando a todas las células características de TVT.

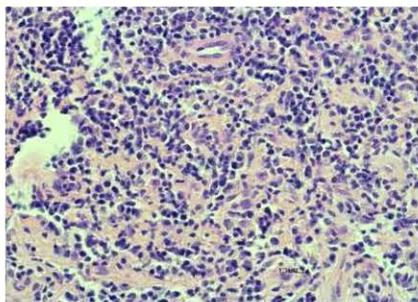
Anexo 5.- Fichas clínicas de los caninos positivos a TVT.

Para un mejor entendimiento de la información expuesta en las fichas, a continuación se encuentra un listado de contracciones y abreviaturas utilizadas en las mismas.

Estado Repr. = Estado Reproductivo	RC= Ritmo Cardíaco
Estado Repr. Ester. = Estado Reproductivo Esterilizada	FR = Frecuencia Respiratoria
Prop. = Propietario	RR = Ritmo Respiratorio
% Dh = % Deshidratación	Conc. = Estado de Conciencia
Mucosas Ro = Mucosas Rosadas	RT = Reflejo Tusígeno
Mucosas Pa = Mucosas Pálidas	RD= Reflejo Deglutorio
Linf. = Nódulos Linfáticos	Nor. = Normal
Linf. NR = Nódulos Linfáticos No Reactivos	lpm = Latidos por minuto
Linf. + = Nódulos Linfáticos Reactivos	rpm= Respiraciones por minuto
Linf. Pop + = Nódulos Linfáticos Poplíteos Reactivos	VCM = Volumen corpuscular/celular medio
FC = Frecuencia Cardíaca	HCM = Hemoglobina corpuscular/celular media
	CCMH = Concentración celular media de hemoglobina



Citología Impronta Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T001

Lugar: Antonio Ante, Imbabura

Peso: 26 Kg. **CC:** 3

Edad: 6 a

Estado Repr.: Entera

Prop.: Si

T. Rectal: 39,2°C

% Dh: 5

Mucosas: Ro

Linf.: NR

FC: 150 lpm

RC: Normal

FR: 46 rpm

RR: Normal

Óculo- Nasal: Nor.

Conc.: Alerta

RT: Ausente

RD: Presente

Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Vagina y Cérvix

Volumen tumor: 539 cc³

Secreciones: Sangre

Ulceraciones: No

Masas Secundarias: No

Eritrocitos: 5,32 x 10⁶ mm³

Hemoglobina: 11,3 g/dL

Hematocrito: 37,6 %

VCM: 70,7 um³

HCM: 25,2 pg

CCMH: 30 g/dL

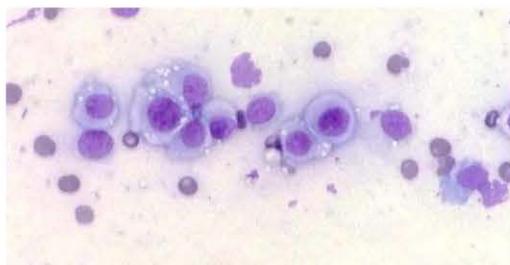
Concentración EPO:

27 mUI/ml

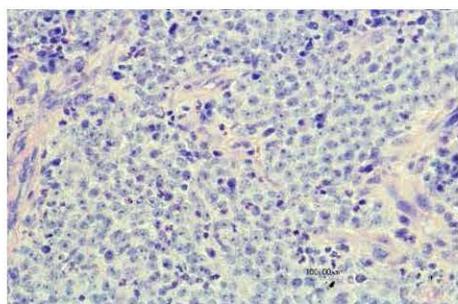
Observaciones:

Ausencia de lesiones en vulva.

LINE-MYC negativo



Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T003

Lugar: Otavalo, Imbabura
Peso: 14 Kg. **CC:** 4 **Edad:** > 10 a
Estado Repr: Desc. **Prop.:** No
T. Rectal: 39,2°C **% Dh:** 6
Mucosas: Pa **Linf:** Pop. +
FC: 132 lpm **RC:** Arritmia
FR: 40 rpm **RR:** Normal
Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Vulva, vagina y cérvix
Volumen tumor: 504 cc³

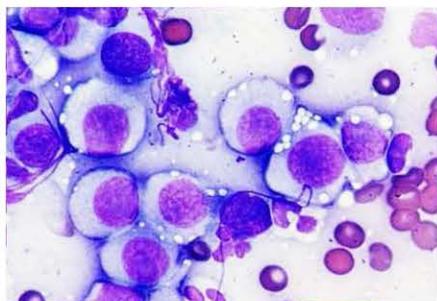
Secreciones: Sangre, pus

Ulceraciones: Si
Masas Secundarias: No

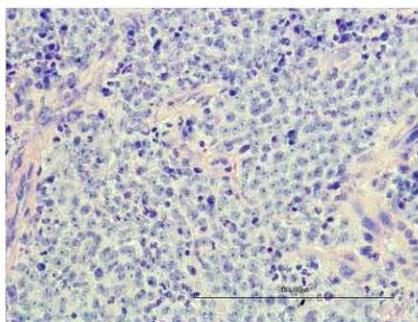
Eritrocitos: 7,48 x 10⁶ mm³
Hemoglobina: 11,9 g/dL
Hematocrito: 39,6 %
VCM: 53 um³
HCM: 16 pg
CCMH: 30,2 g/dL

Concentración EPO:
 29 mUI/ml

Observaciones:
 Tejido necrótico en tumor, hemorragia constante, desfiguración genital.
 LINE-MYC positivo



Citología Hisopado Genital. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T004

Lugar: Antonio Ante, Imbabura
Peso: 12 Kg. **CC:** 5 **Edad:** 6 a
Estado Repr.: Entero **Prop.:** Si
T. Rectal: 38,7°C **% Dh:** 5
Mucosas: Ro **Linf.:** NR
FC: 140 lpm **RC:** Normal
FR: 35 rpm **RR:** Normal
Óculo- Nasal: Nor. **Conc:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Cuerpo pene
Volumen tumor: 112,5 cc³

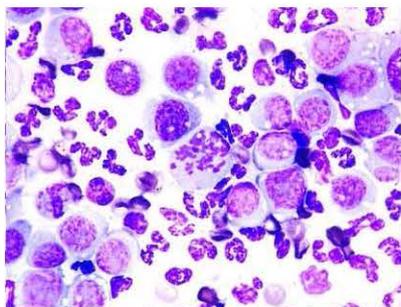
Secreciones: Sangre

Ulceraciones: No
Masas Secundarias: No

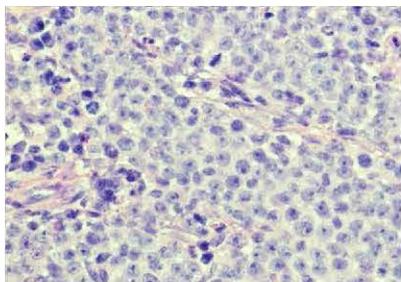
Eritrocitos: 5,5 x 10⁶ mm³
Hemoglobina: 15,9 g/dL
Hematocrito: 50 %
VCM: 90,91 um³
HCM: 27,82 pg
CCMH: 30,6 g/dL

Concentración EPO:
 13,5 mUI/ml

Observaciones:
 Dificultad para protruir el pene, prepucio libre de lesiones.
 LINE-MYC positivo



Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T005

Lugar: Cotacachi, Imbabura
Peso: 3 Kg. **CC:**2 **Edad:** 5 a
Estado Repr.: Entera **Prop.:** Si
T. Rectal: 37,7°C **% Dh:** 7
Mucosas: Pa **Linf.:** +
FC: 155 lpm **RC:** Arritmia
FR: 47 rpm **RR:** Normal

Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Vagina

Volumen tumor: 336 cc³

Secreciones: Sangre

Ulceraciones: No

Masas Secundarias: No

Eritrocitos: 6,9 x 10⁶ mm³

Hemoglobina: 11,4 g/dL

Hematocrito: 35,1 %

VCM: 51 um³

HCM: 16,6 pg

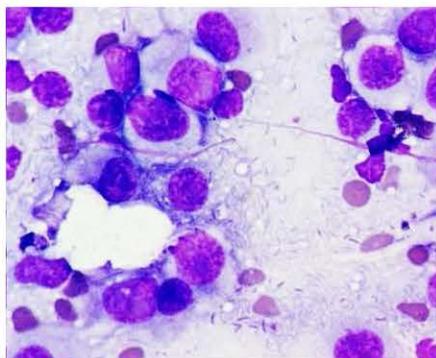
CCMH: 32,5 g/dL

Concentración EPO:

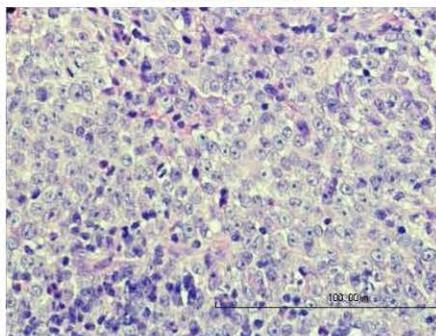
37 mUI/ml

Observaciones:

Vulva libre de lesiones, orificio uretral comprometido.
 LINE-MYC positivo



Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T006

Lugar: Cotacachi, Imbabura
Peso: 13,6 Kg. **CC:** 5 **Edad:** >10 a
Estado Rep.: Entera **Prop.:** Si
T. Rectal: 39,9°C **% Dh:** 5
Mucosas: Ro **Linf.:** NR
FC: 148 lpm **RC:** Arritmia
FR: 44 rpm **RR:** Normal

Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Vagina
Volumen tumor: 273 cc³

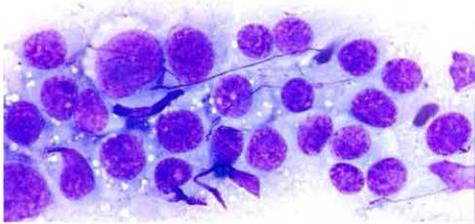
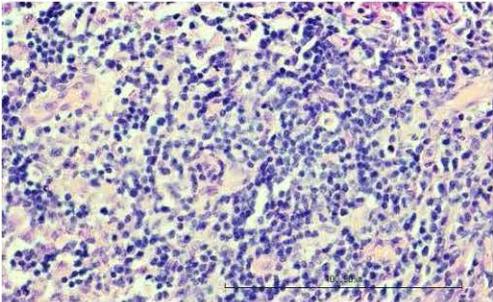
Secreciones: Sangre

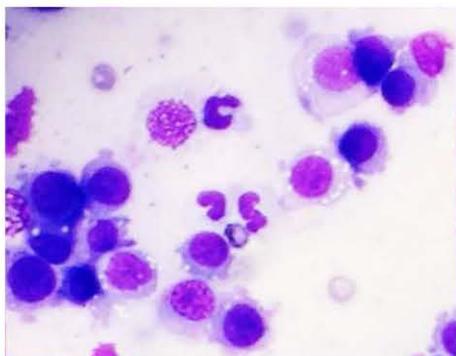
Ulceraciones: No
Masas Secundarias: No

Hemoglobina: 13,6 g/dL
Hematocrito: 41,9 %
VCM: 47 um³
HCM: 15,2 pg
CCMH: 32,5 g/dL

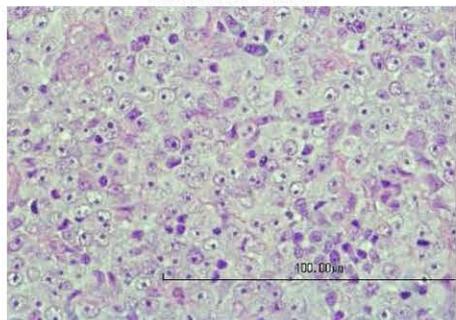
Concentración EPO:
 31 mUI/ml

Observaciones:
 Presencia de espiroquetas en frotis genital, sugerente a infección venérea.
 Vulva libre de lesiones.
 LINE-MYC positivo

	<p>Código: T007</p> <p>Lugar: Cotacachi, Imbabura</p> <p>Peso: 23 Kg. CC: 6 Edad: 4 años</p> <p>Estado Repr.: Desc. Prop.: No</p> <p>T. Rectal: 38,5°C % Dh: 5</p> <p>Mucosas: Ro Linf.: NR</p> <p>FC: 143 lpm RC: Normal</p> <p>FR: 39 rpm RR: Normal</p> <p>Óculo- Nasal: Norm. Conc.: Alerta</p> <p>RT: Ausente RD: Presente</p> <p>Evaluación Dermatológica: Pulgas</p>
	<p>Localización tumor: Vagina</p> <p>Volumen tumor: 208,8 cc³</p> <p>Secreciones: Sangre</p> <p>Ulceraciones: No</p> <p>Masas Secundarias: No</p>
	<p>Eritrocitos: 5,2 x 10⁶ mm³</p> <p>Hemoglobina: 14,4 g/dL</p> <p>Hematocrito: 47 %</p> <p>VCM: 90,38 um³</p> <p>HCM: 27,69 pg</p> <p>CCMH: 30,64 g/dL</p>
<p>Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®. Aumento 400X.</p>	<p>Concentración EPO: 17,7 mUI/ml</p>
	<p>Observaciones: Vulva libre de lesiones, uretra comprometida. LINE-MYC negativo</p>
<p>Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E. Aumento 400X.</p>	



Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T008

Lugar: Cotacachi, Imbabura
Peso: 28 Kg. **CC:** 6 **Edad:** 4 a
Estado Repr.: Entera **Prop.:** Si
T. Rectal: 38,8°C **% Dh:** 5
Mucosas: Ro **Linf.:** NR
FC: 146 lpm **RC:** Normal
FR: 36 rpm **RR:** Normal

Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Normal

Localización tumor: Vagina y vulva
Volumen tumor: 357 cc³

Secreciones: Sangre

Ulceraciones: Si

Masas Secundarias: No

Eritrocitos: 4,7 x 10⁶ mm³

Hemoglobina: 14,3 g/dL

Hematocrito: 42 %

VCM: 89,36 µm³

HCM: 30,43 pg

CCMH: 34,05 g/dL

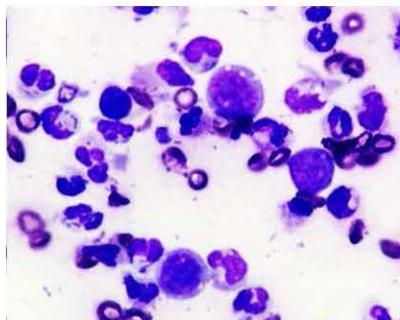
Concentración EPO:

25 mUI/ml

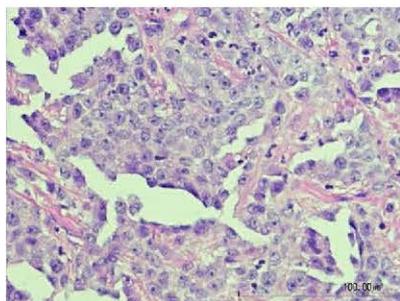
Observaciones:

Desfiguración genital.

LINE-MYC positivo



Citología Hisopado Vaginal. Tinción Diff-Quick®.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T009

Lugar: Cotacachi, Imbabura
Peso: 15 Kg. **CC:** 5 **Edad:** 5 a
Estado Repr: Ester. **Prop.:** Si
T. Rectal: 37,9°C **% Dh:** 5
Mucosas: Ro **Linfonodos:** NR
FC: 145 lpm **RC:** Normal
FR: 40 rpm **RR:** Normal

Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Normal

Localización tumor: Vagina y vulva
Volumen tumor: 119,5 cc³

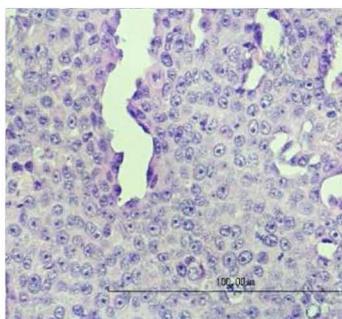
Secreciones: Sangre

Ulceraciones: No
Masas Secundarias: No

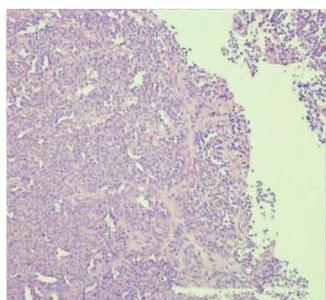
Eritrocitos: 6,1 x 10⁶ mm³
Hemoglobina: 18,5 g/dL
Hematocrito: 56 %
VCM: 91,8 um³
HCM: 30,33 pg
CCMH: 33,04 g/dL

Concentración EPO:
 28 mUI/ml

Observaciones:
 Desfiguración genital.
 LINE-MYC positivo



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 100X.

Código: T010

Lugar: Antonio Ante, Imbabura

Peso: 5 Kg. **CC:** 2

Edad: 2 años

Estado Repr.: Ester.

Prop.: Si

T. Rectal: 38,9°C

% Dh: 7

Mucosas: Pa

Linf.: +

FC: 140 lpm

RC: Normal

FR: 33 rpm

RR: Normal

Óculo-Nasal: Nor.

Conc.: Alerta

RT: Ausente

RD: Presente

Evaluación Dermatológica: Pulgas

Localización tumor: Vagina, cérvix y gl. perianal

Volumen tumor: 385 cc³

Secreciones: Sangre, pus

Ulceraciones: Si

Masas Secundarias: No

Eritrocitos: 5,73 x 10⁶ mm³

Hemoglobina: 10,5 g/dL

Hematocrito: 34,1 %

VCM: 59 um³

HCM: 18,4 pg

CCMH: 30,9 g/dL

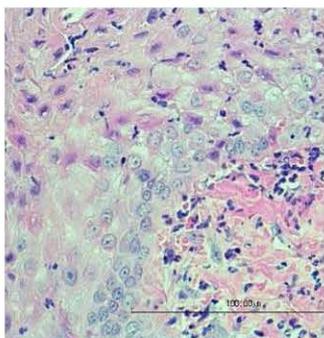
Concentración EPO:

31 mUI/ml

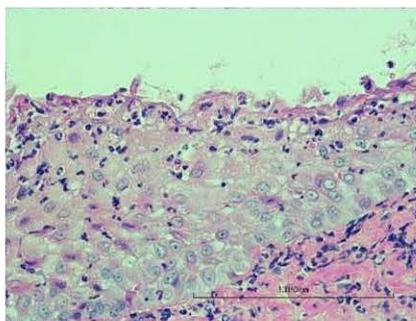
Observaciones:

Larvas de mosca presentes en el tumor, exteriorización y desfiguración genital. El animal se encuentra en tratamiento con remisión tumoral satisfactoria

LINE-MYC positivo



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.



Corte histológico mucosa tumoral. Tinción H&E.
Aumento 400X.

Código: T012

Lugar: Cotacachi, Imbabura
Peso: 7 Kg. **CC:** 5 **Edad:** 1 a
Estado Repr.: Entero **Prop.:** Si
T. Rectal: 37,5°C **% Dh:** 5
Mucosas: Ro **Linf.:** NR
FC: 56 lpm **RC:** Normal
FR: 44 rpm **RR:** Normal

Óculo- Nasal: Nor. **Conc.:** Alerta
RT: Ausente **RD:** Presente
Evaluación Dermatológica: Normal

Localización tumor: Glande
Volumen tumor: 0,38 cc³
Secreciones: Sangre, Esmegma
Ulceraciones: No
Masas Secundarias: No

Eritrocitos: 9,19 x 10⁶ mm³
Hemoglobina: 16,5 g/dL
Hematocrito: 51,9 %
VCM: 57 um³
HCM: 18 pg
CCMH: 31,8 g/dL

Concentración EPO:

15,2 mUI/ml

Observaciones:

Prepucio libre de lesiones.

LINE-MYC negativo

Anexo 6: Reporte de resultados de concentración de eritropoyetina sérica en caninos de los grupos 1 y 2, obtenidos mediante Radio Inmuno Ensayo

NationWide Specialist Laboratories
Unit 2, Sawston Park, London Road
Pampisford, Cambridgeshire, CB22 3EE

Lab Reference Number: 158910

**Date: 10th
December
2014**

Mayra Martínez
c/o Elizabeth
Murchison
Cambridge Vet School

RIA Serum Samples (Aliquots)				
Code	Group	Importance Order	EPO	Notes
1103S1	CTVT	Priority	27	
1104S1	CTVT	Priority	29	
1105S1	CTVT	Priority	13,5	
1106S1	CTVT	Priority	37	
1107S1	CTVT	Priority	31	
1108S1	CTVT	Priority	17,7	
1109S1	CTVT	Priority	25	
1110S1	CTVT	Priority	28	
1111S1	CTVT	Priority	31	
1112S1	CTVT	Priority	12,2	
1113S1	CTVT	Priority	15,2	
1122S1	Control	1	17,1	
1117S1	Control	2	13,4	
1134S1	Control	3	14,5	
1141S1	Control	4	19,0	
1130S1	Control	5	6,3	
1125S1	Control	6	11,2	
1139S1	Control	7	14,3	
1131S1	Control	8	11,1	* CV% = 33% (13.5/8.4)
1128S1	Control	9	19,2	
1136S1	Control	10	14,7	
1137S1	Control	11	12,0	
1135S1	Control	12	14,1	
1144S1	Control	13	12,9	
1121S1	?	?	10,2	Extra sample not on list ?

**Canine EPO normal range = 10 - 20
mIU/mL**

Anexo 7: Reporte de desenvolvimiento de la estudiante en la Universidad de Cambridge por parte de la Dra. Elizabeth Murchison



Elizabeth Murchison
Reader in Comparative Oncology and Genetics
Department of Veterinary Medicine
Maddingley Road
Cambridge CB3 0ES
United Kingdom

+44-(0)1223-766-497
epm27@cam.ac.uk

25th January, 2015

Dear Dr Oswaldo Albornoz,

It is a pleasure to inform you about Ms Mayra Martinez's recent visit to my laboratory at the University of Cambridge, Department of Veterinary Medicine. Mayra visited Cambridge between 12th and 22nd November, 2014. This visit formed an important part of her research project, the goal of which was to determine the concentration of erythropoietin (EPO) in serum from dogs with canine transmissible venereal tumours (TVT), and to compare this to the EPO level found in serum from control dogs without this disease.

Mayra initially contacted me more than one year ago, proposing to perform her final year research project on TVT. I suggested a number of projects to her, and I was very impressed when she elected to perform the most challenging, but also most interesting, project that I had mentioned. This project involved testing the hypothesis that EPO is elevated in dogs with TVT tumours, perhaps via a paraneoplastic process. We already had some preliminary evidence that EPO may be elevated in TVT dogs, but we needed additional evidence in order to confirm this.

I was extremely impressed by the level of organisation, determination and care that Mayra showed in carrying out her project. Mayra set up collaborations with spay/neuter campaigns and government officials in order to collect samples for her project. She encountered numerous difficulties in setting up the project, most notably because one of her collaborating organisations withdrew from the project at the last minute, but she was never discouraged from pursuing her goal. The result was an extremely valuable, well-curated and complete set of samples from eleven TVT cases, as well as matched controls. Mayra also showed great determination and initiative in establishing laboratory assays in Ecuador in order to perform blood analysis.

During her visit to Cambridge, Mayra was able to observe the EPO radioimmunoassays (RIAs) being performed on her samples. Excitingly, the results were positive, and Mayra found that the average EPO concentration in serum from TVT dogs was approximately double that found in control dogs. In addition, EPO concentration was correlated with tumour volume. These results will form the basis of a paper for peer-reviewed publication.

It is a tribute to Mayra's exceptional skill, determination and commitment that this project has been such a success. It is unusual for a final-year veterinary student to have the maturity to plan, organise and then perform a complex project of this time with such independence. Mayra has an absolute commitment to research that was apparent in her performance of this project.

During her visit to Cambridge, Mayra was also able to assist with other projects in the laboratory, including performing western blotting, analysing immunohistochemistry, extracting DNA and analysing samples. She also attended a session at the clinical pathology department to learn about cytology analysis. Mayra showed enormous enthusiasm for learning new methods and experimental techniques. In addition, Mayra presented her project and preliminary results at our lab group meeting; her presentation was in fluent English and was clear, concise and presented with confidence.

In summary, Mayra has performed an excellent project, which is comparable with the very best final-year veterinary projects performed by students at the University of Cambridge. I admire Mayra's vision, determination and commitment to research.

I believe that, given the opportunity, Mayra has the potential to become a research leader who will contribute internationally to the understanding of animal health.

Please do not hesitate to contact me if you have any further questions.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elizabeth Murchison'.

Elizabeth Murchison