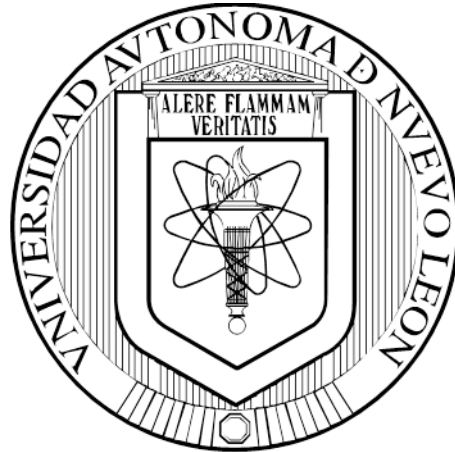


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1(Tumor de Wilm's) EN  
TUMOR MAMARIO CANINO Y SU CORRELACIÓN CON EL TIPO  
HISTOPATOLÓGICO**

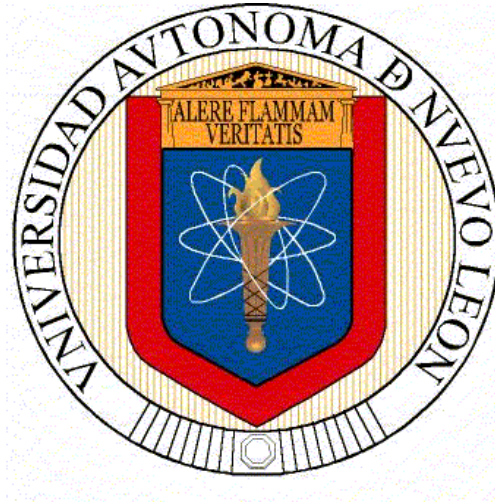
**PRESENTADA POR**

**MVZ. BRISA DENISSE CARRANZA MARTÍNEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**OCTUBRE, 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilm's) EN  
TUMOR MAMARIO CANINO Y SU CORRELACIÓN CON EL TIPO  
HISTOPATOLÓGICO

PRESENTADA POR

MVZ. BRISA DENISSE CARRANZA MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1(Tumor de Wilm's)EN TUMOR  
MAMARIO CANINO Y SU CORRELACIÓN CON EL TIPO HISTOPATOLÓGICO

Aprobación por el comité de tesis



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila

Director de Tesis



Dr. Rafael Ramirez Romero

Co- Director



Dr. Pablo Zapata Benavides

Co- Director



Dra. Sibilina Cedillo Rosales

Co- Director



Dr. Juan José Zarate Ramos

Co- Director

## **DEDICATORIA**

A mi maravilloso esposo Oscar Aguilar que desde el principio me apoyó con la decisión de estudiar la maestría. Gracias por siempre creer en mí, por escuchar mis presentaciones, por resolver conmigo los desafíos del proyecto, por tu paciencia infinita, por ser mi consuelo en momentos de debilidad, por ser mi mayor y más grande apoyo en esta meta. Este logro es gracias a ti TE AMO.

A mi paciente “yeya” que me inspiró a conocer más del cáncer y a prepararme mejor en el área de Oncología. Gracias a su propietaria Leyda que me dio la confianza para dar un tratamiento y así mejorar sus expectativas de vida. Nunca te olvidaré .Gracias Yeya.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila por ser una excelente asesora, por todo su ánimo constante en cada desafío, su paciencia, su amor y esa calidad humana que la caracteriza. Gracias por brindarme su tiempo, su amistad y ser un ejemplo para mí en lo personal y lo profesional. La quiero muchísimo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente a Mi Padre Celestial que me permitió tener las habilidades y la fortaleza para desarrollar éste proyecto, por los momentos en los que pude sentir su amor y su consuelo en momentos de desánimo.

A mis padres, a quienes amo y admiro profundamente, sin ustedes no hubiera podido alcanzar esta meta en mi vida. Gracias papas

A mis hermanos y cuñados Lily, Luigui, Toño y Zamy que siempre han sido un impulso para crecer personal y profesionalmente, además de ser un ejemplo de perseverancia, trabajo y esfuerzo constante. Gracias por creer en mí. Los amo.

A mis princesas Zamy Zamy y Zarita que siempre me sacaron una sonrisa.

A CONACYT por el apoyo económico brindado a través de una beca de estudios.

Al Dr. Rafael Ramírez y Cecilia Ramírez que me brindaron su apoyo constante con sus grandes conocimientos. Gracias por su paciencia y disposición.

A los Doctores Jaime y Ramiro que más que mis maestros, mis compañeros de laboratorio hasta altas horas de la noche. Gracias por sus consejos, sus ánimos y su amistad.

Al Dr Uziel por su amistad y por tener la disposición de ayudarme en lo que fuera necesario. Gracias por brindarme sus conocimientos y por sus consejos en momentos de desanimado.

A la Dra Diana Elisa Zamora y el Dr. Pablo Zapata Benavides que depositaron su confianza en mi para este proyecto y por sus valiosos consejos profesionales.

A mis maravillosas amigas Leslee, Cynthia, Andrea, Shoms, Ana Belem, Ale, y Cecy. Infinitas gracias por toda esa paciencia, ánimos, ayuda, consejos y apoyo moral que tuve de ustedes durante éstos dos años. Gracias por brindarme su amistad siempre.

A los médicos veterinarios Doc. Karim, Doc Oscar, Vero, Vladi, Cecy, Ana Belem, Pets, Veterinaria Sierra Madre, que me dieron la oportunidad de recolectar muestras.

A Claudita Barrera que me apoyo desde los trámites, hasta este día. Mil gracias Clau

A Felipe que me brindo sus conocimientos y siempre tubo la disposición y paciencia de ayudarme.

A mi esposo Oscar Aguilar por ser mi mayor y más grande apoyo en esta meta.

## NOMENCLATURAS

<b>µg</b>	<b>microgramo</b>
<b>µl</b>	<b>microlitro</b>
<b>°C</b>	<b>grado centígrado</b>
<b>ADN</b>	<b>ácido desoxiribunocléico</b>
<b>ADNc</b>	<b>ácido desoxirribunocléico complementario</b>
<b>Akt</b>	<b>proteína cinasa B</b>
<b>AML</b>	<b>leucemia mieloide aguda</b>
<b>ARN</b>	<b>ácido ribonucléico</b>
<b>ARNm</b>	<b>ácido ribonucléico mensajero</b>
<b>CK</b>	<b>citoqueratina</b>
<b>CML</b>	<b>leucemia mieloide crónica</b>
<b>DEPC</b>	<b>dietilpirocarbonato</b>
<b>GH</b>	<b>hormona de crecimiento</b>
<b>GM</b>	<b>glándula mamaria</b>
<b>HER2</b>	<b>factor de crecimiento epidermal</b>
<b>Kg</b>	<b>kilogramo</b>
<b>KTS</b>	<b>lisina treonina serina</b>
<b>M</b>	<b>metástasis</b>
<b>mg</b>	<b>miligramo</b>
<b>ml</b>	<b>mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>microgramo</b>
<b>N</b>	<b>linfonodo</b>
<b>OVH</b>	<b>ovario histerectomía</b>
<b>PCR</b>	<b>reacción en cadena de la polimerasa</b>

**Pb** pares de bases  
**R** riñón  
**RE** receptor de estrógeno  
**RP** receptor de progesterona  
**r.p.m** revoluciones por minuto  
**RT** transcriptasa reversa  
**T** tumor  
**Taq** polimerasa *Termophilus acuaticus*  
**TMC** tumor mamario canino  
**UV** ultra violeta  
**V** volts  
**VEGF** factor de crecimiento epidermal  
**WT1** tumor de Wilms

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>v</b>
<b>NOMENCLATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>3.OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>4.ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>4.1.Cáncer</b> .....	<b>4</b>
4.1.1 Cáncer en Animales.....	5
4.1.2 Cáncer en caninos .....	5
<b>4.2 Fisiología de la glándula mamaria</b> .....	<b>7</b>
4.2.2 Irrigación sanguínea de la glándula mamaria .....	8
4.2.3 Drenaje linfático de la glándula mamaria .....	8
4.2.4 Desarrollo de la glándula mamaria .....	9
<b>4.3Tumor mamario canino</b> .....	<b>11</b>
4.3.1Factores de riesgo .....	13
4.3.2 Factores pronósticos.....	15
4.3.3 Diagnóstico y estadío.....	16
4.3.4 Clasificación de TMC .....	19
4.3.5 Biomarcadores y pronóstico de TMC.....	19
4.3.6 Tratamiento para TMC.....	25
<b>4.4 WT1 Tumor de Wilm´s</b> .....	<b>28</b>
4.4.1 WT1 en embriogénesis .....	28
4.4.2 Estructura de WT1 .....	29
4.4.5 WT1 en cáncer de mama en humano.....	33
4.4.6 WT1 En caninos.....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1 Recolección de muestras de tumor mamario canino</b> .....	<b>35</b>



5.2 Diagnóstico por histopatología .....	36
5.3 Extracción de ARN por el método de TRIZOL .....	36
5.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	37
5.5 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y expresión de WT1 .....	37
5.6 Secuenciación del gen WT1 .....	38
5.7 Inmunohistoquímica para el análisis de la expresión del gen WT1 .....	38
5.8 Correlación entre expresión de WT1 y el tipo histopatológico.....	38
6. RESULTADOS.....	39
6.1. Recolección de muestras de TMC.....	39
6.3 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y expresión de WT1 .....	45
6.4 Secuenciación del gen WT1 .....	46
6.5 Inmunohistoquímica para expresión de la proteína de WT1.....	48
6.6 Análisis de correlación entre WT1 y el subtipo histopatológico .....	56
7. DISCUSIÓN .....	57
8. CONCLUSIONES .....	61
LITERATURA CITADA.....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Drenaje linfático de glándula mamaria y tumor de glándula mamaria

**Tabla 2** Clasificación de tumores mamarios caninos por medio del sistema TNM

**Tabla 3** Sistema de estadío WHO

**Tabla 4** Genes blanco transcripcionales de WT1

**Tabla 5** Biopsias de TMC recolectadas ,diagnóstico histopatológico, y datos clínicos

**Tabla 6.** Homología de las secuencias analizadas con las publicadas previamente en el GenBank.

## **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1** Desarrollo de la glándula mamaria

**Figura 2** Estructura de WT1

**Figura 3** Tumor mixto de glándula mamaria (H&E)

**Figura 4** Adenoma simple (H&E)

**Figura 5** Osteosarcoma (H&E)

**Figura 6** Carcinoma simple (H&E)

**Figura 7** a) Expresión de WT1 y B-actina en tumores benignos, glándula mamaria y riñón, b) Expresión de WT1 y B-actina en TMC maligno

**Figura 8** Carcinoma sólido (IHQ)

**Figura 9** Carcinoma sólido (IHQ)

**Figura 10** Osteosarcoma (IHQ)

**Figura 11** Riñón (IHQ)

**Figura 12** Tumor mixto benigno (IHQ)

**Figura 13** Tumor mixto benigno (IHQ)

**Figura 14** Adenoma simple (IHQ)

**Figura 15** Glándula mamaria sana (IHQ)

## RESUMEN

El tumor mamario canino (TMC) es uno de los más frecuentes en la actualidad, es por esto que es necesario conocer los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia, así como nuevas formas de diagnóstico y pronóstico.

En cáncer de mama humanos, se ha encontrado sobreexpresado el gen WT1 (Tumor de Wilm's) y se relaciona con mala pronóstico y quimioresistencia.

WT1 es un factor transcripcional que regula la expresión de distintos genes cruciales para el desarrollo del tumor involucrados tanto en proliferación celular como en apoptosis y angiogénesis.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión del gen WT1 en muestras de TMC por PCR e inmunohistoquímica y su correlación con el tipo histopatológico.

Se recolectaron 17 biopsias de TMC 9 de las cuales fueron diagnosticadas como benignas y 6 como malignas mediante histopatología. Se analizó la expresión del gen WT1 mediante la técnica de PCR encontrándose tanto en TMC benigno como maligno, así como en glándula mamaria sana.

Se secuenciaron 2 muestras de TMC benigno, 2 de TMC maligno, una muestra de glándula mamaria sana y 1 muestra de riñón encontrándose una homología de hasta un 100% con la secuencia de WT1 reportada para *Ictonyx libyca* (zorrilla líbica).

La técnica de inmunohistoquímica para WT1 mostró una reactividad positiva sólo en TMC maligno y en riñón (control positivo). Debido a que la prueba estadística empleada (Chi cuadrada) muestra una confiabilidad mayor en la técnica de inmunohistoquímica que la de PCR, puede concluirse que la expresión de WT1 en TMC se relaciona con el subtipo histopatológico maligno.

# 1.INTRODUCCIÓN

Debido a la capacidad de diferenciación de la glándula mamaria, los genes involucrados en éste proceso deber llevar a cabo sus funciones de manera óptima, ya que cualquier alteración durante este proceso puede desencadenar en una neoplasia.

El tumor de glándula mamaria(TMC) constituye uno de los tumores más frecuentes en la perra representando el 47% de todos los tumores(Zatloukal et al., 2005) Aproximadamente el 50% de estos enviados a patología para su diagnostico, son considerados malignos, siendo la metástasis la causa principal de muerte(Klopfleisch et al., 2011).

El TMC ha sido blanco de una amplia variedad de investigaciones relacionadas con genes determinantes en el proceso de cancerogénesis y que pueden usarse como biomarcadores y que han sido estudiado en el humano, tal es el caso de el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la enzima COX-2, y mutaciones en la proteína p53 y BRCA 1 (Klopfleisch et al., 2011).

Debido a que el 25% de los pacientes con TMC maligno requieren un tratamiento más allá de la cirugía y en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, se hace necesaria la búsqueda de genes que puedan ser utilizados en un inicio como biomarcadores para este tipo de neoplasia y que posteriormente puedan ser utilizados como blancos para el desarrollo de terapia génica.

El gen WT1 (gen del tumor de Wilm's), fue descrito inicialmente en humanos como un gen supresor de tumor en nefroblastoma, un tumor pediátrico que se presenta en 1 de cada 10,000 niños(Shimamura et al 1997). Es un factor de transcripción que modula la expresión de genes involucrados en la diferenciación sexual, proliferación celular y apoptosis(Hewitt, Hamada, & McDonnell, 1995). Actualmente este gen es reconocido en humanos como un oncogén, ya que se encuentra sobreexpresado en

leucemia y diversos tumores sólidos como cáncer de mama, cáncer de pulmón y mesotelioma (Xu et al., 2013).

En cáncer de mama en el humano, la sobre expresión de WT1 está relacionado con un mal pronóstico. Además el silenciamiento de WT1 en cáncer de mama permite la disminución de células tumorales.

Se ha comprobado que el TMC y el cáncer de mama en humanos tienen propiedades similares, y debido a la diferencia entre razas, el canino es considerado un modelo ideal para éste tipo de neoplasias.

En la actualidad existen 2 reportes de WT1 en caninos, evaluando las propiedades de WT1 en fenotipos sexuales, sin resultados positivos (Ichimura et al., 2009; Kothapalli, Kirkness, Pujar, Wormer, & Meyers-Wallen, 2005).

Los antecedentes anteriormente citados implican que WT1 pudiera ser un excelente candidato a biomarcador para TMC, y que en algún futuro pueda usarse como un posible blanco terapéutico.

El objetivo de éste trabajo fue analizar la expresión del gen WT1 en muestras de TMC por RT-PCR e inmunohistoquímica y correlacionarlo con el tipo histopatológico.

## **2.HIPÓTESIS**

La expresión del gen WT1 (Tumor de Wilm's) en tumor mamario canino se relaciona con la malignidad del tumor.

## **3.OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Analizar la expresión del gen WT1 en muestras de TMC por PCR e inmunohistoquímica y su correlación con el tipo histopatológico.

### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Clasificar las muestras de TMC en tumores benigno o maligno mediante histopatología.

3.2.2 Determinar la expresión del gen WT1 en muestras de TMC por RT-PCR.

3.2.3 Analizar la expresión de la proteína WT1 en muestras de TMC por inmunohistoquímica.

3.2.4 Determinar la correlación entre la expresión de WT1 y el tipo histopatológico por el método estadístico de Chi cuadrada.

## **4.ANTECEDENTES**

### **4.1.Cáncer**

El cáncer es una enfermedad causada por la proliferación de células anormales dentro de un organismo que pueden extenderse de un tejido a otro (OMS, 2013).

El desarrollo del cáncer es un proceso que se caracteriza por tener muchas alteraciones en una sola línea de células que ocurre después de muchas divisiones celulares, es por esto que puede tardar años en desarrollarse.

Existen tejidos que son más susceptibles a la carcinogénesis, esto debido a que existen tejidos que tienen una mayor proliferación celular como parte de su conformación, como los tejidos epiteliales y las células sanguíneas.

Una vez que existe la proliferación de células excesiva en un tejido y el tiempo requerido para formarse, pueden llegar a completar las suficientes mutaciones genéticas que le permitan caracterizarse como un tumor de tipo maligno (Karp, 2011).

Los carcinogénicos brindan la inestabilidad en el DNA necesaria para que el cáncer se desarrolle; una vez que existe un daño a nivel genético, el desarrollo del cáncer entra en un punto de no retorno.

Existen 2 tipos de carcinogénicos, los extrínsecos que incluyen los rayos Ultravioleta, virus, el tabaco, etc., y los intrínsecos en los que podemos mencionar las causas hereditarias y las hormonas. (Breivik, 2005)

Para que este proceso se lleve a cabo se necesitan por lo menos 6 mutaciones que le den a la célula la capacidad de evadir la apoptosis, promover la angiogénesis, la invasión de tejidos, autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad para señales de anti-crecimiento y potencial de replicación ilimitado. (Hanahan & Weinberg, 2011).



#### **4.1.1 Cáncer en Animales**

La oncología veterinaria es de vital importancia en la actualidad para poder ampliar nuestro conocimiento de la carcinogénesis desde un aspecto molecular, preventivo, epidemiológico, además de brindarnos oportunidades de terapéuticas eficaces debido a las similitudes compartidas entre especies.

Debido a que la incidencia de cáncer ha incrementado durante los últimos años tanto en las especies animales como en el humano. Es de vital importancia indagar las similitudes que comparten.

En el 2000 Lipscomb y colaboradores reportan el incremento de cáncer en mamíferos marinos durante los últimos 30 años, en el caso de las focas con un 85% de tumores malignos metastáticos, principalmente carcinomas genitourinarios, los cuales se cree que son causados por contaminantes orgánicos que son principales fuentes contaminantes en la costa de los Estados Unidos (Lipscomb, 2000).

Las cabras, perros, gatos y borregas con piel blanca tienen un elevado riesgo de presentar carcinoma de células escamosas en piel. La despigmentación de pelo en los caballos y cerdos miniatura grises se ha asociado a melanomas cutáneos (Misdorp, 1996).

#### **4.1.2 Cáncer en caninos**

Aproximadamente 6 millones de perros son diagnosticados con cáncer cada año en los Estados Unidos(Printz, 2011) y el 27% muere a causa de éste, siendo el Bernease, el Golden Retriever y el Boxer , las razas más afectadas.(Dobson, 2013). Sin embargo, el boxer es la raza con el mayor riesgo de desarrollar sarcomas de hueso y tejidos blandos, linfomas, gliomas, tumores testiculares y carcinoma tiroideo(Misdorp, 1996).

Un estudio realizado en Reino Unido mostró una incidencia de cáncer mayor en piel y tejidos blandos, seguido por glándula mamaria, tracto genitourinario, tejido linfoide, endocrino, gastrointestinal y orofaríngeo. El histiocitoma cutáneo canino fue el tumor

más frecuente, seguido por lipoma, adenoma, sarcoma de tejido blando, tumor de células cebadas y linfoma(Dobson, 2002).

El tumor más común en las hembras es el tumor mamario canino, seguido de tumor de tejido conectivo, melanoma maligno y linfoma. En el caso de los machos el más frecuente es el de tejido conectivo, seguido por el de testículos, melanoma maligno y boca y faringe; Esto de acuerdo a un estudio epidemiológico realizado en 1998(Kelsey, Moore, & Glickman, 1998).

La incidencia de cáncer en el canino, se ha visto en aumento tras el paso de los años, al igual que la incidencia en humanos.(Dobson, 2013). Esta relación se ve magnificada debido a ciertos hábitos en el humano que predisponen la aparición de cáncer en la mascota, como la exposición al tabaco(Reif, Bruns, & Lower, 1998).

Diferentes tipos de oncogenes así como de genes supresores de tumor identificados en cáncer en humanos, han contribuido al mejor conocimiento de cáncer en perros, debido a que las características moleculares, de comportamiento y clasificación histológica del cáncer son muy análogas entre humanos y caninos. Sin embargo el estudio de terapias oncológicas en el canino de igual manera contribuye a un mejor conocimiento en cáncer en humano. Por lo tanto se considera al perro como un modelo ideal que puede contribuir de manera exitosa al conocimiento de cáncer en el humano, tanto de comportamiento del cáncer como tratamientos oncológicos efectivos(Paoloni & Kahanna, 2008).

Anteriormente se observaba que la mayoría de los propietarios de perros con presencia de masa tumoral, no se presentaban a consulta con un médico veterinario, y otra parte acudía con la mascota para realizar eutanasia, sin tener un diagnóstico definitivo del tumor (Kelsey et al., 1998).En la actualidad, los propietarios consideran a su mascota como un miembro más de su familia, por tanto su muerte genera depresión. Es por esto que buscan la manera en la que sus mascotas se mantengan sanas y que tengan una buena calidad de vida(McNicholas et al., 2005).

## **4.2 Fisiología de la glándula mamaria**

El desarrollo de la glándula mamaria comienza en la etapa embrionaria con la aparición de 2 líneas ventrales de ectodermo, seguidas por regiones especializadas de mesodermo. La glándula mamaria sigue creciendo en proporción al resto del cuerpo hasta la etapa de la pubertad donde se liberan estrógenos de los ovarios(Silver, 1966).

La perra posee 5 pares de glándulas mamarias distribuidas a lo largo de la línea abdominal. Las primeras dos pares de glándulas craneales se le conocen como glándulas torácicas craneales, las dos pares siguientes son llamadas glándulas craneales y caudales abdominales y al último par se le conoce como glándulas inguinales.

La glándula mamaria es considerada una glándula túbulo-alveolar dividida en lóbulos por un tejido conectivo interlobulillar. Consta de parénquima, constituido por alvéolos y estroma de tejido conectivo, constituido de vasos sanguíneos, ductos y nervios.

Los ductos interlobulares convergen en los ductos lactíferos, los cuales desembocan en el seno lactífero que continúa al seno del pezón (Sleeckx, Rooster, Kroeze , Ginneken, & Brantegem, 2011) constituido de una bicapa de epitelio columnar (Sorenmo, Rasotto, Zappulli, & Goldschmidt, 2011). El seno del pezón finalmente se abre hacia la superficie del pezón por medio de los ductos papilares. Los ductos poseen distintos revestimientos. (Sleeckx et al., 2011);los ductos menores se encuentran cubiertos por una capa de epitelio cuboidal simple y células mioepiteliales fusiformes, mientras que los ductos mayores poseen una bicapa de epitelio cuboidal rodeada por células mioepiteliales fusiformes(Sorenmo et al., 2011).

Los alvéolos están compuestos por epitelio columnar o cuboidal dependiendo de la actividad secretoria, y se encuentran rodeados por una capa de células mioepiteliales y otra capa de células luminales (Borena, Bussche, Burvenich, Duchateau, & Walle, 2013), las cuales son responsables de la síntesis y secreción de leche.

Las células mioepiteliales son contráctiles; y por ello responsables de la expulsión de la leche, sin embargo, la evidencia sugiere que se encuentran involucradas en otros procesos fisiológicos importantes como la regulación del crecimiento, desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria , así como el control de la carcinogénesis inhibiendo el crecimiento tumoral y angiogénesis, promoviendo la apoptosis y limitando la movilidad de células cancerígenas(Sopel, 2010).

#### **4.2.2 Irrigación sanguínea de la glándula mamaria**

La irrigación sanguínea de la glándula mamaria esta determinada por la arteria epigástrica superficial craneal que provee flujo sanguíneo a las glándulas mamarias torácicas craneal y caudal y la abdominal craneal . La glándula abdominal caudal y el par de glándulas inguinales son irrigadas por la arteria superficial caudal.

La sangre venosa es drenada por la vena interna torácica en el caso de las glándulas mamarias torácicas, mientras que la sangre de las glándulas abdominales e inguinales se drenan por medio de la vena epigástrica superficial caudal(Sleeckx et al., 2011).

La anastomosis cráneo-caudal de las venas que pasan por la línea media, propician la deposición de células tumorales malignas en glándulas adyacentes y colaterales(Silver, 1966).

#### **4.2.3 Drenaje linfático de la glándula mamaria**

Debido a que el sistema linfático está involucrado en la diseminación del tumor, conocer el drenaje individual de cada una de las glándulas mamarias es de gran importancia cuando se presenta un TMC

Cada glándula mamaria posee una red de pequeños vasos linfáticos que se unen a una red similar en el tejido subcutáneo para conjugarse con vasos de mayor tamaño que drenan la linfa a los ganglios(Sleeckx et al., 2011).

En caninos sanos, el drenaje linfático se realiza hacia los linfonodos ipsilaterales y no existe drenaje hacia el lado lateral de la glándula, pero en caso de existir neoplasia, el drenaje se puede alterar(Pereira, Baileiro, & Ribeiro, 2003).

Gracias a los descubrimientos realizados por Patsikas (Pastikas & Dessiris, 1996; Pastikas et al., 2006; Patsikas & Dessiris, 1996), la inspección de ganglios específicos para evaluar al paciente con TMC es posible. (Tabla 1).

Glándula mamaria	Drenaje linfático normal	Drenaje linfático neoplásico
<b>CRT</b> Craneal torácica	Ganglio linfático axilar	Ganglio linfático axilar y esternal
<b>CUT</b> Caudal torácica	Ganglio linfático axilar	Ganglio linfático axilar y esternal
<b>CRA</b> Craneal abdominal	Ganglio linfático axilar y superficial inguinal	Ganglio linfático axilar, superficial inguinal e iliaco medial
<b>CUA</b> Caudal abdominal	Ganglio linfático superficial inguinal	Ganglio linfático axilar y superficial inguinal
<b>I</b> Inguinal	Ganglio linfático superficial inguinal	Ganglio linfático superficial inguinal, popíteo y ganglios linfáticos mediales del muslo

**Tabla1.** Drenaje linfático normal y neoplásico de glándula mamaria

#### 4.2.4 Desarrollo de la glándula mamaria

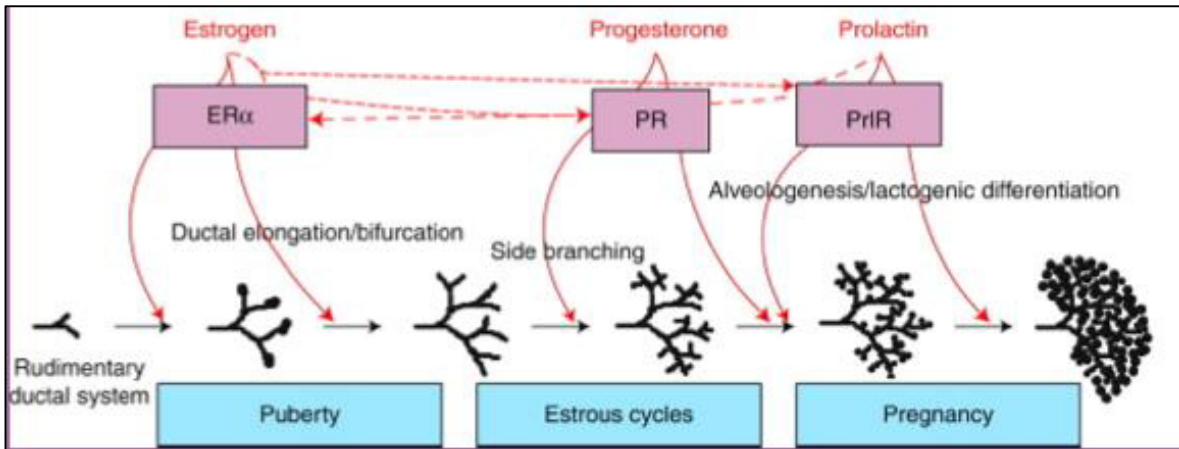
Durante la pubertad se encuentra el periodo más activo de desarrollo de la glándula mamaria, causado por la liberación de estrógenos, ésta época se caracteriza por una rápida extensión y ramificación, principalmente en las zonas terminales de los ductos, donde gracias a la proliferación celular se da la formación de capullos en la porción distal (Meyer, Leen, & Burvenich, 2004).

Durante el ciclo estral de la hembra ocurren cambios importantes en la glándula mamaria. En la fase del proestro en animales jóvenes, los ductos interlobulares se encuentran formados de un tejido conectivo denso en el estroma. En el caso de animales adultos en proestro la glándula se encuentra inactiva y está formada por ductos interlobulares y lobulillos rodeados por cantidades excesivas de tejido

conectivo interlobular; además, estructuras alveolares del ciclo anterior pueden encontrarse presentes en los lobulillos. Se pueden encontrar también macrófagos con lipofusina .

El en inicio del estro la proliferación de epitelio intralobular es evidente, seguido por la pérdida de tejido conectivo en los lóbulos .En etapas tempranas del diestro, cuando existe una mayor concentración de progesterona, hay un gran desarrollo de los ductos, con la formación de lóbulos. El epitelio que rodea a éstos ductos es una multicapa, y los fibroblastos dentro del estroma interlobular tienen un núcleo más prominente y muestran una incrementada actividad mitótica. En etapas tardías del diestro, el desarrollo de la glándula mamaria ha alcanzado su máximo con la formación de alvéolos secretorios en la parte terminal de los ductos intralobulares(Sorenmo et al., 2011).

En los inicios de la gestación, con una alta concentración de progesterona, el crecimiento ocurre por medio de un alargamiento y ramificación del sistema ductal de los lóbulos. Los ductos dan lugar a la formación de lóbulos que a su vez formarán los alvéolos. Poco tiempo antes del parto, y bajo la influencia de la prolactina, las células alveolares pre-secretoras maduran a células alveolares secretoras. Al momento del parto, la glándula mamaria ya es una estructura conformada de estructuras ductales, lobulares y alveolares, por lo que la leche es transportada vía ducto- ducto hasta el seno del pezón, donde es eliminada por el neonato(Sleeckx et al., 2011). 10 días post parto comienza la regresión alveolar, que se completa a los 40 días post parto; En ésta etapa sólo se pueden observar los ductos(Meyer et al., 2004)(Figura 1)



**Figura 1.** Desarrollo de la glándula mamaria. Durante el crecimiento la porción del parénquima a estroma incrementa, hasta que eventualmente, los lóbulos y alvéolos se encuentran separados solamente por tejido conectivo(Sleeckx et al., 2011).

#### 4.3 Tumor mamario canino

El TMC es el más frecuente en las perras y en las mujeres (Kelsey et al., 1998). Aunque en la perra se presenta 4 veces más frecuente que en el humano (Gupta et al., 2012). Este tumor representa el 47 % del total de los tumores en caninos,(Zatloukal et al., 2005) y el 50% que se envían a patología son diagnosticados como malignos; la mitad de éstos solo pueden ser tratados con cirugía(Gupta et al., 2012); siendo la metástasis la causa principal de muerte (Klopfleisch et al., 2011).Esto significa que el 25% de los pacientes tienen un alto riesgo de metástasis y requieren un tratamiento más allá de la cirugía.

La incidencia de TMC es menor en algunas regiones, debido a que realizan la OVH (ovariohisterectomía) como parte del protocolo de medicina preventiva, en una edad temprana; desde las 8 semanas hasta los 12 meses; tal es el caso de los Estados Unidos y algunas ciudades en el oeste de Europa(Moe, 2001).

Contrario a lo citado anteriormente, España y Escandinavia tienen una incidencia significativamente mayor, debido a que la OVH no es parte de su protocolo preventivo(Egenvall et al., 2005a).

La glándula mamaria caudal abdominal y la inguinal son las más afectadas(Misdorp, 1996).

Los TMC son de origen epitelial (adenoma simple /carcinoma simple), tejido epitelial y mioepitelial(adenoma complejo/carcinoma complejo), origen mesenquimal (fribroadenoma/fibrosarcoma/osteosarcoma), y el más frecuente; una combinación entre tejido epitelial y mesenquimal (tumor mixto benigno)(Sleeckx et al., 2011).

La mayoría de los pacientes con TMC (50-70%) presentan tumores múltiples, éstos pacientes pueden tener diferentes diagnósticos para cada tumor; Sin embargo, los pacientes diagnosticados con tumor maligno se encuentran en mayor riesgo de desarrollar un tumor maligno en comparación con los perros con tumores benignos (Sorenmo, 2003).

Se he estipulado que los tumores malignos se desarrollan a partir de un tumor benigno pre existente (Sleeckx et al., 2011), ésta teoría se ve reforzada por autores que afirman que un TMC benigno se transforma en maligno después de un periodo de tiempo prolongado, siendo el carcinoma, la clasificación histológica final este proceso(Sorenmo et al., 2011).

Un estudio realizado por Sorenmo en el 2009 indica que los pacientes diagnosticados con TMC malignos son significativamente más viejos y presentan tumores más grandes, que los pacientes diagnosticados con tumores benignos (Sorenmo et al., 2009). La evidencia sugiere que la malignidad está asociada al tamaño del tumor, se ha demostrado que los tumores de 5 cm o menos tienen un mejor pronóstico. Los tumores mayores de 5cm tienen más probabilidad de estar asociados a metástasis ganglionar.

Las publicaciones revelan que los perros con lesiones histológicas pre -malignas de TMC ó perros con diagnóstico previo de malignidad muestran un riesgo significativo de desarrollar TMC maligno adicional al ya existente(Stratmann, Failing, Richter, & Wehrend, 2008). Estos descubrimientos pueden asociarse al hecho de que toda la glándula mamaria está expuesta al mismo ambiente hormonal (Sorenmo et al., 2009).

Aunque los TMC parezcan entidades independientes, los autores confirman que clínicamente pueden tener diferente diagnóstico y tamaño, pero son etiológicamente



iguales(Sleeckx et al., 2011). La etiología hormonal es uno de los aspectos de TMC que comparten con el humano(Beck et al., 2013).

#### **4.3.1 Factores de riesgo**

Existen diversas opiniones acerca de los factores de riesgo determinantes en TMC, Sleeckx afirma que los factores de riesgo más importantes que permiten el desarrollo de TMC incluyen la edad, la raza, la predisposición genética, las hormonas y factores de crecimiento, la expresión de ciclooxygenasa 2 y la dieta (Sleeckx et al., 2011). Sorenmo concluye que a pesar de que factores como la raza, dieta y obesidad tienen una asociación con el desarrollo de TMC; la edad y la exposición hormonal son los factores más importantes(Sorenmo et al., 2011).

Es importante mencionar que existen factores de riesgo que se han relacionado significativamente con los existentes en el humano como lo son la edad, predisposición genética, y la obesidad (Beck et al., 2013).

##### **4.3.1.1 Edad**

Los perros jóvenes tienen una mayor predisposición a tener TMC benignos contrario a los perros más longevos. Los perros que presentan TMC benignos tienen una edad media de 8.5 años de edad, comparado con los malignos con 9.5 años. Sin embargo, Zatloukal en el 2005 reporta que la incidencia más alta de tumores mamarios benignos y malignos se presenta a los 10 y 13 años respectivamente (Zatloukal et al., 2005).

La presencia de TMC en perros menores de 5 años de edad es escaso (Sorenmo et al., 2009).

##### **4.3.1.2 Raza**

Las razas predisponentes a TMC son variables de acuerdo a la región donde se realiza el estudio; en Suecia se reporta la incidencia más alta en Springle spaniel, doberman pinscher y boxer(Egenvall et al., 2005b), en Noruega las razas con mayor riesgo fueron Boxer, Cocker spaniel, Springle Spaniel Inglés y Dashounds(Moe, 2001); Zatloukal en Republica Checa reporta que las razas más susceptibles a este

tipo de tumor (maligno y benigno) son el Dashound, Poodle, y Cocker Spaniel (Zatloukal et al., 2005).

Las razas pequeñas tienen una mayor predisposición a TMC aunque las razas grandes de raza pura también están expuestas; dentro de las razas pequeñas predisponentes, las más comunes incluyen Poodle, Maltés, Chihuahua, Beagle, Dashound, West Highland, White terrier, Yorkshire terrier y Bishon Frise (Sorenmo et al., 2011).

#### **4.3.1.3 Hormonas**

El tumor mamario, tanto en el humano como en el canino es hormona-dependiente y se sabe que la exposición a hormonas ováricas es la principal causa para el desarrollo de ésta neoplasia (Thuroczy et al., 2007).

Las hormonas estroideas estimulan el crecimiento en la glándula mamaria normal, lo cual ocurre en cada ciclo estral. El efecto proliferativo que poseen éstas hormonas, hacen a la perra más susceptible a desarrollar TMC (Sleeckx et al., 2011). Schneider reporta que el riesgo de TMC incrementa en los primeros ciclos estrales (Schneider, Dorn, & Taylor, 1969).

La esterilización en las perras tiene una incidencia 3 a 7 veces menor que las perras enteras (Alenza, Peña, Del castillo, & Nieto, 2000), aunque éste factor también depende de la edad en la cual se realiza la cirugía, ésta se recomienda que sea antes del primer estro, o entre el primer y el segundo estro con una incidencia del 0.5% y 8% respectivamente (Misdorp, 1996).

Investigaciones posteriores determinaron que realizar la OVH posterior al segundo estro, brindaba protección, pero no lo suficientemente significativa (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt, & McKee, 1991). Chang indicó que la OVH realizada al momento de la extirpación del tumor mejoraba significativamente la tasa de supervivencia de 2 años (Chang, Chang, & Chang, 2005).

Los estrógenos promueven el crecimiento en los ductos, mientras que los progestágenos inducen el desarrollo lóbulo – alveolar, además de una hiperplasia en células mioepiteliales y secretorias.

La progesterona se relaciona con el desarrollo de TMC, esto debido a que regula la hormona de crecimiento GH; la cual estimula la proliferación de las células madre de la glándula mamaria, como primer paso de la carcinogénesis. El efecto de los esteroides es medido por medio de la expresión de receptores de estrógeno (RE) y progesterona(RP). (Sorenmo et al., 2011).

En humanos existe evidencia de que la edad avanzada en momentos de embarazo o la ausencia de éstos tenía una incidencia mayor en TMC, sin embargo en caninos no se ha encontrado alguna asociación (Sleeckx et al., 2011)

En caninos se utiliza la administración de derivados de progesterona para suprimir el ciclo estral; existe evidencia de que la administración de éstas sustancias permiten el desarrollo de TMC(Kwapien, Giles, Geil, & Casey, 1980).

#### **4.3.1.4 Dieta**

Perez sugiere que caninos con problemas de obesidad alimentados con una dieta alta en carne roja, especialmente de res y cerdo, ocasiona un riesgo mayor a desarrollar TMC; Sin embargo éste estudio también indicó que la obesidad tenía un riesgo mayor, si se presentaba en etapas tempranas de crecimiento(Perez Alenza, Rutteman, & Pena, 1998).

Se cree que la obesidad está relacionada con la presencia de TMC en mujeres pos menopáusicas, esto gracias a la acción de las aromatasas, que son enzimas claves en la biosíntesis de estrógenos; en caninos se cree que esto sucede de la misma forma (Sorenmo et al., 2011).

#### **4.3.2 Factores pronósticos**

Los factores pronósticos más conocidos son el tamaño de tumor, tipo de tumor, grado de tumor y presencia de invasión celular o linfática. Las investigaciones relacionadas a factores pronósticos han sido muy inciertas, Sin embargo los factores pronósticos que probaron ser más consistentes de acuerdo a sus estudios mejor controlados son el tamaño de tumor, el estado de los nódulos linfáticos y el estado clínico del tumor(Sorenmo et al., 2011).

### **4.3.3 Diagnóstico y estadío**

Durante el examen físico del paciente el TMC es fácilmente detectable, ya que se presentan nódulos en la glándula mamaria. La mayoría de los pacientes se encuentran sanos al momento del examen físico; a excepción de los que presentan metástasis avanzada o carcinoma inflamatorio, los cuales puede presentar fatiga, letargia, pérdida de peso, disnea, tos, linfedema ó cojera dependiendo del lugar en donde se presente la metástasis (Sorenmo, 2003).

Los TMC pueden ser pequeños, grandes, fijos o móviles, o ulcerados. Los ganglios linfáticos pueden o no, presentar un aumento considerable de su tamaño.

Los pacientes que presenten TMC deben ser quirúrgicamente retirados de ser posible, para realizar un diagnóstico por histopatología (Sorenmo et al., 2011).

El examen físico adecuado del paciente debe incluir la palpación e inspección de cada una de las glándulas, y la palpación de cada uno de los ganglios linfáticos, los axilares, e inguinales superficiales no son palpables, a menos que se encuentren aumentados de tamaño(Sleeckx et al., 2011).

El estadío de TMC se realiza en base al sistema T(Tumor), N(Linfonodo), M(metástasis); para su clasificación, se toma en cuenta el diámetro más grande del tumor.(Tabla2) (Augusto, 2014).

#### **4.3.3.1 Tamaño del tumor**

Existen 3 diferentes categorías de tamaño descritas : T1:<3cm, T2:3-5cm, y T3:>5cm (Owens, 1980). La mayoría de los estudios muestran que los tumores de 3cm o menos tienen un mejor pronóstico, aunque un estudio reciente demostró que lo mismo es cierto para los tumores de 5cm ya que éstos tenían más probabilidad de estar asociados con metástasis ganglionar (Chang et al., 2005).

A pesar de que el tamaño de tumor indica un pronóstico, es necesario tomar en cuenta otras variables al momento de estimar la supervivencia, como el estadio del tumor, ya que a medida que el tumor crezca el pronóstico será mas desfavorable.

#### **4.3.3.2 Estado de nódulos linfáticos**

El estado de ganglios linfáticos ha probado ser un factor pronóstico en distintas investigaciones, en las que se debe de incluir análisis multivariados (Sorenmo et al., 2011).

Los ganglios linfáticos aumentados deben ser identificados y posteriormente debe realizarse una punción con aguja fina para analizar por medio de citología el contenido de éstos, y así descartar una metástasis.

Se deben realizar por lo menos tres radiografías torácicas, ya que uno de los principales sitios de metástasis es el pulmón, sin embargo, en caso de presentar algún síntoma de metástasis en algún otro sitio, deben hacerse las pruebas diagnosticas correspondientes (Fidler & Brodey, 1967).

El estadio de TMC se identifica por medio de 2 sistemas; el sistema de estadio WHO (World Health Organization) original y el modificado; tomando en cuenta el criterio del sistema TMN. La diferencia entre el original y el modificado es que en el caso del original existen sólo 4 estadios; caninos con un TMC clasificados T1 son estadio II así, como también los T2 a pesar del estado de sus ganglios linfáticos. Los pacientes con metástasis son categorizados como estadio IV sin importar los ganglios linfáticos y el tamaño del tumor. En el caso del sistema modificado, los pacientes con ausencia de alteraciones en los linfonodos y sin presencia de metástasis son categorizados en estadio I,II,y III dependiendo del tamaño del tumor respectivamente. Cada paciente con aumento en linfonodo regional es clasificado en estadio IV, y cada paciente con metástasis, es estadio V, sin tomar en cuenta el tamaño del tumor.

El Diagnóstico y estadio del tumor se dan por medio del análisis histopatológico. Si existen tumores múltiples, deben ser evaluados individualmente(Sleeckx et al., 2011)(Tabla 3).

<b>Tabla 2. Clasificación de tumores mamarios caninos por medio del sistema TNM</b>		
<b>T: Tumor Primario</b>	<b>N: Linfonodo</b>	<b>M: Metástasis</b>
T1: Tumor <3cm	N0: No hay aumento de linfonodos	M0: Sin evidencia de metástasis
T2: Tumor 3-5cm	N1: metástasis en linfonodos ipsilaterales	M1: Metástasis
T3: Tumor >5cm	N2: metástasis en linfonodos contralaterales	

(Augusto, 2014)

<b>Tabla 3. Sistema de estadio WHO (Sorenmo et al., 2011)</b>							
<b>Sistema de estadio WHO Original</b>				<b>Sistema de estadio WHO Modificado</b>			
estadio I	T1a,b,c	N0	M0	estadio I	T1	N0	M0
estadio II	T0, T1a,b,c, T2a,b,c,	NI NI N0 ó NIa	M0 M0 M0	estadio II	T2	N0	M0
estadio III	T3a,b,c Cualquier T	NI Cualquier N	M0 M0	estadio III	T3	N0	M0
estadio VI	Cualquier T	Cualquier N	MI	estadio VI	Cualquier T	NI	M0
estadio V	No existe			estadio V	Cualquier T	Cualquier N	MI

a: no fijo, b: fijado a piel, c: fijado a músculo

El sistema de estadíos basado en tamaño de tumor , ganglios linfáticos y metástasis puede conferir un pronóstico significativo, y así, guiar a los clínicos para tomar la mejor decisión para el paciente.

#### **4.3.4 Clasificación de TMC**

En 1974 la Organización Mundial de la Salud publicó la primera clasificación histopatológica de los tumores en animales domésticos. En este estudio se hace hincapié en que esta clasificación, no puede ser totalmente aceptada por todos los patólogos, pero ayudara a tener una mejor comunicación entre los patólogos y los médicos veterinarios(Beveridge & Sobin, 1974).

En 1996 se realizó un estudio en Tokio donde se agruparon los tumores caninos mamarios malignos en 4 grupos histopatológicos, con el propósito de tener un pronóstico para los pacientes(Yamagami, Kobayashi, Takahashi, & Sugiyama, 1996). En el 2011, Goldschmidt presenta una nueva clasificación en base a 2 anteriores, incluyendo tumores, que se han identificado como variantes malignos de previos tumores benignos como el tipo cribiforme de carcinoma simple y comedo-carcinoma, así como los nuevos tumores que no habían sido identificados, como el Carcinoma Micropapilario

Los tumores malignos se caracterizan por tener pérdida ó discontinuidad de la membrana basal, además de la presencia de necrosis, mitosis, anaplasia y pleomorfismo nuclear.

Los tumores benignos carecen de una invasión de crecimiento y normalmente se encuentran encapsulados(Goldschmidt, Peña, Rasotto, & Zapulli, 2011).

#### **4.3.5 Biomarcadores y pronóstico de TMC**

En el tumor mamario canino, se ha identificado la expresión de distintos tipos de genes encargados del crecimiento del tumor como el factor de crecimiento epidérmico, los inhibidores de crecimiento, los encargados de la proliferación celular, genes antiapoptóticos, encargados de la reparación del DNA, y los angiogénicos (Klopffleisch et al., 2011).

En humanos, el uso de biomarcadores como rutina en pacientes con cáncer se encuentra evolucionando gradualmente, sin embargo en el campo de la medicina veterinaria, a pesar de que se han encontrado hallazgos significativos, los biomarcadores no se utilizan como rutina en los pacientes; esto puede ser debido a la falta de valor pronóstico de cada biomarcador. Santos en 2013 identificó los marcadores que tienen un alto valor pronóstico, tal es el caso de Ki67 que probó ser el mejor, seguido por MIB-1; con propiedades pronosticas asociadas a proliferación y apoptosis, sin embargo no determina el tiempo de la metástasis. Además se encontró que VEGF no tiene funcionalidad como factor pronóstico(Santos et al., 2013).

Un biomarcador es definido como una característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, proceso patológicos, ó respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Un marcador exitoso para cáncer debe estar asociado a la neoplasia, pero también debe reflejar la respuesta de otros tejidos hacia el mismo(Kycko & Reichert, 2014).

La clasificación para biomarcadores del cáncer se categorizan en biomarcadores diagnósticos; usados para detectar procesos neoplásicos e identificar el tipo de cáncer; biomarcadores pronósticos, que proveen información sobre la posible progresión del tumor, o el inicio del mismo, lo cual nos puede orientar a una terapia adecuada; y los biomarcadores predictivos, que se usan para evaluar la probabilidad de éxito ante una terapia(Kulasingam & Diamandis, 2008).

Las citoqueratinas CK5, CK6, CK7,CK8, CK14, CK17 CK18, CK19, además de actina de músculo liso, calponina, vimentina y p63 son marcadores que permanecen constantes durante la transformación celular y desarrollo de tumor por lo que son proteínas que poseen propiedades esenciales para ser usadas como marcadores de TMC. La expresión de calponina, actina de músculo liso , p63, se han encontrado en TMC simples, en donde la inmunoreactividad incluía células epiteliales neoplásicas además del mioepitelio preexistente; los marcadores basales fueron expresados por una porción de células epiteliales neoplásicas, lo cual es un indicador de componente mioepitelial; indistinguible del epitelio luminal, el cual se marca con CK8



y CK18. La identificación de los tumores con o sin diferenciación mioepitelial pueden ser importantes debido a la participación de las células mioepiteliales en TMC malignos, ya que se consideran como un indicador de pronóstico desfavorable en caninos y humanos(Sorenmo et al., 2011).

El RE es uno de los biomarcadores más significativos en TMC debido principalmente a su etiología de carácter hormonal, además indica pronóstico, diagnóstico y tratamiento. Este receptor se encuentra localizado principalmente en el núcleo de las células de la glándula mamaria y por lo tanto se considera un receptor de tipo nuclear(W. Yang et al., 2006).

El RE funciona como un factor de transcripción ligando dependiente que modula la expresión de una variedad de genes que permiten la proliferación de células neoplásicas, que por lo tanto promueven la progresión del tumor(Nasomyon, Samphao, Sangkhathat, Mahattanobon, & Graidist, 2014).

Sleeckx 2011 afirma que la presencia de RE es significativamente elevada en tumores benignos, comparada a los malignos y que la expresión de RP decrecía progresivamente desde la displasia, hasta tumor maligno(Sleeckx et al., 2011).

Chang en 2005 realizó un estudio en donde se determinó que la mayoría de los tumores benignos eran positivos a RE y RP, pero de los tumores malignos, solo el 50% presentaba RE+ y el 70% RP. Los tumores con ambos tipo de receptores tuvieron una mayor probabilidad de medir menos de 5cm y una menor probabilidad de metástasis (Chang et al., 2005).

Sorenmo encontró que las perras con OVH 2 años después de la escisión del tumor tenían mayor probabilidad de ser RE- y así disminuir el efecto de protector de la OVH (Sorenmo et al., 2011). Mainenti en 2014 afirma que la OVH realizada un año después de la recesión el tumor probó tener una disminución de RE y RP en TMC malignos (Mainenti, Rosoto, Carnier, & Zappulli, 2014).

Beck en 2013 afirma que la disminución de RE está relacionado con tumores de mayor tamaño, y aumento de ganglios linfáticos; relacionado con un mal pronóstico(Beck et al., 2013).

La expresión del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2) se encuentra sobre expresado en tumor de glándula mamaria en el humano y se encuentra asociado a un mal pronóstico(Ferretti, Felici, Papaldo, Fabi, & Cognetti, 2007).En TMC la ausencia de HER2 se encuentra asociada a un mal pronóstico cuando se incluye la negatividad de RE y la expresión de uno de los 3 marcadores basales (P-cadherina, p63,citoqueratina 5)(Gamma, Alves, & Schmitt, 2008).

La expresión de marcadores como ER,RP y HER2 son frecuentemente evaluados en mujeres. Estos resultados realizados por inmunohistoquímica, permiten subdividir los casos de tumor mamario en: tumores luminales: expresando RE y/o RP así como citqueratinas luminales (CK7,CK8, CK18, CK19), tumores basales: negativos para marcadores hormonales y expresando marcadores basales (CK5,CK6,CK14,CK17,calponina, vicentina y p63, y tumores positivos para HER2(Reis-Filho & Tutt, 2008). Esta misma clasificación se ha tratado de aplicar en TMC, pero los subtipos inmunohistoquímicos mencionados anteriormente y la diversidad de su comportamiento biológico no ha podido ser probado hasta la fecha, esto debido a que existen investigaciones contradictorias en cuanto a la expresión de HER2 en carcinomas basales , ya que al ser evaluados, los investigadores usan un panel diferente de marcadores basales y establecen diferentes criterios para definir la positividad. Además estos subtipos no distinguen entre la expresión de componentes epiteliales y mioepiteliales, los cuales son una parte sumamente importante en estos procesos neoplásicos(Sorenmo et al., 2011).

En células normales, cualquier cambio genético o metabólico puede desencadenar una transformación maligna. Estos cambios activan mecanismos biológicos que permiten que se lleve a cabo la apoptosis o muerte celular programada; un daño al ADN, replicación de DNA incorrecta, irregularidades en la progresión del ciclo celular, estrés por hipoxia y la acumulación de proteínas mal formadas son eventos típicos

que activan la cascada y las moléculas pre-apoptóticas o inactivan la anti-apoptóticas.

La proteína P53 se ha identificado como supresor de tumor, es activada por estrés oxidativo, daño al DNA y conduce a un arresto celular, este arresto es mediado por un incremento transcripcional de p21, un inhibidor de ciclina E/Cdk2 en la transición de la fase G1 a fase M(Klopfleisch et al., 2011). Las mutaciones en p53 se asocian a una inactivación en la formación de TMC (Veldhoen, Watterson, Brash, & Milner, 1999). Sin embargo p53 no ha probado hasta el momento ser de valor pronóstico. Se han investigado proteínas involucradas en la cascada de señalización de p53 y se ha determinado una sobre expresión de proteínas antiapoptóticas(BCL2,BCLX,SFRP2),en comparación con las proteínas pre-apoptóticas(BAX,caspasa8,caspasa9),las cuales no mostraban expresión(Klopfleisch et al., 2011).

La regularización de la proliferación celular en células no neoplásicas es regulada por distintas moléculas incluyendo células checkpoint en el ciclo celular, o supresores de tumor.

PTEN es un supresor de tumor con relevancia pronóstica para TMC. PTEN ha probado reducir la proliferación celular, pero está involucrado en la apoptosis y la adhesión celular. En TMC la ausencia de PTEN a sido asociada a una supervivencia del 76% en tumores malignos. PTEN a probado ser un excelente candidato para complementar el pronóstico dado por histopatología(Restucci, Vico, & Maiolino, 2000).

La inestabilidad genómica es fundamental en las células neoplásicas. Los carcinógenos como la exposición a la luz UV son la causa principal de daño al ADN, esto ocurre también en células no neoplásicas, sin embargo existe una red de sensores de daño al ADN, y enzimas reparadoras del daño, que impiden que el daño se efectúe. Mutaciones e inactivación epigenética de ADN impiden que éstos mecanismos cumplan su función, desencadenando una neoplasia(Klopfleisch et al., 2011).

Entre el 5 y 10% de los tumores mamarios en el humano se consideran hereditarios, esto se atribuye a mutaciones en genes susceptibles a cáncer de mama BRCA1 y BRCA2, sin embargo en el canino éstas características heredables no han probado ser similares(Rivera et al., 2009).Estas proteínas pertenecen a un grupo de genes supresores de tumor y juegan un papel crítico en la reparación de DNA(Klopfleisch et al., 2011). Rivera utilizó Springle Spaniel Ingles para analizar 10 genes principales involucrados en tumor mamario en mujeres, incluyendo BRCA 1 y BRCA2; concluyó que éstos dos genes se encontraban relacionados con TMC en ésta raza específica(Rivera et al., 2009).Nierto en 2003 afirmó que la expresión de BRCA1 por inmunohistoquímica se encuentra más reducida en el núcleo, comparada con la expresión en el citoplasma, en TMC maligno, sin embargo cambios en la localización ó expresión no se asocian con variables clínico-patológicas (Nierto et al., 2003).

El efecto reparador de DNA de BRCA es mediado por la activación de BCRA1 y BCRA2 con proteínas reparadoras de DNA. Existen genes involucrados en la señalización de BRCA, pero solo RAD51 ha sido analizado en TMC. Una sobre expresión de RAD51 y BRCA2 fue encontrada en TMC metastático, lo que indica que los TMC malignos sufren una inestabilidad genética debido a una causa desconocida(Klopfleisch et al., 2011).

Durante la carcinogénesis las proteínas de unión célula-célula juegan un papel fundamental, ya que cuando ésta red de proteínas se ve modificada, resulta en una ruptura barrera, lo que permite una metástasis y progresión del tumor. Cambios en la expresión de éstas proteínas de unión han sido asociados a invasión de células neoplásicas a vasos sanguíneos, extravasación a órganos diana distantes, formación de metástasis y separación de células tumorales primarias(Makrilia, Kollias, Manolopoulos, & Syrigos, 2009).

Las caderinas son glicoproteínas transmembrana con un dominio extracelular responsable de la interacción célula-célula, un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático que está unido al citoesqueleto(Weheelock & Johnson, 2003). La mayoría de los estudios centra su atención en E-caderina ya que ésta es la proteína

principalmente expresada por células epiteliales; se encuentra en la membrana basolateral, en uniones adherentes (Klopfleisch et al., 2011).

En la glándula mamaria normal, las células epiteliales polarizadas se encuentran rodeando los ductos y alvéolos, expresando E-caderina lo que permite que se mantengan unidas. En contraste, las células mioepiteliales expresan P-caderina y no E-caderina (Gama, Paredes, Albergaria, Gartner, & Schmitt, 2004). La mutación de ésta molécula resulta en un desarrollo y progresión del tumor. Los TMC diagnosticados como carcinomas indiferenciados metastáticos e invasivos muestran una ausencia de E-caderina, comparado a la expresión en carcinomas bien definidos; esto sugiere que E-caderina juega un papel importante en la transformación maligna del tumor. (Gama, Paredes, Gartner, Alves, & Schmitt, 2008). En tumor mamario canino existe una correlación significativa entre la expresión de P-caderina y un elevado estadio de tumor, sugiriendo que la expresión de ésta molécula es un marcador de agresividad biológica para TMC (Klopfleisch et al., 2011).

La angiogénesis es un proceso fundamental en la carcinogénesis ya que contribuye al rápido crecimiento del tumor por medio de la suplementación de nutrientes, oxígeno, metabolitos y la creación de una vía de acceso para la metástasis. Éste proceso se lleva a cabo gracias a la acción de factores pro-angiogénicos y antiangiogénicos en las células endoteliales o estromales (Klopfleisch et al., 2011). El estimulador de la angiogénesis más estudiado es VEGF, ésta proteína es sintetizada y localizada en los gránulos citoplasmáticos de células epiteliales neoplásicas, endoteliales y estromales. Esta expresión citoplasmática varía de acuerdo al tipo histopatológico; en el caso de los TMC benignos, la expresión citoplasmática fue muy pobre comparada a la de los malignos.

La expresión de VEGF ha sido asociada solamente al estadio del tumor y no a otros factores clínico-patológicos, como el tamaño del tumor, la invasión de linfonodos, etc. (Al-Dissi, Haines, Singh, & Kidney, 2010).

#### **4.3.6 Tratamiento para TMC**

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección para todo tipo de TMC. La resección completa del tumor permite su diagnóstico por histopatología, además, de

ser puede ser curativa, siempre y cuando el tumor sea primario y la cirugía cuente con márgenes limpios.

Antes de realizar la cirugía es importante tener en cuenta el tamaño y la localización del tumor, si el tumor es movable y si hay tumores múltiples.

Las diferentes técnicas quirúrgicas incluyen: lumpectomía, que consiste en retirar el tumor y parte del tejido circundante, mastectomía simple, en la cual se retira la glándula mamaria completa, regional, que consiste en la exéresis de varias mamas y del ganglio linfático correspondiente de acuerdo con la ruta de drenaje linfático, dependiendo de las mamas afectadas; unilateral, en la cual se retiran todas las glándulas mamarias de una línea, y la bilateral que consiste en retirar todas las glándulas (Sleeckx et al., 2011). En un estudio se encontró que el 58% de las perras con TMC maligno extraído por medio de una mastectomía regional desarrolló un segundo tumor en una glándula ipsilateral, por lo que se concluyó que los tumores malignos debía retirarse con una mastectomía bilateral. Las lumpectomías se encuentran reservadas para los tumores menores de 0.5 cm movibles y benignos. Para los tumores más grandes y localizados dentro de una glándula única, se debe considerar una mastectomía simple (Stratmann, Failing, & Richter, 2008).

El 50% de las perras que presentan TMC benigno tienen una cura total después de el tratamiento con cirugía, sin embargo, el 50% restante que presenta TMC maligno presenta una micrometástasis al momento de la cirugía por lo que éste tratamiento no es suficiente (Sleeckx et al., 2011).

La radioterapia aún no ha sido evaluada como un tratamiento en TMC, pero puede ser una sugerencia para pacientes con una resección completa de tumor, ó metástasis (Sorenmo, 2003).

La desmopresina es un sintético derivado de la hormona antidiurética, con propiedades homeostáticas; es utilizada en perros con diabetes insípida.

Hermo reporta una supervivencia total, y libre de enfermedad después de la administración de éste compuesto a una dosis de 1 µg/kg vía intravenosa 30 minutos

pre quirúrgica, y 24 horas post- quirúrgica, sin hallazgos de efectos adversos(Hermo et al., 2008).

El mecanismo de acción de éste compuesto es aún desconocido, pero se tiene la hipótesis de que puede inhibir la metástasis al reducir la adherencia de células neoplásicas en la microvasculatura. Se requieren más estudios para corroborar que el uso de desmopresina en TMC es efectivo(Sleeckx et al., 2011).

El uso de Goserelina, un agonista de la hormona luteinizante , ha probado tener un efecto positivo en el tratamiento de mujeres con tumor mamario hormona-dependiente(Bajetta et al., 1994). En caninos tratados con goserelina, los niveles de estradiol y progesterona se reducen, así como el tamaño del tumor, sin efectos adversos. Sin embargo se requieren estudios con una mayor cantidad de pacientes para comprobar el éxito de éste compuesto (Sorenmo et al., 2011).

En el ámbito de la oncología veterinaria, los atiprogestágenos pueden tener un efecto positivo en TMC positivos a RP. Aglepristone, es un bloqueador de progesterona que comúnmente es usado en caninos para inducir aborto ó parto. Este compuesto ha funcionado para disminuir la proliferación en perras con TMC positivo a RP(Fieni, 2006).

Las respuestas clínicas al tratamiento con moduladores de RE como Tamoxifen, una droga no esteroidea antiestrógeno; ha probado ser significativamente mejor en pacientes con tumores que expresan RE y RP en el humano(Sleeckx et al., 2011), sin embargo ésta droga antiestrógeno no ha probado tener un efecto antitumoral en el canino (Beck et al., 2013).

El 25% de las perras con TMC no pueden ser exitosamente tratadas con cirugía, por lo que es conveniente contar con un quimio-terapéutico adyuvante en estos casos. Sin embargo la información de éstos compuestos es limitada en dosis , toxicidad y eficiencia.

El uso de ciclofosfamida en combinación con 5-fluorouracilo ó en combinación con mitoxantron y vincristina, ha permitido incrementar la supervivencia, con escasos efectos adversos (Clemente, De Andres, Pena, & Perez Alenza, 2009).

Se ha documentado que perras tratadas con cirugía y una combinación de ciclofosfamida y 5- fluorouracilo presentan una mayor tasa de supervivencia, contrario a los tratamientos realizados con doxorubicina, docetaxel ó gemcitabin, los cuales no mostraron tener algún beneficio en el tratamiento contra TMC(Augusto, 2014).

Los tratamientos anteriormente mencionados, exceptuando la cirugía, aún se encuentran en fase experimental en medicina veterinaria(Sleeckx et al., 2011).

#### **4.4 WT1 Tumor de Wilm's**

El gen WT1 se identificó y clonó por primera vez en el tumor de Wilm's, un nefroblastoma pediátrico que afecta a niños menores de 5 años de edad y afecta 1 de cada 10,000. Debido a su naturaleza pediátrica, se cree que éste tumor se desarrolla a partir de un desarrollo erróneo durante la embriogénesis.

El tumor de Wilm's es usualmente asociado a otras anomalías congénitas tal es el caso del síndrome de WARG, de Denys-Drash, Frasier y Beckwith-Wiedemann los cuales se caracterizan por presentar: WT1, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental. (Call et al., 1990).

##### **4.4.1 WT1 en embriogénesis**

Durante la embriogénesis WT1 juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema genitourinario, principalmente en el epitelio que dará origen a los podocitos, mesénquima renal, epitelio glomerular y gónadas fetales(Fernández, Figueroa, & Pérez, 2009). Sin embargo, la evidencia sugiere que WT1 se encuentra expresado en otros órganos, tales como, útero, bazo, hígado, timo, áreas del cerebro, médula espinal, corazón y glándulas adrenales(Scharnhorst, Van Der, & Jochemsen, 2001).



En etapas adultas la expresión de WT1 se observa en el sistema genitourinario, sistema nervioso central y tejidos involucrados en la hematopoyesis, incluyendo la médula ósea y los ganglios linfáticos(L. Yang, Han, Suarez-Saiz, & Minden, 2007).

#### **4.4.2 Estructura de WT1**

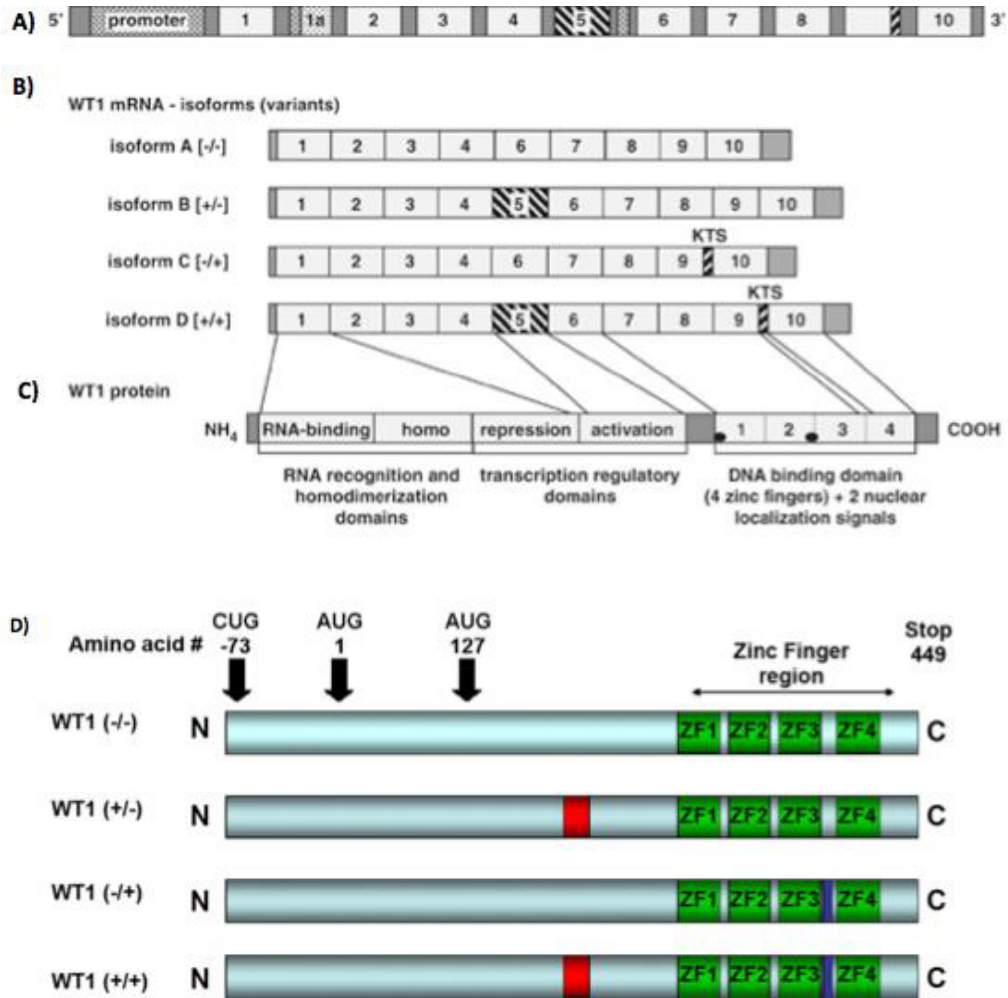
.En humanos éste gen se encuentra localizado en el cromosoma 11p13, codifica para 10 exones y genera un ARNm de 3kb.

La proteína WT1 posee un dominio N-terminal que se encuentra constituido de secuencias ricas en prolina y glutamina, éste dominio es de gran importancia, ya que debido a sus dominios de represión y activación génica, se lleva a cabo la función transcripcional regulatoria del gen. El dominio C- terminal, está constituido de 4 dedos de zinc, el cual es crítico para la unión de ADN y las interacciones de ARN y proteínas(Scharnhorst et al., 2001).

En mamíferos el exón 5 y 9 sufren un corte y empalme alternativo, la inclusión de exón 5 inserta 17 aminoácidos entre la porción de prolina-glutamina y los 4 dedos de zinc. En el caso del exón 9, se insertan 3 aminoácidos; lisina, treonina y serina, (KTS)incluidos entre el dedo de zinc 3 y 4.Estos splicing dan lugar a 4 principales isoformas, WT1 + / + (presencia17aa y KTS), + / - (17aa/ausencia de KTS), - / + (ausencia 17aa/ KTS presente) y - / - (17aa/KTS ausente). La isoforma WT1(+ / +) es la más predominante en el humano, siendo al isoforma (- / -) la menos frecuente(Scharnhorst et al., 2001). Debido a otras alteraciones en el proceso de transcripción y de la presencia de 3 distintos sitios de inicio de la traducción, se generan isoformas de diferentes tamaños; el inicio en el codón CUG genera una isoforma de entre 60-62kDa, en el codón AUG posición 0, de 52 a 54kDa, y el inicio en el codón8 AUG posición 127 que genera una isoforma de 36-38kDa(L. Yang et al., 2007)(Fig2.)

La inserción de los 3 aminoácidos KTS forma un espacio entre el tercer y cuarto dedo de zinc permitiendo así la represión o activación de una amplia gama de genes, dependiendo de las características del promotor y del tipo celular(Nakagama, Heinrich, Pelletier, & Housman, 1995).

La isoforma KTS+ se relaciona con procesos de maduración de RNA, mientras que KTS- se asocia al proceso de transcripción, induce el arresto celular por medio de la activación de la proteína 21 y tiene una mayor afinidad al DNA(Herrera et al., 2004).



**Figura 2.** Estructura de WT1 A) presentación de los 10 exones presentes en el ARNm, B) demostración de las 4 principales isoformas y sus splicing alternativos en sus exones correspondientes, C) Porción amino terminal con sus dominios, dominio de unión a ADN, dominio de represión y activación de genes. Porción carboxilo terminal con 4 dedos de zinc y su dominio de unión a ADN D) Presentación de las isoformas de acuerdo al sitio de inicio de la traducción (Scharnhorst et al., 2001).

Las mutaciones de wt1 en Tumor de Wilm's se presentan en un 15%, por lo que se le describió como un gen supresor de tumor, sin embargo estudios actuales han determinado que la expresión de WT1 se presenta en una gran variedad de

neoplasias en el humano(leucemias y tumores sólidos), por lo que se ha postulado que puede funcionar como un oncogén en este tipo de tumores.

La presencia de los 4 dedos de zinc le dan a WT1 la principal función de regular la transcripción de genes importantes involucrados en proliferación ó arresto celular, diferenciación sexual, diferenciación celular y apoptosis. (Tabla 4) (L. Yang et al., 2007).

<b>GEN BLANCO</b>	<b>EFEECTO</b>
<b><u>Factores de crecimiento</u></b>	
Anfiregulina	Activación
Factor estimulante de colonias-1	Represión
Factor de crecimiento de insulina II	Activación/represión
Factor de crecimiento de plaquetas	Activación/represión
Factor de crecimiento transformante- $\beta$	Represión
<b><u>Receptores</u></b>	
Receptor de andrógeno	Represión
Receptor de factor de crecimiento epidermal	Represión
Receptor de insulina	
Receptor de factor de crecimiento de insulina 1	Represión
Receptor alfa del ácido retinoico	Represión
	Respresión
<b><u>Enzimas</u></b>	
Transcriptasa reversa de la telomerasa humana	Represión
Descarboxilasa de ornitina	Represión
<b><u>Factores de transcripción</u></b>	
C-Myb	Represión
C-Myc	Activación/represión
Cliclina E	Represión

Cliclina G1	Activación
P21	Activación
Pax-2	Represión
<b><u>CME</u></b>	
E-cadherina	Incremento
Trombospondina 1	Represión
Sindecano 1	Activación
<b><u>Otros</u></b>	
Wnt-4	Activación
Bcl-2	Activación/represión
Eritropoyetina	Activación

**Tabla 4** . Genes blanco transcripcionales de WT1(L. Yang et al., 2007)

La sobreexpresión de WT1 se ha detectado en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica aguda y síndromes mielodisplásicos, así como en diferentes tipo de tumores sólidos, lo que sugiere su papel como un oncogén(Scharnhorst et al., 2001).

En el caso de leucemia, la sobreexpresión de WT1 se ha relacionado con un pronóstico desfavorable. En leucemia linfocítica aguda se ha considerado a WT1 como un antígeno tumoral ya que se encuentra sobreexpresado 10 veces más que en células normales. La expresión de Wt1 en tumores sólidos se ha utilizado como un factor pronóstico(Sugiyama, 2010).

#### **4.4.4 Inmunohistoquímica de WT1**

WT1 se encuentra expresado en núcleo y citoplasma. El epitelio de la glándula mamaria se encuentra separado del estroma, por células mioepiteliales y membrana basal. Las rupturas de éstas dos láminas son cruciales para el inicio de la carcinogénesis en cáncer de mama.

WT1 se encuentra expresado en células mioepiteliales y epiteliales(Hua Li & Man, 2009).

La detección inmunohistoquímica de WT1 se encuentra principalmente en el núcleo de las células tumorales en el tumor de Wilm's y el mesotelioma; es por esto que WT1 ha sido usado como marcador diagnóstico en estas neoplasias.

La tinción citoplasmática de Wt1 no ha sido evaluada en la mayoría de los tumores, esto se debe a que su función transcripcional regulatoria se lleva a cabo en el núcleo, sin embargo, estudios recientes afirman que Wt1 se encuentra involucrado en el metabolismo de ARN y la regulación de la traducción en el citoplasma. Por lo tanto la detección aberrante de WT1 en citoplasma de las células tumorales, puede alterar las propiedades de éstas a partir de la regulación de expresión de genes.

En un estudio realizado por Nakatsuka et. al en 2006, se detectó WT1 por medio de inmunohistoquímica en 494 tumores, los cuales incluían tumores gastrointestinales, pancreáticos, del tracto urinario, órganos genitales masculino y femenino, pulmón, cerebro, piel , tejidos blandos y hueso. Por medio de anticuerpos monoclonales (6F-H2) y policlonales (C-19) se determinó que la inmuno-detección de WT1 en el citoplasma debe ser tomada en cuenta para futuros diagnósticos. Además se encontró que pueden existir diferencias entre los anticuerpos usados ya que los anticuerpos monoclonales reconocen la porción aminoterminal de WT1, y debido a las diferentes isoformas resultantes del splicing alternativo, los resultados pueden ser variables(Nakatsuka et al., 2006).

#### **4.4.5 WT1 en cáncer de mama en humano**

WT1 se ha evaluado como biomarcador en cáncer de mama en el humano. Debido a que el tejido mamario sufre cambios conformacionales en diferentes etapas, cualquier alteración a nivel molecular puede favorecer la carcinogénesis.

Wt1 es un regulador transcripcional de múltiples genes encargados de la proliferación y crecimiento celular.

Silberstein et al. evaluó la expresión de WT1 por inmunohistoquímica y RT-PCR, donde determinó que la expresión de WT1 era nula tanto en tejido mamario normal como en células neoplásicas (Silberstein, Van Horn, Strickland, & Roberts, 1997).

Loeb et. al obtuvo resultados contrarios a los anteriores ya que detectó la presencia de WT1 en células neoplásicas, específicamente carcinomas y una ausencia de WT1 en tejido mamario normal. Por lo que concluyeron que WT1 probablemente no tenía la propiedad de supresor tumoral en este tipo de neoplasia(Loeb et al., 2001).

Miyosi et. al determinó que la expresión de WT1 en cáncer de mama esta relacionado con un mal pronóstico(Miyoshi et al., 2002).

Reizner et al. concluyeron que la expresión de WT1 suspendía el efecto de RE, por lo que se cree que existe una correlación negativa, sin embargo se requieren más estudios para determinar la regulación entre RE y WT1(Reizner et al., 2005)

Tuna et al encontraron que HER2 se acopla a Akt para incrementar la expresión de WT1 y que WT1 estimula la fase G1 del ciclo celular e inhibe apoptosis en los pacientes que sobre expresan HER2, gracias a la ciclina D y a la proteína bcl2(Tuna, Chavez, & Tari, 2005)

Un estudio realizado por Han et.al en células neoplásicas de mama indica que WT1 puede actuar como dominante negativo, ya que su porción carboxilo terminal con sus dedos de zinc permite la unión al promotor de WT1, contrario a su porción amino terminal. Esta porción carboxilo terminal reprime la expresión de bcl2 y c-myc(Han, San Marina, Yang, Koury, & Minden, 2007)

Zapata Benavides determino que el silenciamiento de WT1 provoca una disminución en la proliferación celular, y lo clasifica como un blanco terapéutico(Zapata, Tuna, Berestein, & Tari, 2002).

Hua Li et al. realizó un estudio en donde evaluó la inmuno-detección de WT1 y encontró que las células mioepiteliales positivas a WT1 y la inmuno reactividad

disminuía con la progresión del tumor y que la pérdida de la heterocigocidad de WT1 se relaciona con una progresión en cáncer de mama(Hua Li & Man, 2009).

#### **4.4.6 WT1 En caninos**

Existen sólo dos reportes de WT1 en caninos.

Ichimura et al. reportaron un tumor estromal de cordones sexuales constituido de luteoma y una porción de células de Sertoli. WT1 fue positivo para la porción de luteoma principalmente en el núcleo, mientras que las células de Sertoli carecieron de inmunoreactividad para WT1, Por lo que se concluyó que la ausencia de Wt1 en éstas células determina la diferencia de fenotipo(Ichimura et al., 2009).

Kothapalli et. al evaluó si las mutaciones de WT1 se relacionaban con la transcripción del gen SRY en sin obtener resultados positivos(Kothapalli, Kirkness, Pujar, & Wallen, 2004).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Recolección de muestras de tumor mamario canino**

La recolección de muestras de tumor mamario canino se realizó en distintas clínicas veterinarias de pequeñas especies del área metropolitana de Monterrey Nuevo León. El protocolo fue avalado por el comité de bioética y bienestar animal de la FMVZ UANL.

Se realizó también la recolección de tejido mamario normal y riñón para usar como controles en el antirrábico de Monterrey Nuevo León.

La muestra fue dividida en 2 partes, una de las cuales fue colocada en un frasco con formaldehído al 10% para realizar el diagnóstico histopatológico y la otra se almacenó en congelación a -20°C para realizar extracción de ARN.

Cada muestra recolectada fue identificada con la edad del Paciente y presencia o ausencia de ovario histerectomía. Además de los datos de la clínica veterinaria de la cual se recolectó la muestra.

## **5.2 Diagnóstico por histopatología**

Las muestras de TMC fueron fijadas con formaldehído al 10%, durante 24 horas y lavadas con agua destilada durante 3 minutos. Posteriormente se realizó el proceso de deshidratación con alcoholes a concentraciones de 70%, 90%, 96% y 100% durante 10 minutos en cada uno. Las muestras se aclararon con xilol durante 10 min. y se colocaron en un bloque con parafina líquida en estufa a 60° durante 2 horas. Se realizaron los cortes seriados de 5mm cada uno y se colocaron en el portaobjetos. El tejido se desparafinó primeramente con xilol durante 5 minutos y posteriormente con etanol a concentraciones de 100%, 96% y 80% durante 10 minutos cada uno. El tejido se lavó con agua destilada y se tiño con la técnica convencional de Hematoxilina y Eosina. La deshidratación se realizó con etanol a concentraciones de 80%, 96%, 100% y xilol durante 10 minutos cada uno.

El análisis patológico fue realizado por el Dr. Rafael Ramírez Romero

## **5.3 Extracción de ARN por el método de TRIZOL**

Se colocaron 50mg de muestra en un tubo con 1ml de trizol® Reagent(Life Technologies, Invitrogen)™. Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionó a cada tubo 200µl de cloroformo, el cual mezcló por inversión (3-6 veces). Posteriormente las muestras se centrifugaron a una velocidad de 12,000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos y se tomó la fase superior (sin color) de las 3 fases, la cual se transfirió a un tubo. A continuación se precipitó el ARN, agregando a cada tubo 500µl de isopropanol y se mezcló por inversión (3-6 veces). Los tubos se incubaron 15min a temperatura ambiente, se centrifugaron 12,000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla en el fondo del tubo se lavó con 1ml de etanol al 75% y se centrifugó 12,000r.p.m. por 5min a 4°C. Finalmente se eliminó el alcohol y el paquete de ARN se re suspendió en un volumen de 20µl de agua DEPC y se almacenó a -70°C. Se determinó la concentración y la



integridad de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (EPOCH) y por electroforesis 90 Volts durante 15 minutos en un gel de agarosa al 0.8% .

#### **5.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

Se preparó para cada muestra, un tubo eppendorf de 1.5ml que contenía: 5µg de ARN, 1µl de dNTP's (10mM), 1µl de Oligo dT (0-05µg/µl) (Life Technologies, Invitrogen)<sup>TM</sup> y se aforó hasta un volumen de 12µl con agua grado molecular libre de nucleasas. Los tubos se incubaron en un termoblock sin agitación a 65°C por 5min. Después se adicionó a cada uno: 4µl de buffer de la enzima RT 5X, 2µl de DTT (100Mm) y 1µl de inhibidor de ARNsas (Life Technologies, Invitrogen)<sup>TM</sup> y se incubaron a 42°C por 2-3min sin agitación. Posteriormente se agregó a cada tubo 1µl de la enzima Transcriptasa Reversa (RT) (200U) (Life Technologies, Invitrogen)<sup>TM</sup> y se incubaron a 42°C por 50min. Sin agitación. Para finalizar la reacción, se aumentó la temperatura a 70°C por 15min y el ADNc obtenido se almacenó a -20°C.

#### **5.5 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y expresión de WT1**

1µ de ADNc obtenido se amplificó utilizando una solución que contenía 2.5 U (0.5µl) de Taq ADN polimerasa, 5µl de Buffer de reacción 5x MyTaq (BIOLINE<sup>TM</sup>) con 2.5mM dNTP's y 7.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 25ng (0.5µl) del primer: Fw5'GAGAAACCATACCAGTGTGA'3, 25ng (0.5µl) del primer Rw5'GTTTTACCTGTATGAGTCCT'3 (Brouillette, Andrew, & Venta, 2000). La solución se aforó con agua DEPC hasta un volumen de 25µl. La amplificación se realizó comenzando con una desnaturalización inicial de 94° por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C durante 2 minutos y extensión de 72°C durante 3 minutos, finalizando con una extensión final de 72°C durante 10 minutos (Brouillette et al., 2000) utilizando un termociclador PCR CAP 96X0.2ml (Maxygene). Los primers de WT1 amplificaron un fragmento (800 pb). Para amplificar el fragmento de ADNc de b-actina de canino se utilizaron las mismas condiciones y reactivos con los primers Fw5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA3' y Rw5'GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC3'. El control positivo utilizado para éstos

primers fue DNA obtenido a partir de sangre de canino. La amplificación se realizó comenzando con una desnaturalización inicial de 94° por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 59.6°C durante 30 segundos y extensión de 72°C durante 40 segundos, finalizando con una extensión final de 72°C durante 10 minutos, utilizando un termociclador PCR CAP 96X0.2ml (Maxygene). Los primers de b-actina amplificaron un fragmento (200pb). Posteriormente los productos de WT1 y b-actina de PCR se analizaron por electroforesis 90V 1:30 horas en un gel de agarosa al 1 % .

### **5.6 Secuenciación del gen WT1**

Los productos de PCR de 3 muestras (glándula mamaria sana, tumor mixto benigno y carcinoma simple) se secuenciaron por medio de la compañía MacroGen Usa(330 Piccard Drive,Suite 205Rockville, MD 20850). Las secuencias se editaron por medio del programa Serial Cloner 2.6.

### **5.7 Inmunohistoquímica para el análisis de la expresión del gen WT1**

La inmunohistoquímica se llevó a cabo por medio del servicio de Anatomía y Citopatología del Hospital Universitario “DR. José Eleuterio González.

6 bloques de parafina fueron sometidos a tinciones de inmunohistoquímica (osteosarcoma, carcinoma, tumor mixto benigno, adenoma, riñón y glándula mamaria sana) con el anticuerpo monoclonal para WT1 con la técnica cualitativa de estreptoavidina biotina.

### **5.8 Correlación entre expresión de WT1 y el tipo histopatológico**

El análisis estadístico usado para medir la correlación se realizó por medio de una tabla de contingencia ó prueba de Chi-cuadrada. Este análisis se realizó por medio del software SPSS.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recolección de muestras de TMC

Se recolectaron 17 biopsias de TMC en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Los datos recolectados de la historia clínica mostraron una media poblacional de 10 años de edad, un total de 26% de hembras castradas y un 74% de hembras enteras que presentaron TMC.

### 6.2 Análisis histológico mediante la tinción convencional de Hematoxilina y eosina de las biopsias de TMC

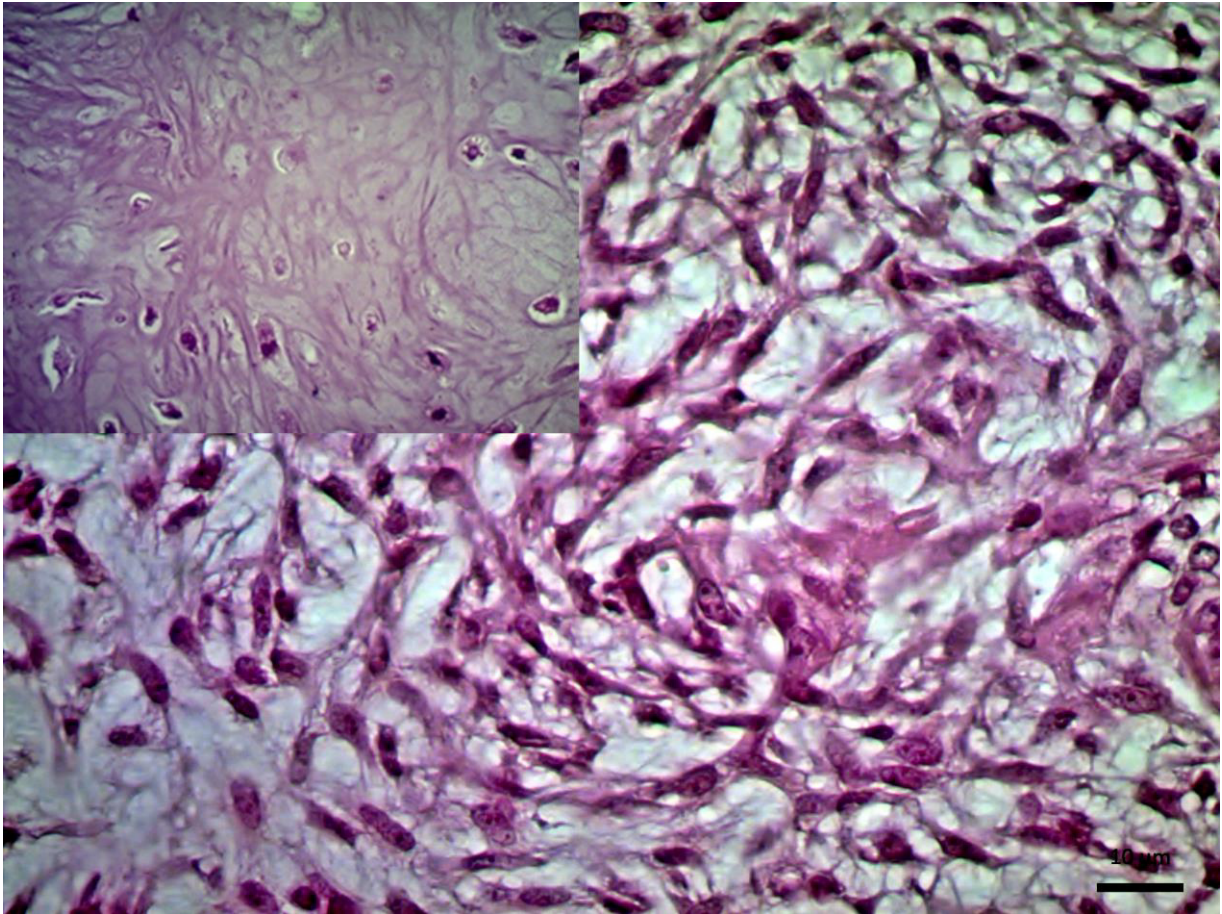
Al analizar las 17 muestras, 15 de éstas se diagnosticaron como TMC, 9 clasificados como benignos y 6 malignos, representando el 60% y el 40% respectivamente. Las 2 muestras restantes que se recolectaron, desarrollaban características morfológicas propias de TMC, sin embargo al realizar el diagnóstico por histopatología se clasificaron como inflamación piogranulomatosa y quiste folicular infundibular. El 55.55% de las muestras diagnosticadas como malignas provenían de hembras enteras y el 44.44% de hembras castradas, mientras que el 100% de las muestras diagnosticadas como malignas provenían de hembras enteras (tabla 5).

Número de Muestra	Edad	Castrada/Entera	Diagnóstico
1	9	*Castrada	Mixto benigno
2	11	*Castrada	Mixto benigno
3	9	º Entera	Mixto benigno
4	15	º Entera	Adenoma complejo
5	5	º Entera	Adenoma mixto
6	8	º Entera	Adenoma simple
7	11	*Castrada	Adenoma

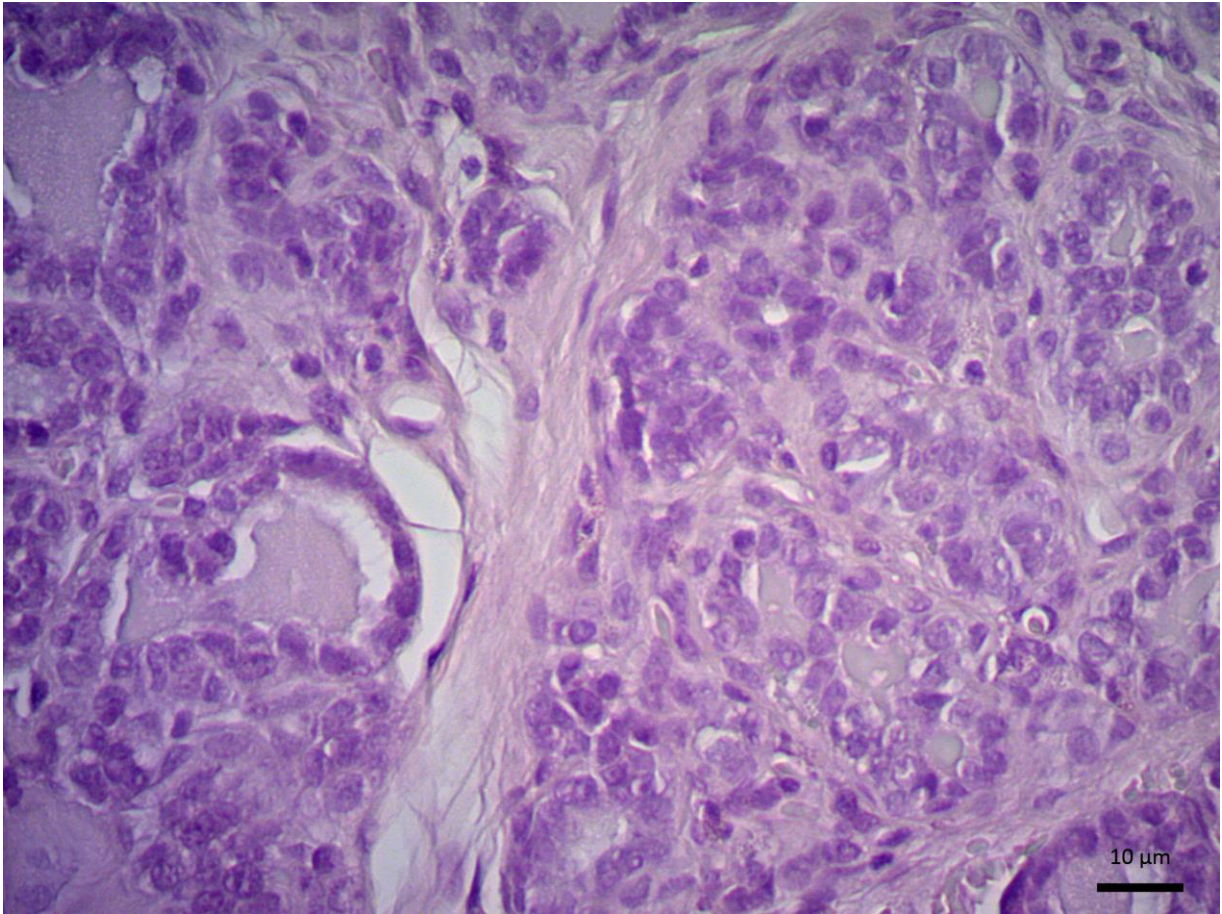
8	4	º Entera	Mixto benigno
9	11	*Castrada	Mixto benigno
10	11	º Entera	Carcinoma mioepitelial
11	13	º Entera	Osteosarcoma
12	13	º Entera	Carcinoma escamoso
13	11	º Entera	Carcinoma sólido
14	8	º Entera	Carcinoma simple
15	15	ºEntera	Carcinoma sólido
16	8	º Entera	Inflamación piogranulomatosa
17	11	*Castrada	Quiste folicular infundibular

**Tabla 5.** Biopsias de TMC recolectadas ,diagnóstico histopatológico, y datos clínicos (1-9) TMC Benigno, (10-15) TMC Maligno, (16 Y 17) Biopsia no tumoral, (\*) Hembras castradas, (º) Hembras enteras.

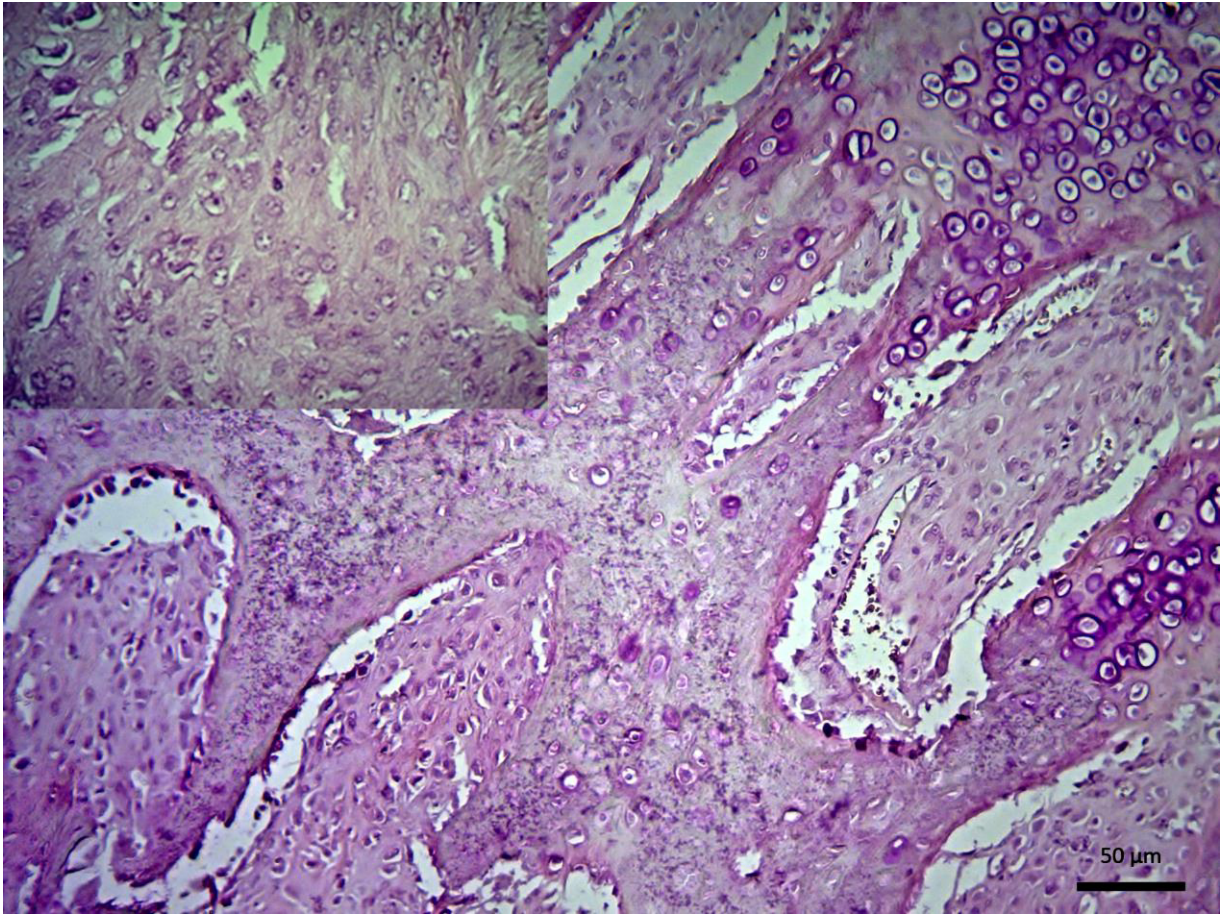
Se diagnosticaron 4 tipos de TMC: tumor mixto benigno(Figura3) y adenoma simple (figura 4) clasificados como tumores benignos. Carcinoma (simple, sólido y escamoso ) (Figura 5) y osteosarcoma (Figura 6) clasificados como tumores malignos.



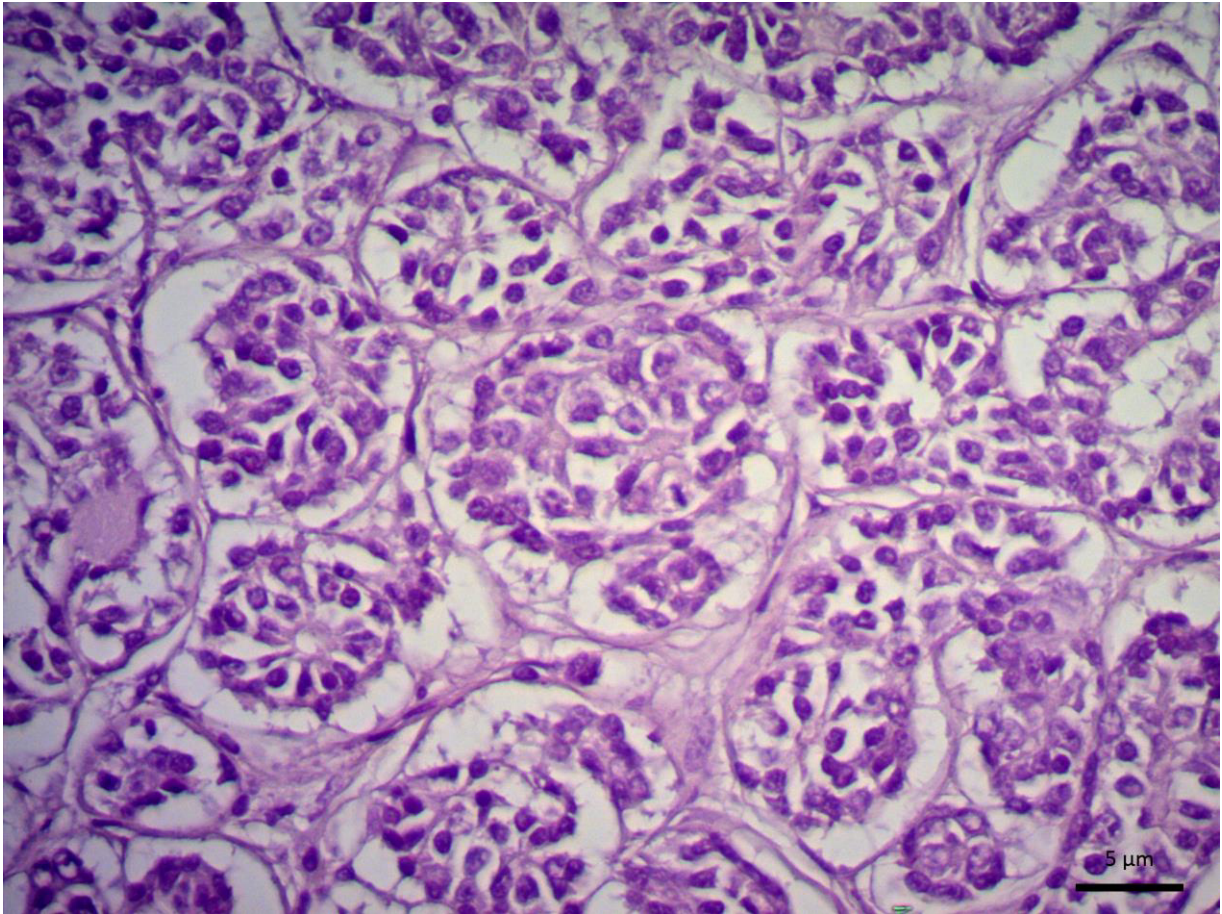
**Figura 3.** Canino, hembra, glándula mamaria, tumor mixto de glándula mamaria. Se aprecia una zona de celularidad, una matriz mucinosa y una temprana formación condroide. H&E, barra: 10µm. En el recuadro se aprecia una zona del mismo tumor con mayor diferenciación condroide. H&E, 400x.



**Figura 4.** Canino, hembra, glándula mamaria, adenoma simple. El patrón glandular se muestra en orden y las células cuboidales aparecen con polaridad hacia su membrana basal formando acinos. Sin embargo, hay zonas en las que el epitelio muestra desorden y proyecciones hacia el lumen H&E, barra: 10 $\mu$ m.



**Figura 5.** Canino, hembra, glándula mamaria, osteosarcoma. Las trabéculas óseas están bien definidas pero su aspecto es inmaduro. Hay osteoblastos en los márgenes y amplias lagunas en matriz. Hay una zona en la parte superior con cartílago en mineralización. El componente sarcomatoso invade las trabéculas y tiene un marcado pleomorfismo. H&E, barra: 50  $\mu\text{m}$ . En el recuadro hay un remanente mioepitelial con marcado pleomorfismo, cariomegalia, citomegalia, células binucleadas, nucléolos prominentes y figuras con cromatina aberrante. H&E, 400x.



**Figura 6.** Canino, hembra, glándula mamaria, carcinoma simple. Los acinos se encuentran hipercelulares compuesto por células pleomórficas, sin orden, ni polaridad. Muchas de estas están desprendidas de la membrana basal y se mantienen en conglomerado. Hay mitosis aisladas y figuras con cromatina aberrante. H&E, barra: 5 µm.

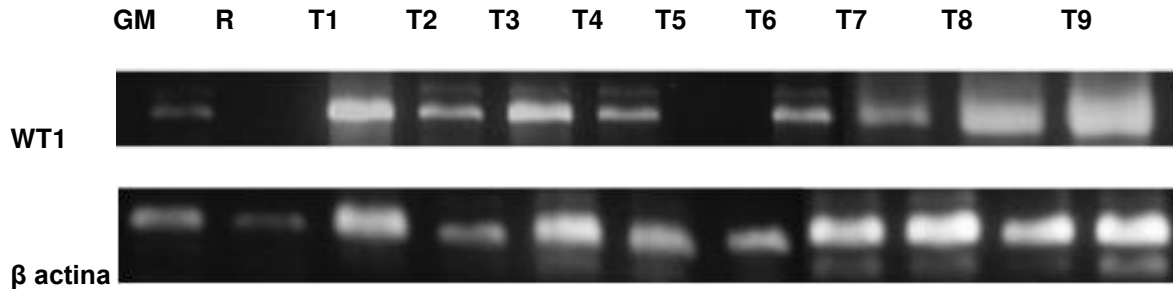


### 6.3 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo B-actina y expresión de WT1

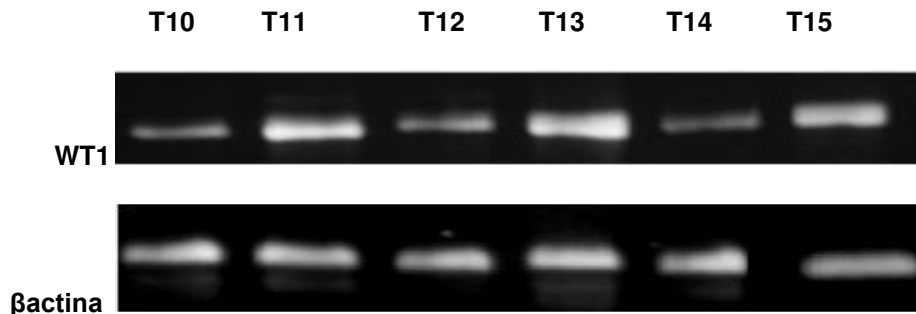
Se logró amplificar la expresión del gen constitutivo de beta actina de 200pb en todas las muestras realizadas, por lo que garantizamos de ésta manera la integridad del ADNc.

La expresión del gen WT1 fue positiva para los tumores benignos(figura7A), malignos(Figura7B) y glándula mamaria sana con 800pb, sin embargo, no se logró observar amplificación en riñón, y en el T5 (Figura7A).

A)



B)



**Figura 7 A)**Expresión de WT1 y β actina en tumores benignos,(GM) Glándula mamaria y (R) Riñón.**B)** Expresión de WT1 y β actina en tumor mamario canino maligno .

## 6.4 Secuenciación del gen WT1

Se obtuvieron las secuencias consenso de glándula mamaria sana (614pb), tumor mixto benigno (514pb) y carcinoma simple (508pb) respectivamente, las cuales se muestran a continuación:

### 1.- Secuencia de glándula mamaria sana

```
ATGTGAGAGGGTTAGCCATTTGCTTAGCTTTTCCCGATAATCGTGCCTCCCCCGCCCCCCCAA
TCTCCAGAGATTTTCTTTTCTTAAGGGAAAGAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAGAA
AGAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAGAGGAAGCATCCCCTG
TTCCTCTTGCAAACCACCAAACCTTTGGGATCCCGCTAGCCTTTGCTGATTAGACGCTGATACTGGT
AAAGAGGAAGGGGGTGGAGAGCAGGAGCAGGTTTGTAGGGTGTGAGTCAGTTATTCAGTCTTGC
ACACGGGTGAAACTGGTGGGAAGGTGGATGTTTGGGTGTTGGGAAGAGTTGTTCCCCAGACAGA
AGCAGGTCTTCAGGGATTACACTGCAGCATTAGGTGGTTTGTACCAGGCCTGGGGTGTGGGGA
AACCTGCGGGCGAGGCAGACATCATAAGGTGCCTGGAAACGTCCGGCTCCTCTGAGAAACCAT
ACCAGTGTGATGACTGTGGGAAGTCCTTCCGCCAGAAAACCACTCTCTCTACATCAGAGAATT
CATNCAGGAGAAAACCGGACACTGTCAAG
```

### 2.- Secuencia de tumor mixto benigno

```
ATGTGAGAGGGTTAGCCATTTGCTTAGCTTTTCCCGATAATCGTGCCTCCCCCGCCCCCCCAA
TCTCCAGAGATTTTCTTTTCTTAAGGGAAAGAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAGAA
AGAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAA
CTGTTTGTGGTGGCCTGCCACCCAACAAAGGGATCCCTCTCGCTATTTGTTGATTATTCATTATTGT
GGTAGAGAACAGGGTGGTGGAGGAAAAATCCGGTTTGTGGGTGGGAGTGATTTTTTTTTTTCTT
GCACGCACCTGACTCTGGTGGGAAGCTGGATGTTTGTGGGTGGGGAAGAAATATCCCCCACA
GAAGCAGGTCTGCCTGGATGACTCTGCCTGCTTCCGGTGGGTGGTTTCGTGGCCTGGGGGGTGGG
GGAAACAAGCCTGCGAGGCAGGCATACTCCCTCGTGCCTGGAAGCAAACGGCTCCTTCC
```

### 3.- Secuencia de carcinoma simple

```
ATGTGAGAGGGTTAGCCATTTGCTTAGCTTTTCCCGATAATCGTGCCTCCCCCGCCCCCCCAA
TCTCCAGAGATTTTCTTTTCTTAAGGGAAAGAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAGAA
GAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAA
TTCGACTGCAAACCACAGAACAGTGGGATCCCGCTAGCAATTTGCTGATGATACACTAGTAGTGG
TAAAGAACAGGGTGGTGGAGAACAATCCGGTTTGTAGGGTGTGATTCATTTTTTTCAGTCTTGG
ACACAGCTGAGACTGGTGGGAAGCTGGATGTTTGTGGTTAGGGAAGAGTTGTTCCCCAGACAGA
AGCAGGTCTTCAGGGATTACACTGCAGCATTAGGTGGTTTGTACCAGGCCTGGGGTGTGGGGA
AACCTGCGGGCGAGGCAGACATCATCAGGTGCCTGGAAACGTCCGGCTCCTC
```

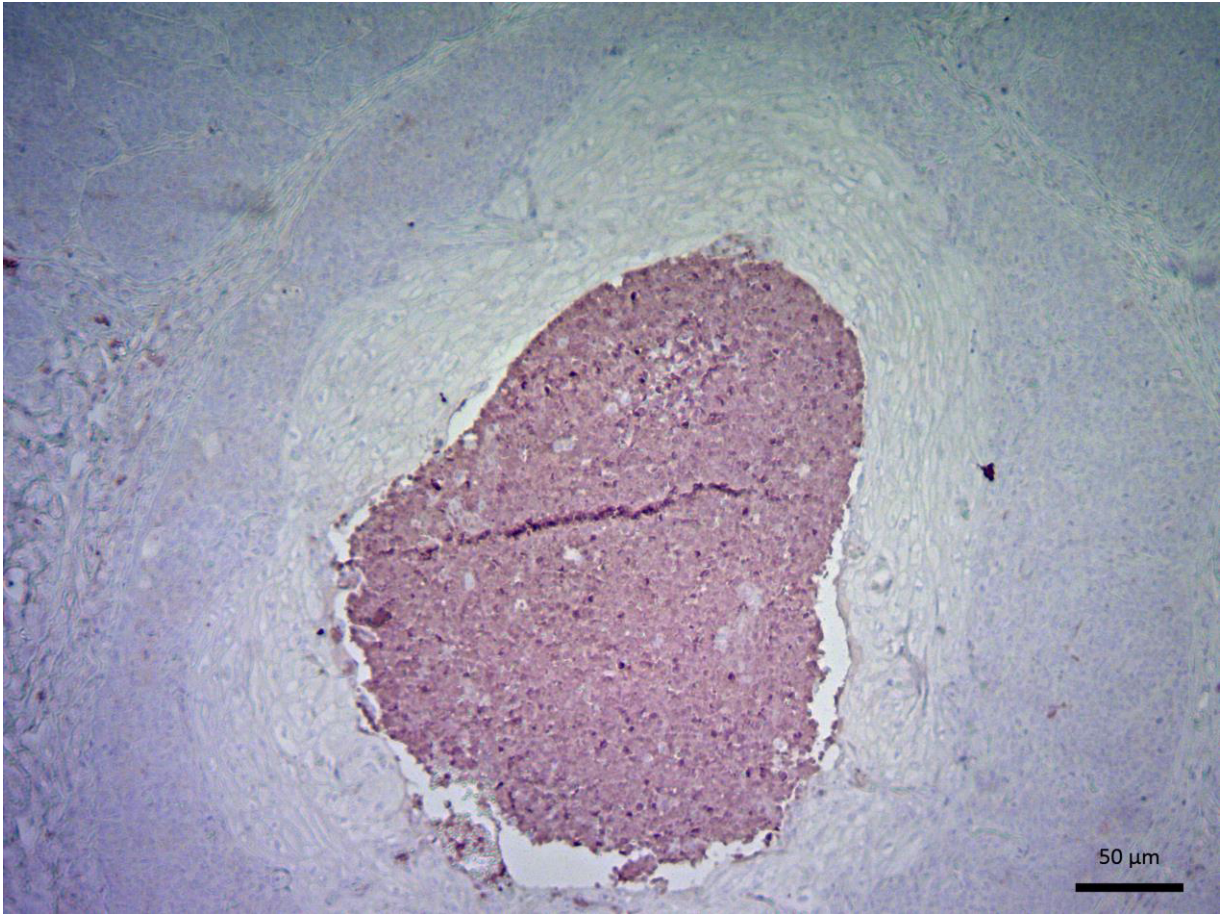
Estas secuencias fueron analizadas en busca de homología con secuencias previamente reportadas en el GenBank (PUBMED), obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Secuencia	% de homología
Tumor mixto benigno	*Ictonyx libyca Wilms tumor1gene parcial cds(Koepfli et al., 2008).	100%
	*Vulpes vulpes Wilms tumor1 gene parcial cds(K. Koepfli et al., 2006)	95%
	*Canis familiaris Wilms tumor1 gene intron(Shibuya et al., 1996)	85%
Carcinoma simple	*Canins familiaris Wilms tumor1 gene intron (Shibuya et al., 1996)	98%
	*Canis lupus Wilms tumor1 gene parcial cds(K. P. Koepfli et al., 2006)	98%
	*Vulpes vulpes Wilms tumor1 gene parcial cds(K. P. Koepfli et al., 2006)	95%
Glándula mamaria sana	*PREDICTED:Canis lupus familiaris Zinc finger proteín 567 transcript variant RNAm	97%
	*Canis familiaris Wilms tumor1 gene intron(Shibuya et al., 1996)	92%
	*Canis lupus Wilms tumor1 gene parcial cds(K. P. Koepfli et al., 2006).	92%

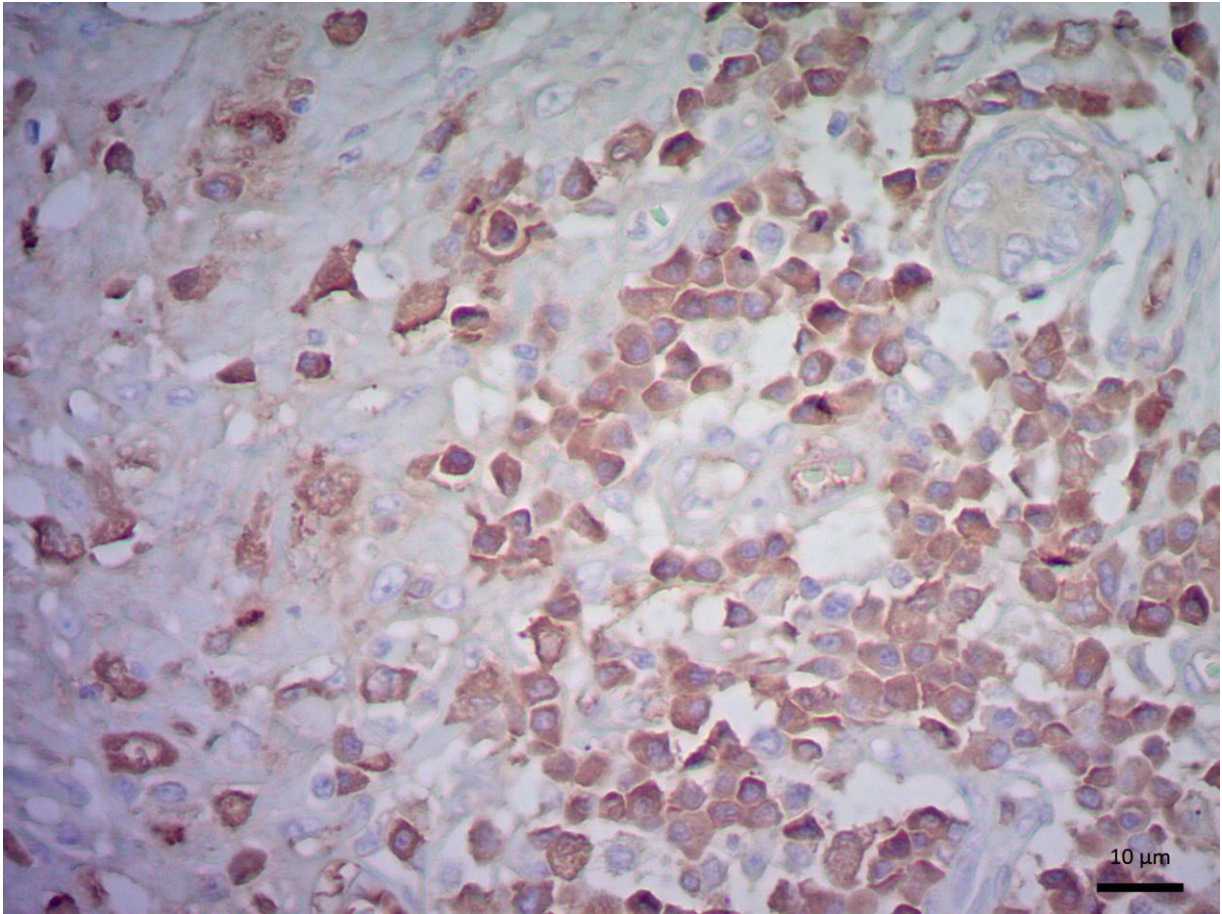
**Tabla 6.** Homología de las secuencias analizadas con las publicadas previamente en el GenBank.

### 6.5 Inmunohistoquímica para expresión de la proteína de WT1

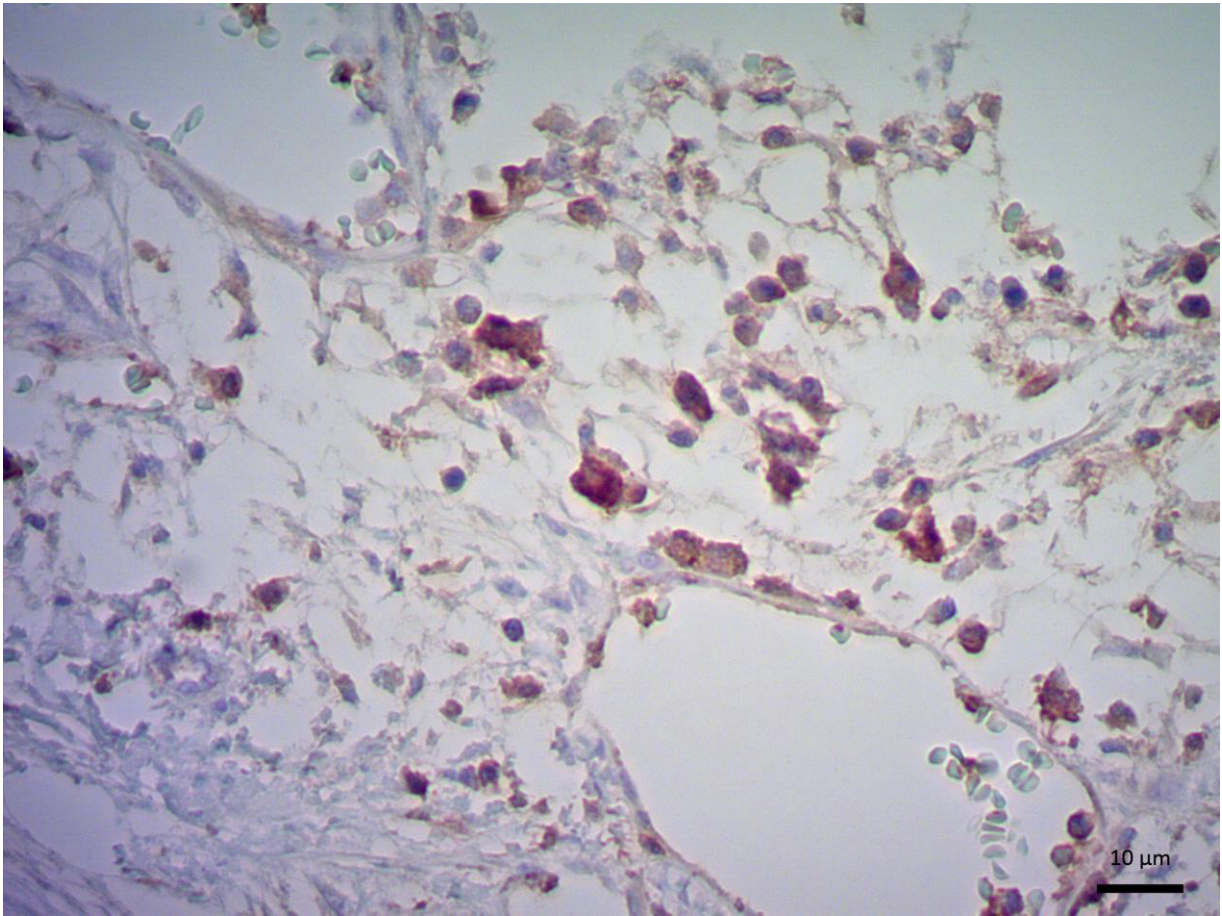
La expresión de WT1 fue positiva en todas biopsias diagnosticadas como malignas, así como en la muestra de riñón(Figura 8-11). Sin embargo, biopsias diagnosticadas como benignas resultaron ser negativas así como la muestra de glándula mamaria sana(Figura 12-15).



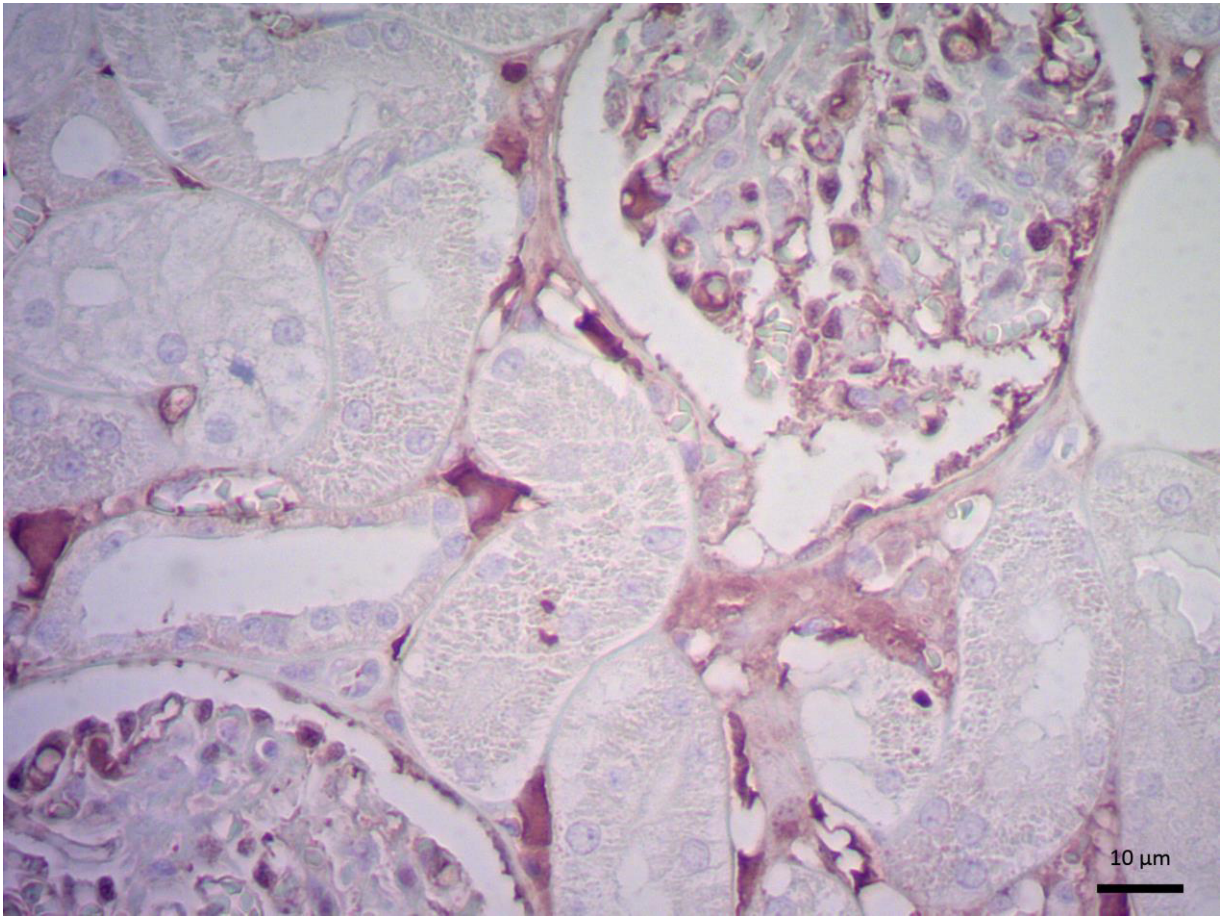
**Figura 8.** Inmunoreactividad positiva para WT1. Canino, hembra, glándula mamaria, carcinoma sólido. Se observan células neoplásicas positivas para Wt1 invadiendo el lumen arterial



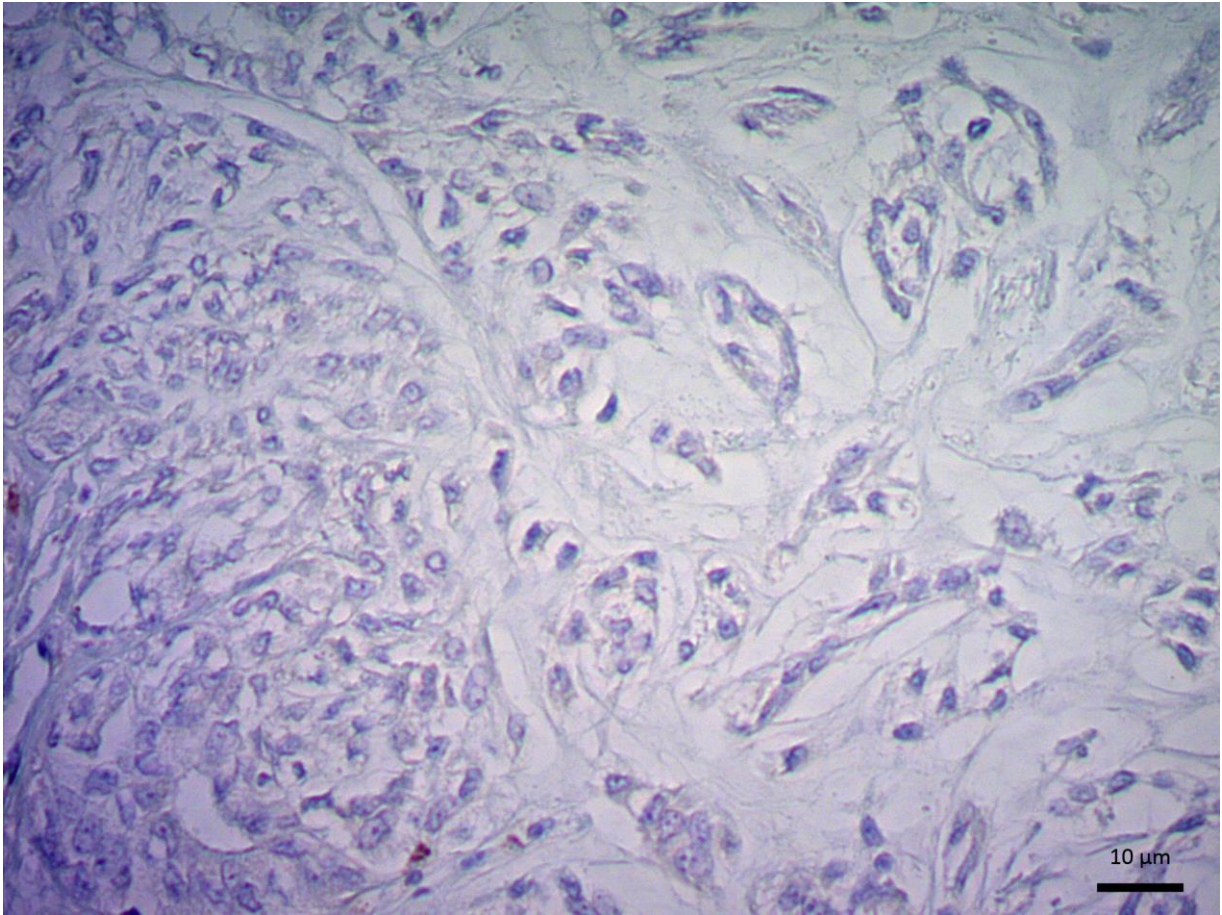
**Figura 9.** Carcinoma sólido. Células epiteliales con inmunoreactividad citoplasmática, positiva para WT1(3+).



**Figura 10.** Osteosarcoma. Osteoblastos formando matriz ósea con inmunoreactividad citoplasmática (3+)

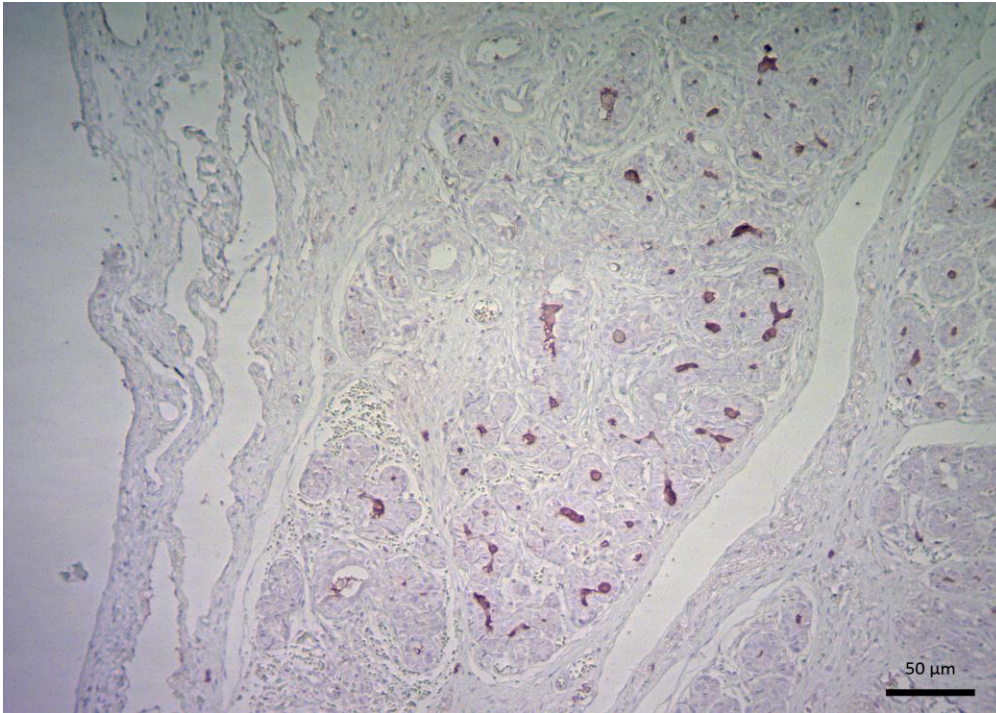


**Figura11.** Riñón. Glomérulos. células endoteliales, mesangiales, y podocitos con inmunoreactividad (3+)

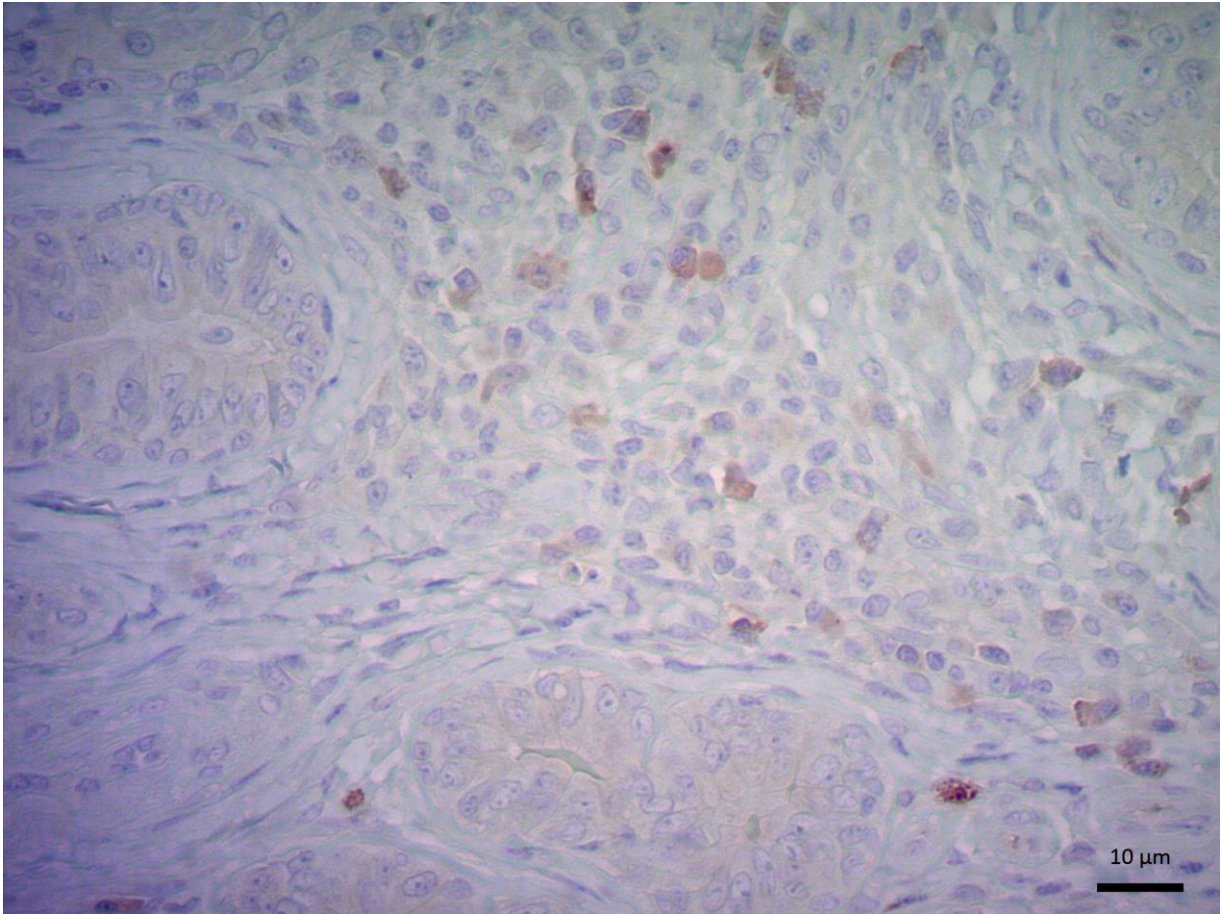


**Figura12.** Inmunoreactividad negativa para WT1. Tumor mixto benigno. Lesión característica del tumor, con presencia de matriz osteoide y células mioepiteliales,

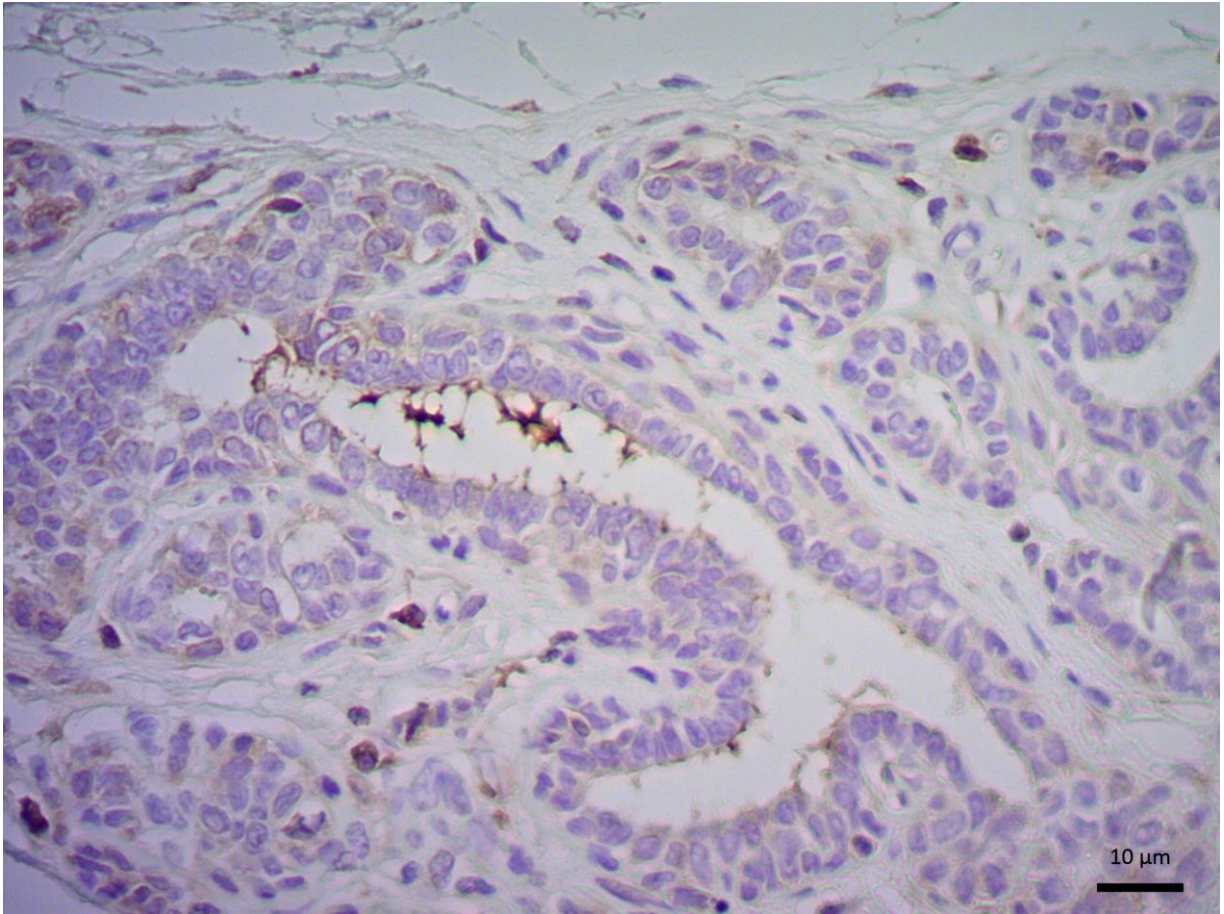




**Figura 13.** Tumor mixto benigno. Hiperplasia lobulillar con reactividad inespecífica dentro de los acinos que corresponde a un material proteínaseo.



**Figura14.** Adenoma simple. Células epiteliales poligonales. La reactividad es inespecífica y corresponde a linfocitos y macrófagos en intersticio



**Figura15.** Glándula mamaria sana. Reactividad inespecífica en el lumen de la glándula

## **6.6 Análisis de correlación entre WT1 y el subtipo histopatológico**

Los resultados para la técnica de PCR mediante el diseño de chi cuadrada fueron de **0.7143**, mientras que la chi de tablas para una confiabilidad del 95% es de **3.8415** y para una confiabilidad de 99% es de **6.6349**. Por lo que se acepta la hipótesis nula, así que se determina que la prueba de PCR no es estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Por lo que se concluye que ésta prueba no es confiable.

Los resultados para la técnica de inmunohistoquímica fueron de **4**, mientras que la chi de tablas para una confiabilidad de 95% es de **3.8415** y para una confiabilidad de 99% es de **6.6349**. Por lo que se rechaza la hipótesis nula y se determina que los resultados son estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) concluyendo así que existe una correlación entre la expresión de WT1 y la malignidad de TMC.

## 7. DISCUSIÓN

Aproximadamente 6 millones de perros son diagnosticados con cáncer cada año en los Estados Unidos y el 27% muere a causa de éste (Printz, 2011) Printz, 2011). Sin embargo en ésta cifra no se conoce actualmente en México.

La incidencia de cáncer, se ha visto en aumento tras el paso de los años, al igual que la incidencia en humanos.(Dobson, 2013). Esta relación se ve magnificada debido a ciertos hábitos en el humano que predisponen la aparición de cáncer en la mascota, como la exposición al tabaco(Reif et al., 1998).

El tumor mamario canino es el más frecuente en las perras y en las mujeres (Kelsey et al., 1998). Aunque en la perra se presenta 4 veces más frecuente que en el humano, representando el segundo tumor más frecuente en caninos(Gupta et al., 2012).

El 50% que se envían a patología son diagnosticados como malignos(Gupta et al., 2012). Los hallazgos de éste trabajo difieren con lo citado anteriormente, ya que se diagnosticó un 40% de TMC malignos del 100% de la población. Esta discrepancia entre los resultados puede deberse a que la mayor cantidad de hembras muestreadas resultaron estar castradas. La literatura afirma que la esterilización en las perras tiene una incidencia de TMC de 3 a 7 veces menor que las perras enteras(Alenza et al., 2000), y que en el caso de las hembras castradas que presentan TMC, en su mayoría son diagnosticados como benignos(Sorenmo et al., 2011), mientras que las hembras enteras tienen una menor tasa de supervivencia, ya que tienen un mayor riesgo de desarrollar TMC maligno y por lo tanto metástasis(Sleeckx et al., 2011). Nuestros resultados coinciden con lo citado anteriormente ya que la cantidad de hembras castradas que presentaron TMC fueron en su totalidad diagnosticados como benigno, mientras que la totalidad de TMC malignos correspondieron a hembras enteras.

La edad es considerado uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de TMC; en un estudio realizado con beagles, se determinó que la edad en la que el riesgo de presentar TMC se vuelve significativo, es a los 8 años de

edad. Eventualmente el riesgo incrementa conforme la edad sigue avanzando(Taylor et al., 1976).

Existen antecedentes que señalan que los perros más jóvenes suelen desarrollar TMC benignos a diferencia de los perros longevos, los cuales presentan en su mayoría TMC maligno. Zatloukal determina una edad promedio de 10 años para los TMC benigno y 13 años para los malignos(Zatloukal et al., 2005). Nuestros resultados no muestran una relación entre la edad y el tipo histopatológico, Sin embargo podemos decir que la edad promedio de la presencia de TMC de cualquier tipo fue de 10 años, lo cual coincide con la literatura.

Los TMC más frecuentes son el carcinoma en el caso de los malignos y el tumor mixto benigno(Sleeckx et al., 2011), lo cual coincide con los resultados obtenidos en éste estudio.

Durante años el gen WT1 ha sido blanco de diversos estudios, gracias a su función transcripcional regulatoria de genes esenciales para propiciar cáncer, y a su capacidad de actuar tanto como gen supresor tumoral y oncogén. Esta conclusión se llevó a cabo gracias a estudios que determinaron que la expresión de WT1 se encontraba en diverso tipos de tumores sólidos, como el cáncer de mama (Call et al., 1990) (L. Yang et al., 2007) (Scharnhorst et al., 2001).

Los estudios realizados de WT1 en cáncer de mama han evolucionado tras el paso de los años. Los primeros estudios realizados detectaron la expresión de ARNm en WT1 en tejido normal y neoplásico de glándula mamaria, contrario a los resultados en ese mismo estudio con la técnica de inmunohistoquímica, en los cuales encontraron la proteína de WT1 en tejido mamario normal, pero no en tejido neoplásico. Además encontraron diferentes isoformas de WT1 en distintos tumores de forma aislada, por lo que concluyeron que WT1 puede actuar de manera diferente en cada tipo de tumor (Silberstein et al., 1997).

Miyoshi en el 2002 encontró la expresión de ARNm de WT1 en tejido neoplásico, pero no en glándula mamaria sana(Miyoshi & al., 2002). Los resultados de este trabajo difieren de éste ya que la expresión de WT1 por RT-PCR se encontró tanto

en tumores benignos y malignos como en glándula mamaria sana, lo cual coincide con Silberstein(Silberstein et al., 1997). Cabe mencionar que la expresión de WT1 en tejido mamario sano puede coincidir con la literatura que afirma que la expresión de WT1 en etapas adultas puede encontrarse en órganos como glándula mamaria (L. Yang et al., 2007).

El uso de la inmunohistoquímica para la detección de WT1 en cáncer de mama en el humano ha probado ser una técnica sumamente confiable. En un estudio realizado por Nakatsuka et. al, se evaluó la presencia de WT1 por inmunohistoquímica con anticuerpos mono y policlonales en distintos tumores sólidos incluido el cáncer de mama, principalmente carcinomas. La inmunoreactividad en el caso de tumor mamario fue positiva contrario a lo citado por Silberstein et. al. (Nakatsuka et al., 2006). Los hallazgos de éste estudio coinciden con los citados anteriormente, debido a la inmunoreactividad positiva en las biopsias de TMC maligno a nivel citoplasmático, es importante mencionar que anteriormente un resultado positivo para WT1 en inmunohistoquímica debía ser a nivel nuclear, debido a la función transcripcional de WT1. En el estudio anteriormente mencionado, se consideraron positivas las muestras con inmunoreactividad citoplasmática argumentando que la fosforilación en el dominio de unión a DNA de WT1 altera la afinidad al ADN y la distribución celular de WT1 y que la fosforilación transcripcional en los dedos de Zinc inhibe la habilidad de unión al ADN, resultando así en una retención de WT1 en el citoplasma. (Nakatsuka et al., 2006).

Nuestros resultados muestran una relación entre la expresión de WT1 y TMC maligno con la técnica de inmunohistoquímica, sin embargo con la técnica de RT-PCR se detectó expresión en todas las muestras incluyendo tejido mamario sano. Esto puede ser debido a que con la técnica de PCR podemos determinar la presencia de ARNm y en la técnica de inmunohistoquímica, podemos ver la proteína, por lo que consideramos que existe algo que se encuentre interrumpiendo el proceso de traducción en tumor mamario benigno y tejido mamario normal. Se cree que WT1 se distribuye de núcleo a citoplasma y viceversa y que puede estar relacionado con procesos de traducción(Niksic, Sligh, & Sanford, 2004). Es

importante mencionar que estos estudios previamente mencionados han sido realizados en humanos, ya que no existen estudios previos de WT1 en TMC Por lo que se necesitan hacer más investigaciones para evaluar el comportamiento de WT1 y analizar si tiene similitudes con cáncer de mama en el humano.

Reportes previos han catalogado al canino como un modelo ideal para distintos tipos de cáncer, principalmente el cáncer de mama, debido a la diversidad de razas, el comportamiento en la progresión de tumor y los factores de riesgo asociados a cáncer de mama(Pinho, Carvalho, Cabral, Reis, & Gartner, 2012; Schiffman & Breen, 2015).

En la actualidad se desea introducir el concepto de una sola salud en la comunidad científica por lo que las contribuciones en oncología veterinaria, como éste estudio podrían ser de gran ayuda en las investigaciones de cáncer en humanos.



## 8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente proyecto podemos concluir que:

- En las muestras analizadas de TMC, el subtipo histopatológico más frecuente fue el benigno.
- La esterilización mostró tener un efecto protector contra el desarrollo de TMC maligno.
- Se detectó la expresión de WT1 por RT-PCR en todas las muestras de TMC tanto benigno como maligno, así como en glándula mamaria sana.
- Por la técnica de inmunohistoquímica se detectó expresión de la proteína de WT1 en biopsias de TMC malignos y riñón como control, con una correlación estadísticamente significativa.
- Los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica sugieren que WT1 podría ser considerado un biomarcador para este tipo de neoplasia y asociarse a malignidad, sin embargo, se requiere de ampliar el número de muestras a analizar.

## LITERATURA CITADA

- Al-Dissi, A., Haines, D., Singh, B., & Kidney, B. (2010). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor- 2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Canadian veterinary Journal*, *51*, 1109-1114.
- Alenza, M. D., Peña, L., Del castillo, N., & Nieto, A. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *Journal of small animal practice*, *41*, 287-291.
- Augusto, M. (2014). Mammary tumours in the dog and the cat: part 1. *Companion animal*, *19*(9), 448-452.
- Bajetta, E., Zilembo, N., R., B., Celio, L., Zampino, M., Colleoni, M., . . . Martinetti, A. (1994). Goserelin in premenopausal advanced breast cancer: clinical and endocrine evaluation of responsive patients. *Oncology*, *51*, 262-269.
- Beck, J., Hennecke, S., Bornemann-Kolatzki, K., Urnovitz, H., Neumann, S., Strobel, P., . . . Schutz, E. (2013). Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS One*, *8*(9), 1-16.
- Beveridge, W. I., & Sobin, L. H. (1974). International histological classification of tumours of domestic animals. Introduction. *Bulletin of World Health Organization*, *50*(1-2), 1-6.
- Borena, B., Bussche, L., Burvenich, C., Duchateau, L., & Walle, G. (2013). Mammary stem cells research in veterinary science: an update. *Stem Cells Development*, *22*(12).
- Breivik, J. (2005). The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Semin Cancer Biol*, *15*(1), 51-60.
- Brouillette, J., Andrew, J., & Venta, P. (2000). Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method. *Mammalian genome*, *11*, 1079-1086.
- Call, K., Glaser, T., Ito, C., Buckler, A., Pelltier, J., Haber, D. A., . . . Housman, D. (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, *60*(3), 509-520.
- Chang, S., Chang, C., & Chang, T. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Veterinary medical association*, *227*(10), 1625-1629.
- Clemente, M., De Andres, P., Pena, L., & Perez Alenza, D. (2009). Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. *Veterinary Record*, *165*, 78-81.
- Dobson, J. M. (2002). Canine Neoplasia in the UK : estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice*, *43*(6).
- Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci*, *2013*, 941275. doi: 10.1155/2013/941275
- Egenvall, A., Bonnett, B., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., & Euler, H. (2005a). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE*, *69*, 109-127.

- Egenvall, A., Bonnett, B., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., & Euler, H. (2005b). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE*, 69(1-2), 109-127.
- Fernández, N., Figueroa, V., & Pérez, J. (2009). Gen WT-1 expresión en la nefrogénesis *Urología colombiana*, 18(3), 113-120.
- Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., Fabi, A., & Cognetti, F. (2007). HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend *Current opinion in obstetrics and gynecology*, 19, 56-62.
- Fidler, I. J., & Brodey, R. S. (1967). The biological behavior of canine mammary neoplasm. *Journal of the american veterinary medical association*, 151, 1311-1318.
- Fieni, F. (2006). Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia- pyometra complex in bitches. *Theriogenology*, 66, 1550-1556.
- Gama, A., Paredes, J., Albergaria, A., Gartner, F., & Schmitt, F. (2004). Expression of P-cadherin expression in canine mammary tissues *Journal of comparative pathology*, 130, 13-20.
- Gamma, A., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification *Virchows Arch*, 453, 123-132.
- Gamma, A., Paredes, J., Gartner, F., Alves, A., & Schmitt, F. (2008). Expression of E-cadherin, P-cadherin, and beta-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. *Vet J*, 177, 45-53.
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zapulli, V. (2011). Classification and grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology Online*, 40(1), 117-131.
- Gupta, K., Sood, N. K., Uppal, S. K., Mohindroo, J., Mahajan, S., Raghunath, M., & Singh, K. (2012). Epidemiological studies on cancer mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 322-333.
- Han, Y., San Marina, S., Yang, L., Koury, H., & Minden, M. D. (2007). The zinc finger domain of Wilms' tumor 1 suppressor gene (WT1) behaves as a dominant negative, leading to abrogation of WT1 oncogenic potential in breast cancer cells. *Breast cancer research*, 9(4), 1-13.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hermo, G., Torres, P., Ripoll, G., Scursioni, A., Gomez, D., Alonso, D., & Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: a pilot study. *Vet J*, 178, 103-108.
- Herrera, A., Cavazos, A., Vélez, H., Padilla, C., Ávila, L., & Benavides, P. (2004). WT1: Sexo, vida y muerte. *Ciencia UANL*, 7(3), 342-347.

- Hewitt, S., Hamada, S., & McDonnell, T. J. (1995). Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilm's Tumor Suppressor Gene WT1. *Cancer Res*, *55* 5386-5389.
- Hua Li, J., & Man, Y. (2009). Dual usages of single Wilm's tumor 1 immunohistochemistry in evaluation of breast tumors: a preliminary study of 30 cases. *Cancer biomarkers*, *5*, 109-116.
- Ichimura, R., Shibutani, M., Mizukami, S., Suzuki, T., Shimada, Y., & Mitusmori, K. (2009). A Case Report of an uncommon Sex-Cord Stromal Tumor Consisted of Lutel and Sertoli Cells in a Spayed Bitch. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *72*(2), 229-234.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular*. México D.F.
- Kelsey, J., Moore, A. S., & Glickman, L. T. (1998). Epidemiologic Studies of Risk Factors for Cancer in Pet Dogs. *Epidemiologic Reviews*, *20*, 204-217.
- Klopfleisch, R., Euler, H., Sarli, G., Pinho, S., Gartner, F., & Gruber, A. (2011). Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology Online*, *48*(1), 98-116.
- Koepfli, K., Deere, K., Slater, G., Begg, C., Beeg, K., Grassman, L., . . . Wayne, R. (2008). Multigene phylogeny of the Mustelidae: resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Bioinformatics*, *6*(10).
- Koepfli, K., Jenks, S., Eizirik, E., Zahirpour, T., Van Valkenburgh, B., & Wayne, R. K. (2006). Molecular systematics of the Hyaenidae: relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. *Mol phylogenet Evol*, *38*(3), 603-620.
- Koepfli, K. P., Jenks, S. M., Eizirik, E., Zahirpour, T., Van Valkenburgh, B., & Wayne, R. K. (2006). Molecular systematics of the Hyaenidae: relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. *Mol. Phylogenet. Evol.*, *38*(3), 603-620.
- Kothapalli, K., Kirkness, E., Pujar, R., Wormer, R., & Meyers-Wallen, N. (2005). Exclusion of candidate genes for canine SRY-Negative XXSex Reversal. *Journal of Heredity*, *96*(7), 759-763.
- Kothapalli, K., Kirkness, E., Pujar, S., & Wallen, V. (2004). Exclusion of WT1 as a candidate gene for canine SRY-negative XX sex reversal. *Animal genetic*, *35*(6), 466-470.
- Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies *Nature clinical practice oncology*, *5*, 588-599.
- Kwapien, R., Giles, R., Geil, R., & Casey, H. (1980). Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptive steroids. *J Natl Cancer Inst*, *65*, 137-144.
- Kycko, A., & Reichert, M. (2014). Proteomics in the search for biomarkers of animal cancer. *Current protein and peptide science*, *15*, 36-44.
- Lipscomb, T. (2000). Common metastatic carcinoma of california sea lions (zalophus californianus) evidence of genital origin and association with novel gammaherpesvirus. *Veterinary Pathology Online*, *37*, 609-617.
- Loeb, D., Evron, E., Patel, C., Sharma, P., Niranjana, B., Buluwela, L., . . . Sukumar, S. (2001). Wilm's tumor suppressor gene (WT1) is expressed in primary breast

- tumors despite tumor specific promoter methylation *Cancer research journal*, 61, 921-925.
- Mainenti, M., Rosoto, R., Carnier, P., & Zappulli, V. (2014). Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs. *The Veterinary Journal*, 202, 62-68.
- Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L., & Syrigos, K. (2009). Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest*, 27, 1023-1037.
- McNicholas, J., Gilbey, A., Rennie, A., Ahmedzai, S., Dono, J., & Ormerod, E. (2005). Pet ownership and human health: a brief review of evidence and issues. *BMJ*, 331, 1252-1254.
- Meyer, I., Leen, A., & Burvenich, C. (2004). Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation and involution. *Steroids*, 69, 145-159.
- Misdorp, W. (1996). Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Q*, 10(1), 26-33.
- Miyoshi, Y., & al., e. (2002). High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer research*, 8(5), 1167-1171.
- Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., Tamaki, H., . . . Noguchi, S. (2002). High expression of Wilms' Tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clinical Cancer research*, 8, 1167-1171.
- Moe, L. (2001). Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *Journal of reproduction and fertility Supplement*, 57, 439-443.
- Nakagama, H., Heinrich, G., Pelletier, J., & Housman, D. (1995). Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Molecular and cellular biology*, 15, 1489-1498.
- Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., . . . Aozasa, K. (2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology*, 19, 804-814.
- Nasomyon, T., Samphao, S., Sangkhathat, S., Mahattanobon, S., & Graidist, P. (2014). Correlation of Wilms tumor 1 isoforms with HER2 and ER-alpha and its oncogenic role in breast cancer. *Anticancer Res*, 34, 1333-1342.
- Nieto, A., Pérez-Alenza, M., Del castillo, N., Tabanera, E., Castaño, M., & Peña, L. (2003). BRCA1 Expression un canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal of comparative pathology*, 128, 260-268.
- Niksic, M., Sligh, J., & Sanford, J. (2004). The wilm's tumor protein(WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in funcional polysomes. *Hum Mol Genet*, 13, 463-471.
- OMS, O. M. d. I. S. ( 2013). Cancer.
- Owens, L. (1980). *Clasification of tumors in domestic animals World health organization, Geneva, Switzerland*
- Paoloni, M., & Kahanna, C. (2008, february 2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, 8, 148-156.

- Pastikas, M., & Dessiris, A. (1996). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study .Part II: the 3rd mammary gland. *Anatomía, Histología, Embryología*, *25*, 139-143.
- Pastikas, M., Karayannopolou, M., Kaldrymidoy, E., Papazoglou, L., Papadopoulou, P., Tzegas, S., . . . Dessiris, A. (2006). The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anatomía, Histología, Embryología*, *35*, 228-234.
- Patsikas, M., & Dessiris, A. (1996). The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study .Part I: the 1st,2nd,4th and 5th mammary glands. *Anatomía, Histología, Embryología*, *25*(131-138).
- Pereira, C., Baileiro, J., & Ribeiro, A. (2003). Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anatomía, Histología, Embryología*, *32*, 282-290.
- Perez Alenza, D., Rutteman, G. R., & Pena, L. (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case control study. *Journal of veterinary intern medicine*, *12*, 132-139.
- Pinho, S., Carvalho, S. M., Cabral, J., Reis, C., & Gartner, F. (2012). Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology*, *88*(1), 187-197.
- Printz, C. (2011). Pet animals with cancer help advance human cancer research: similarities help to explore future human treatments. *Cancer*, *117*(21), 4807-4808. doi: 10.1002/cncr.26604
- Reif, J. S., Bruns, C., & Lower, K. S. (1998). Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs. *Am J Epidemiol*, *147*(5), 488-492.
- Reis-Filho, J. S., & Tutt, A. (2008). Triple negative tumours: a critical review *Histopathology*, *52*, 108-118.
- Reizner, N., Maor, S., Sarfstein, R., Abramovitch, S., Welshons, W., Curran, E., . . . Werner, H. (2005). The WT1 Wilms' tumor suppressor gene product interacts with estrogen receptor-alpha and regulates IGF-I receptor gene transcription in breast cancer cells. *Journal of molecular endocrinology*, *35*(1), 135-144.
- Restucci, B., Vico, G., & Maiolino, P. (2000). Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Vet Pathol*, *37*, 297-301.
- Rivera, P., Malin, M., Biagi, T., Fall, T., Haggstrom, J., Lindblad, K., & von Euler, H. (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *American association for cancer research*, *69*(22), 8770-8774.
- Santos, A., Lopes, A., Ribeiro, J., Martins, L., Santos, J., Amorim, I., . . . Matos, A. (2013). Identification of prognostic factors in canine mammary tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*, *9*, 1-11.
- Scharnhorst, V., Van Der, E., & Jochemsen, A. (2001). WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, *273*(2), 141-161.
- Schiffman, J., & Breen, M. (2015). Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical transactions of the royal Society B*.

, 370, 1-13.

- Schneider, R., Dorn, C. R., & Taylor, D. O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst*, 43, 1249-1261.
- Shibuya, H., Collins, B. K., Collier, L. L., Huang, T. H., Nonneman, D., & Johnson, G. S. (1996). A polymorphic (GAAA)<sub>n</sub> microsatellite in a canine Wilms tumor 1(WT1) gene intron. *Animal genetic*, 27(1), 59-60.
- Silberstein, G., Van Horn, K., Strickland, P., & Roberts, C. (1997). Altered expression of the WT1 Wilms tumor suppressor gene in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15), 8132-8137.
- Silver, I. (1966). The anatomy of the mammary gland of the dog and cat *Journal of small animal practice*, 7, 689.
- Sleeckx, N., Rooster, H., Kroeze, V., Ginneken, C., & Brantegem, L. (2011). Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in domestic animals*, 10, 1-14.
- Sonnenschein, E., Glickman, L. T., Goldschmidt, M., & McKee, L. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case control study *Am J Epidemiol*, 133, 694-703.
- Sopel, M. (2010). The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Vía Medica*, 69(1), 1-14.
- Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors *Vet Clin North Am*, 33, 573-596.
- Sorenmo, K., Kristiansen, V., Cofone, M., Breen, A., Langerland, M., Mongli, C., . . . Goldschmidt, M. (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, 7, 162-172.
- Sorenmo, K., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. (2011). Development, anatomy, histology, Lymphatic drainage, clinical features and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology Online*, 48(1), 85-97.
- Stratmann, N., Failing, K., & Richter, A. (2008). Mammary tumors recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary surgery journal*, 37(1), 82-86.
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., & Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary surgery journal*, 37, 82-86.
- Sugiyama, H. (2010). WT1 (Wilm's tumor gene1): Biology and cancer immunotherapy. *Japanese Journal of clinical oncology*, 40(5), 377-387.
- Taylor, G., Shabestari, L., Williams, J., Mays, C. W., Angus, W., & McFarland, S. (1976). Mammary neoplasia in a closed Beagle colony *Cancer research journal*, 36, 2740-2743.
- Thuroczy, J., Reisvaag, G., Perge, E., Tibold, A., Szilagyi, J., & Balogh, L. (2007). Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of comparative pathology*, 137, 122-129.
- Tuna, M., Chavez, A., & Tari, A. (2005). HER2/neu increases the expression of Wilms' Tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 24(1648-1652).
- Veldhoen, N., Watterson, J., Brash, M., & Milner, J. (1999). Identification of tumor associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer*, 81(3), 409-415.

- Weheelock, M., & Johnson, K. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 207-235.
- Xu, C., Wu, C., Xia, Y., Zhong, Z., Liu, X., Xu, J., . . . Chen, B. (2013). WT1 Promotes Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through Up-Regulating Cyclin D1 and p-pRb In Vitro and In Vivo. *PLoS One*, 8(8).
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., & Sugiyama, M. (1996). International histological classification of tumours of domestic animals. Introduction. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58(11), 1079-1083.
- Yang, L., Han, Y., Suarez-Saiz, F., & Minden, M. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21, 868-876.
- Yang, W., Liu, C., Chang, C., Lee, C., Chang, K., & Lin, C. (2006). Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and bcl-2 oncoprotein in canine mammary gland tumours. *Journal of comparative pathology*, 134, 70-79.
- Zapata, P., Tuna, M., Berestein, L., & Tari, A. (2002). Downregulation of Wilm's tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(4), 784-790.
- Zatloukal, J., Lorenzova, J., Tichy, F., Necas, A., Kecova, H., & Kohout, P. (2005). Breed and Age Risk factors for canine mammary tumours. *ACTA VET.BRNO*, 74, 103-109.