

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
APOPTOSIS, ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN TUMOR
MAMARIO CANINO Y SU ASOCIACIÓN CON LA MALIGNIDAD**

**PRESENTADA POR
STEPHANY ARIATNE CASTILLO CARRANZA**

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

JUNIO DE 2016

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



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
APOPTOSIS, ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN TUMOR
MAMARIO CANINO Y SU ASOCIACIÓN CON LA MALIGNIDAD**

**PRESENTADA POR
STEPHANY ARIATNE CASTILLO CARRANZA**

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

JUNIO DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON
APOPTOSIS, ANGIOGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN
TUMOR MAMARIO CANINO Y SU ASOCIACIÓN CON LA
MALIGNIDAD**

**PRESENTADA POR
Q.B.P. STEPHANY ARIATNE CASTILLO CARRANZA**

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

GRAL. ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO, JUNIO DE 2016

Análisis de la expresión de genes relacionados con apoptosis, angiogénesis y proliferación celular en tumor mamario canino y su asociación con la malignidad

Aprobación por el Comité de Tesis



Dra. Diana E. Zamora Ávila
Director de tesis



Dr. Pablo Zapata Benavides
Director externo



Dr. Rafael Ramirez Romero
Co-Director



Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Co-Director



Dr. Juan José Zarate Ramos
Co-director

Escobedo, N.L., México.

Junio del 2016.

DEDICATORIA

A la memoria de quien fue mi prima, hermana e hija a la vez, y luchó por estar con nosotros su familia hasta el último día; superando las expectativas médicas, aguantando tanto dolor sin quejarse, regalándonos siempre una sonrisa, toda su alegría y ganas de vivir.



(Septiembre de 2000 a Febrero de 2003†)

Te amo nenita, siempre estás conmigo, tú me enseñaste lo que es amar y luchar por lo que quieres. Todo el esfuerzo, el dolor y la adversidad que tuve que superar para realizar este proyecto, son dedicados a ti. Tú me diste las fuerzas necesarias para terminar esto. Con todo mi amor para Ti de la godis.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Diana Zamora por su amistad y apoyo para terminar este proyecto.

Al Doc. Pablo Zapata por todo lo que me ha hecho entender y aprender.

Al Doc. Rafael Ramírez por su apoyo y consejos en este proyecto.

Al Doc. Jaime Escareño, quien siempre está listo para apoyarme en todo.

Al Doc. Ramiro Ávalos, por su apoyo, consejos y enseñanzas científicas.

Al Doc. Juan Zarate por el apoyo y oportunidad de comenzar este proyecto.

A todos esos doctores de los cuales me he ganado su aprecio e hicieron que cada día fuera diferente en la FMVZ, el Doc. Lazcano, Doc. Marcos, Doc. Wong, Doc. Gustavo Moreno, Dra. Sibilina Cedillo, Dra. Carmen Cuevas, Dra. Viky.

Agradezco el compañerismo y cariño de mis amigos Adriana, Ivone y César.

A todas esas personitas que me han apoyado y ayudado a seguir adelante M.C. Benito Ávila, Dra. Angélica Toiber, M.V.Z. Thalia Segovia, M.V.Z. Erick Barrera, M.V.Z. Citlaly Martínez y M.V.Z. Juan Pablo F.

A mis amigas y colegas Q.B.P. que a pesar de todo siempre están ahí, Luz María Castellanos, Magdalena Vázquez, Selene Gutiérrez, Argentina Cárdenas, Flor Leal y Alejandro Martínez.

A mis padres, mi hermano, mi cuñada, Ximena y Mateo que sin su amor de familia que es el más importante en mi vida, no podría estar culminando este trabajo.

Al amor de mi vida Carlos López, sin tu apoyo incondicional y amor de pareja me has sabido apoyar en todo momento, te amo.

Y por último sin ser menos importante, a Dios que me ha dado la oportunidad de terminar este proyecto y al cual le agradezco cada día de mi vida.

NOMENCLATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	Ácido Ribonucleico de interferencia
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido Ribonucleico de transcripción
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
Bcl-2	Célula B/ linfoma 2
Buffer TE	Buffer de Tris y EDTA
C+	Control positivo
C-	Control negativo
CDC14A	Ciclo de división celular 14A (Proteína fosfatasa)
c/u	Cada uno
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ej.	Ejemplo
ER- α	Receptor de estrógeno alfa
<i>et al.,</i>	y colaboradores
Ets	Secuencia de factores de transcripción
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
F.M.V.Z.	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Hr	Horas
H ₂ O mQ	Agua miliq
ID	Identificación
IHQ	Inmunohistoquímica
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama Receptor Estrógeno positivo
Mk	Marcador de peso molecular
mM	Milimolar
min	Minutos
pb	Pares de bases

PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción En Cadena De La Polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPS6KB1	Proteína ribosomal subunidad 6 de 70kDa
seg.	Segundos
Taq	Thermophilus acuaticus
TGM	Tumor de glándula Mamaria
TGMC	Tumor de glándula mamaria de canino
TMC	Tumor mamario canino
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta
WT1	Tumor de Wilms
V	Volts
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
μL	Microlitros
°C	Grados centígrados

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
NOMENCLATURA.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	2
3.1Objetivo general.....	2
3.2Objetivos específicos.....	2
4. ANTECEDENTES.....	3
4.1 Genes relacionados con apoptosis.....	4
4.1.1Gen Bcl-2.....	4
4.1.2Gen Bax.....	7
4.1.3Gen Bcl-xL.....	8
4.2 Genes relacionados con angiogénesis.....	8
4.2.1 Gen VEGF.....	8
4.2.2 Gen Ets-1.....	10
4.3 Genes relacionados con proliferación celular.....	10
4.3.1Gen CDC14A.....	10
4.3.2Gen RP6KB1.....	11
4.4 Técnicas de diagnóstico para TMC en caninos.....	12
4.5 Tratamientos para TMC.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 Obtención del material biológico.....	14
5.2 Diagnóstico por histopatología.....	14
5.3 Extracción de ARN.....	14
5.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	15

5.5 PCR para el análisis de la expresión de los genes estudiados.....	16
5.6 Densitometría.....	17
5.7 Correlación entre la expresión de los genes estudiados y el tipo histopatológico	17
6. RESULTADOS.....	18
6.1 Clasificación histológica.....	18
6.2 Extracción de ARN.....	20
6.3 Análisis de Genes relacionados con apoptosis.....	21
6.4 Análisis de genes relacionados con angiogénesis.....	22
6.5 Análisis de genes relacionados con proliferación celular.....	22
6.6 Análisis de densitometría.....	23
6.6.1 Análisis de densitometría de genes relacionados con apoptosis.....	25
6.6.2 Análisis de densitometría de genes relacionados con angiogénesis.....	27
6.6.3 Análisis de densitometría de genes relacionados con proliferación celular.....	28
6.7 Correlación entre la expresión de los genes estudiados y el tipo histopatológico.....	30
7. DISCUSIÓN.....	31
8. CONCLUSIONES.....	35
ANEXO.....	37
LITERATURA CITADA.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers para PCR de los genes estudiados.....	16
Tabla 2. Condiciones de amplificación para cada gen.....	18
Tabla 3. Clasificación histológica del total de las muestras.....	17
Tabla 4. Densidad promedio de expresión de los genes estudiados.....	24
Tabla 5. Promedio de porcentajes de expresión de los genes estudiados.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de activación de las caspasas	5
Figura 2. Tumor mixto de glándula mamaria (H&E).....	19
Figura 3. Adenoma simple (H&E).....	19
Figura 4. Carcinoma simple (H&E).....	20
Figura 5. Análisis de la integridad de ARN	20
Figura 6. Análisis de la expresión de los genes Bcl-2, Bax y Bcl-xL.....	21
Figura 7. Análisis de la expresión de los genes VEGF y Ets-1.....	22
Figura 8. Análisis de la expresión de los genes CDC14A y RPS6KAB1.....	23
Figura 9. Análisis de la densidad promedio de amplificación de genes estudiados..	24
Figura 10. Análisis de la expresión relativa del gen Bcl-2 por poblaciones.....	25
Figura 11. Análisis de la expresión relativa del gen Bax por poblaciones.....	26
Figura 12. Análisis de la expresión relativa del gen Bcl-xL por poblaciones.....	26
Figura 13. Análisis de la expresión relativa del gen VEGF por poblaciones.....	27
Figura 14. Análisis de la expresión relativa del gen Ets-1 por poblaciones.....	28
Figura 15. Análisis de la expresión relativa del gen CDC14A por poblaciones.....	29
Figura 16. Análisis de la expresión relativa del gen RPS6KAB1 por poblaciones... 	29

RESUMEN

Las neoplasias mamarias son las más frecuentes en las perras y alrededor de 50% resultan ser malignas. En humanos, se conocen genes como BRCA1, BRCA2, CHEK2, ErbB2, FGFR2, LSP1, MAP3K1, RCAS1, TOX3 y TP53 por estar involucrados en el cáncer de mama, y también se han encontrado sobre expresados genes como Grb2, Bcl-2, Ets-1 y WT1, mismos que se relacionan con mal pronóstico y quimioresistencia, pero poco de esto se sabe en tumores mamarios caninos.

El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de genes relacionados con apoptosis (Bcl-2, Bax, Bcl-xL), angiogénesis (VEGF y Ets-1) y proliferación celular (CDC14A y RPS6KB1) en tumores benignos, tumores malignos y tejido de glándula mamaria.

Se recolectaron 17 muestras de glándula mamaria canina y se analizaron por histopatología con la técnica hematoxilina y eosina (H&E) para ser clasificadas, nueve muestras resultaron ser tumores benignos, seis tumores malignos y dos de tejido sano. Además, se analizaron las mismas muestras mediante la técnica de RT-PCR para el análisis de la expresión de los genes mencionados, los resultados de los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, fotodocumentados, y analizados por densitometría mediante el software myImage Analysis de ThermoScientific versión 2.0.

En los resultados de la expresión relativa de los genes relacionados con apoptosis como el gen Bcl-2 se observó sobre expresión en dos muestras de tumores malignos, en el carcinoma simple y el carcinoma escamoso donde los valores de expresión fueron de 116% y 208% respectivamente. La expresión de Bax fue mayor en un carcinoma sólido y el carcinoma simple donde se obtuvieron los valores de expresión más altos de 55% y 75% respectivamente, para la expresión del gen Bcl-xL los valores de expresión más altos de 11% y 14% correspondieron al carcinoma escamoso y el carcinoma simple respectivamente.

En el caso de los resultados de la expresión relativa de los genes relacionados con angiogénesis, los valores más altos para el gen VEGF fueron de 14%, 17% y 20% en el carcinoma escamoso, un tumor mixto benigno y el carcinoma complejo mioepitelial

respectivamente; y para el gen Ets-1 fueron de 15%, 16% y 20% en el carcinoma simple, el carcinoma complejo mioepitelial y el carcinoma escamoso respectivamente.

En los resultados de la expresión relativa de los genes relacionados con proliferación celular como el gen CDC14A se observó mayor expresión en el carcinoma simple con 80% y sobre expresión en el carcinoma escamoso donde el valor de expresión fue de 104%. En el caso del gen RPS6KB1 se observó menor expresión en el osteosarcoma con 52%, y cuatro muestras mostraron valores de sobre expresión de 123% y 147% en dos tumores mixto benigno, y de 135% y 153% en un carcinoma sólido y el carcinoma escamoso respectivamente.

En promedio, los resultados mostraron que los genes en los que se observó mayor expresión fueron Bcl-2, CDC14A y RPS6KB1 en las tres poblaciones (tumores benignos, tumores malignos y glándula mamaria sana de canino) pero solo el carcinoma escamoso mostro sobreexpresión en estos tres genes.

Los resultados sugieren que Bcl-2 podría ser considerado como un biomarcador para este tipo de neoplasias, asociarse a malignidad y pobre pronóstico, sin embargo, son necesarios más estudios con un número de muestras más amplio.

1. INTRODUCCION

El cáncer es una patología que se caracteriza por cambios esenciales en la fisiología de la célula, dentro de los cuales se encuentran los mecanismos para evadir la apoptosis, auto-insuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, angiogénesis sostenida, un potencial de replicación ilimitado e invasión y metástasis del tejido.

Existen diferentes tipos de cáncer que afectan a los caninos. El tumor mamario canino es una de las neoplasias más frecuentes en la perra, representando el 47% de todos los tumores, cerca del 50 % son diagnosticados como malignos con alta frecuencia de metástasis.

Existen diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo de esta neoplasia como lo son predisposición genética, la alimentación, la exposición a agentes químicos, la raza, edad, el sexo, e incluso la esterilización. Los métodos de diagnóstico están enfocados en la histopatología del tejido; y los tratamientos más utilizados son la remoción del tejido afectado por cirugía, radioterapia y quimioterapia.

Gracias a los nuevos avances tecnológicos se ha priorizado el análisis de la expresión de proteínas que podrían estar involucradas en el desarrollo de tumor mamario canino. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de genes relacionados con apoptosis, angiogénesis y proliferación celular en tumor mamario canino y su asociación con la malignidad.

2. HIPOTESIS

La sobreexpresión de genes relacionados con apoptosis, angiogénesis y proliferación celular en tumor de glándula mamaria en caninos esta correlacionado con el tipo histopatológico del mismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar la expresión de los genes relacionados con apoptosis (Bcl-2, Bax y Bcl-xL), angiogénesis (VEGF y Ets-1) y la proliferación celular (CDC14A y RPS6KB1) en muestras de tumor mamario canino y en muestras de tejido sano por RT- PCR.

2.2 Objetivos específicos

3.2.1 Analizar la expresión de genes relacionados con apoptosis: Bcl-2, Bax y Bcl-xL en tejido sano de glándula mamaria y tumor mamario canino.

3.2.2 Analizar la expresión de los genes relacionados con angiogénesis: VEGF y Ets-1 en tejido sano de glándula mamaria y tumor mamario canino.

3.2.3 Analizar la expresión de genes relacionados con proliferación celular: RPS6KB1 y CDC14A en tejido sano de glándula mamaria y tumor mamario canino.

3.2.4 Correlacionar la expresión de los genes de estudio en tejido sano de glándula mamaria y la malignidad de los tumores mamaros caninos.

3. ANTECEDENTES

El cáncer, neoplasia o tumor puede considerarse una enfermedad genética que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células somáticas; cada tipo de cáncer es una situación distinta con peculiaridades dependientes del tipo de célula donde se originan, su etiología, el grado de malignidad y otros factores (Luque y Hernández, 2006).

Todos los tipos de cáncer comparten seis cambios esenciales en la fisiología de la célula, como lo son los mecanismos de evasión de la apoptosis, auto-insuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, angiogénesis, potencial de replicación ilimitado e invasión y metástasis del tejido (Hanahan y Weinberg, 2000).

El desarrollo de tumores en los animales como el perro, comparte muchas características clínicas, biológicas, y epidemiológicas con el cáncer humano incluyendo la morfología histológica, la genética del tumor, dianas moleculares, comportamiento biológico, y la respuesta a terapia convencional (Vail y MacEwen, 2000).

Las neoplasias mamarias caninas ocupan el segundo lugar en tumores de la piel, y con una prevalencia del 0,2% los tumores mamarios caninos (TMC) son las neoplasias más comunes en las perras (Dorn *et al.*, 1968; Moulton *et al.*, 1986). Histológicamente hablando, aproximadamente el 50% de los TMC se diagnostican como malignos y son causa común de muerte por metástasis en estos pacientes (Serenmo, 2003; Klopfleisch *et al.*, 2011).

4.1 Genes relacionados con apoptosis

4.1.1 Gen Bcl-2

La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como un mecanismo homeostático para mantener poblaciones de células en los tejidos (Elmore, 2007); también se produce como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos (Norbury y Hickson, 2001). Y aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, en algunos casos es el tipo de estímulos y/o el grado de estímulos los que determina si las células mueren por apoptosis, sin embargo, no todas las células morirán forzosamente en respuesta al mismo estímulo. Finalmente, la apoptosis es un proceso coordinado y a menudo dependiente de la energía, que implica la activación de un grupo de cisteína proteasas llamadas caspasas y una compleja cascada de eventos que enlazan los estímulos dando lugar a la muerte de la célula (Elmore, 2007).

Los estímulos apoptóticos se pueden propagar a través de dos cascadas, una de ellas es la vía extrínseca, en la que la transducción de señales se origina en el microambiente extracelular, iniciada por la interacción del ligando a los receptores de muerte (ejemplo, FAS/CD95, factor de necrosis tumoral receptor 1 [TNFR1]) (Galluzzi *et al.*, 2012), el acoplamiento de los receptores de muerte con sus ligandos provoca el reclutamiento de proteínas adaptadoras, tales como la proteína de dominio de muerte asociado a Fas (FADD), que a su vez recluta y varias moléculas agregadas de la caspasa-8, promoviendo así su auto-procesamiento y activación; entonces la caspasa-8 activa procesos proteolíticamente y activa la caspasa 3 y 7, provocando más eventos de activación de las caspasas que culminan en la proteólisis del sustrato y la muerte celular. La vía intrínseca (o mitocondrial) se activa en respuesta a las perturbaciones de homeostasis intracelular, incluidos los daños en el ADN, el estrés oxidativo y la sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol. En la vía intrínseca, diversos estímulos pueden activar uno o más miembros de la familia de proteínas BH3-only, estas proteínas actúan como sensores de vía específica para diversos estímulos y están regulados de manera distinta. Cuando la activación de las proteínas BH3-only está por encima de su umbral crítico, supera el efecto inhibitor del

miembro de la familia anti-apoptótica de células B de linfoma 2 (Bcl-2), se promueve el ensamblaje de oligómeros Bak-Bax en las membranas mitocondriales externas, permitiendo el flujo de salida de citocromo c, en el citosol, lo que desencadena el montaje del apoptosoma activando la caspasa-9 y propagándose entonces una cascada proteolítica de más eventos de activación de las caspasas, ver Figura 1 (Taylor *et al.*, 2007). En algunas situaciones, las señales de muerte por la vía extrínseca pueden perturbar la vía intrínseca a través de la proteólisis de la proteína BH3-only (BID, que es interacción BH3-agonista de dominio muerte) mediada por la caspasa-8. BID truncada (tBID) puede promover la liberación del citocromo c mitocondrial y el montaje del apoptosoma (que comprende ~ 7 moléculas del factor-1 activador de proteasas apoptóticas (APAF1) y el mismo número de homodímeros de la caspasa-9) (Taylor *et al.*, 2007).

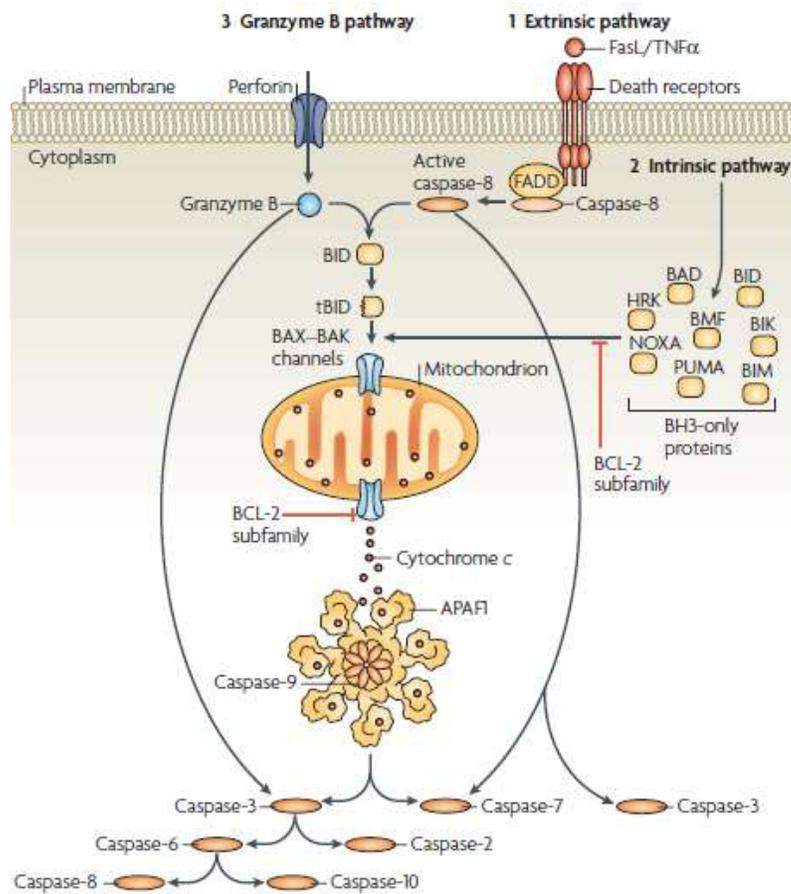


Figura 1. Vías de activación de las caspasas.

Por otra parte, los miembros de la familia de BCL-2 (BCL-XL, MCL 1, BCL2A1, BCL-W y BCL-B) tienen cuatro dominios de homología (BH) y todos bloquean la apoptosis mediante la prevención de la oligomerización de las proteínas pro-apoptóticas BH3-only BAX y/o BAK en la membrana externa mitocondrial (Holinger *et al.*, 1999).

En la actualidad a Bcl-2 también se le es reconocido como un oncogén. Y el producto del gen de Bcl-2 se vuelve oncogénico cuando se expresa en niveles mayores de lo normal como en ciertos tipos de cáncer linfoides de humanos (llamados linfomas foliculares de linfocitos B), se ha sugerido que la sobre expresión del gen Bcl-2 conduce a la supresión de la apoptosis en los tejidos linfoides, lo que permite que las células anormales proliferen para formar neoplasias linfoides (Luna *et al.*, 2008), por lo tanto la sobre expresión de esta proteína juega un papel importante en el desarrollo de las células cancerígenas. Se ha realizado un gran esfuerzo por determinar si la expresión de Bcl-2 está relacionada con otros agentes causales de enfermedades.

Yang y colaboradores (2006) analizaron por inmunohistoquímica el receptor de estrógeno (ER- α), Bcl-2 y el antígeno Ki67 en 39 muestras de tumor de glándula mamaria de canino (TGMC), concluyendo que el receptor de estrógeno puede ser el regulador de Bcl-2, como ocurre en el cáncer de mama humano; en contraste con la proliferación celular y la apoptosis, la expresión de ER- α y Bcl-2 fueron mayores en los TGMC benignos que en sus contrapartes malignas. Aún se desconoce por completo el papel que juega Bcl-2 y Bax en los diferentes tipos de tumor mamario canino.

Existe interés en el estudio de otras moléculas implicadas en los procesos de la apoptosis, como es el caso de Bcl-xL. En los seres humanos Bcl-xL está codificada por BCL2L1, un gen relacionado a Bcl-2 localizado en el cromosoma 20q1121, este codifica para dos productos de proteínas distintas por corte y empalme alternativo en el ARNm del mismo gen, uno de estos productos es el factor citoprotector de 233 residuos (Bcl-xL) y un polipéptido más pequeño de 170 residuos BCL-xS que ejerce las funciones de antagonista de Bcl-xL (Boise *et al.*, 1993). De manera similar a BCL-2, Bcl-xL contiene cuatro dominios (BH1-BH4) homólogos distintos BCL-2, así como una región

transmembrana, a través de la cual se localiza al menos en parte, varios compartimentos membranosos, incluido la membrana externa mitocondrial (OM, por sus siglas en inglés), el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear; y en el caso de BCL-xS, este carece de los dominios BH1 y BH2 (Wei *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que un producto de escisión generado de la caspasa Bcl-xL (que carece de un fragmento N-terminal) puede mediar la muerte celular neuronal en modelos de roedores de con lesión cerebral isquémica (Ofengeim *et al.*, 2012), lo que sugiere que los inhibidores químicos de BCL-2 también pueden ser empleados en algunas circunstancias como agentes citoprotectores (Michels *et al.*, 2013).

4.1.2 Gen Bax

Por otra parte, Bax una proteína pro-apoptótica también miembro de la familia de las Bcl-2, contiene los dominios BH1, BH2 y BH3 y membrana hidrofóbica anclada pero que carece del dominio BH4. Otros miembros de la familia Bax, incluyendo Bak, Bok, Bik, Bad, Bid, etc., todos contienen dominios BH3, aunque la mayoría carecen de los dominios BH1 y BH2 y el dominio de membrana hidrofóbica. En contraste con los miembros de la familia Bcl-2, la inserción de miembros de la familia Bax en la membrana mitocondrial induce la liberación de citocromo C y la inducción de la muerte celular apoptótica. La regulación de la familia pro-apoptótica Bax parece ser bastante compleja, ya que los mecanismos de activación apoptótica de esta variada familia de proteínas puede presentarse en respuesta a conjuntos específicos de múltiples señales débiles en lugar de estímulos individuales de mayor magnitud. Los miembros de la familia de las proteínas Bax se activan de diversas maneras como por la escisión por caspasas, la inhibición de proteínas quinasas y/o activación de fosfatasas, y un aumento en el pH intracelular (Pawlowski y Kraft, 2000).

Bax induce la liberación de citocromo c mediante la inhibición de la función de Bcl-2 a través de la unión de los dominios BH1, BH2 y BH3. Se ha demostrado que los extremos C terminal de las familias de proteínas Bcl-2 y Bax contienen un dominio que es necesario para la inserción mitocondrial y la delección de estos bloquea la apoptosis

inducida por Bax (Nechustan *et al.*, 1999). Este dominio (aminoácidos 171-192) contiene varios residuos hidrófobos intercalados con treoninas y serinas. En otros estudios se ha demostrado que la mutación de la serina en el residuo ácido 184 (S184E, S184K, o S184D) bloquea la capacidad de Bax para insertarse en la membrana mitocondrial, mientras que la mutación de este residuo en un aminoácido hidrofóbico (S184A o S184V) favorece la localización de Bax a la membrana mitocondrial (Goping *et al.*, 1998).

4.1.3 Gen Bcl-xL

En otro estudio donde se utilizaron líneas celulares con sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL, se utilizó la proteína Bax marcada con el fin de identificar su localización intracelular, la introducción de esta proteína marcada no demostró cambio en la sobreexpresión de Bcl-2 y Bcl-xL, pero si se demostró que Bax se encuentra soluble en el citosol, además se demostró que tras la inducción de la apoptosis, Bax se trasladó a las membranas externas de las mitocondrias por la eliminación de un dominio hidrofóbico COOH-terminan, inhibiendo así su redistribución durante la apoptosis (Wolter *et al.*, 1997).

4.2 Genes relacionados con angiogénesis

4.2.1 Gen VEGF

Durante los procesos neoplásicos la formación y el mantenimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial para el crecimiento de un tumor o la metástasis (Folkman, 1995; Ellis y Hicklin, 2008). Durante las primeras etapas de crecimiento de los tumores sólidos, las necesidades de nutrientes y oxígeno se ven cubiertas por los tejidos sanos contiguos, sin embargo, a consecuencia del crecimiento acelerado en los tumores, el volumen de irrigación sanguínea normal no se da abasto para cubrir estas necesidades anormales, de ahí que la angiogénesis es un proceso esencial para la sobrevivencia del tumor (Hollingsworth *et al.*, 1995).

El proceso de la angiogénesis se inicia con la proliferación y la migración de células endoteliales vasculares, un proceso eminente regulado por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) (Carmeliet, 2000; Ferrara *et al.*, 2003). Posteriormente, se produce una migración de pericitos y células musculares lisas, las cuales se adhieren a las células endoteliales para proporcionar soporte y estabilidad a la pared vascular. Estos procesos son controlados por factores de crecimiento, entre ellos el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) (Erber *et al.*, 2004; Presta *et al.*, 2005).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de las células endoteliales vasculares (CE). En humanos, la familia VEGF se compone de siete miembros - VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, F-VEGF y el factor de crecimiento placentario (PlGF), los cuales comparten una estructura común de ocho residuos de cisteína espaciados característicamente en un dominio de homología de VEGF. Estos miembros tienen diferentes propiedades físicas y biológicas, actúan a través de receptores de tirosina quinasa específicos - VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Las proteínas VEGF son cruciales en el desarrollo embrionario y en otras condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la cicatrización de heridas, artritis reumatoide, neovascularización ocular, la progresión tumoral, endometriosis y enfermedades cardiovasculares (Roy *et al.*, 2006).

VEGF es uno de los factores estimuladores de la angiogénesis más importantes y estudiados en tumor mamario canino (TMC). En TMC, el patrón de expresión citoplásmica del VEGF difiere entre las células mamarias neoplásicas benignas y malignas, y tanto VEGF como su receptor han sido analizados por inmunohistoquímica (Millanta *et al.*, 2010).

4.2.2 Gen Ets-1

El nombre de Ets se deriva del virus de la eritroblastosis aviar, secuencia E26, y el nombre fue cambiado posteriormente a secuencias de transformación específica Ets o E26 (Watson *et al.*, 1985; Bhagwat y Vakoc, 2015). La familia de factores de transcripción Ets consta de 27 miembros en los seres humanos con expresión en una variedad de tejidos, esta familia se divide en subfamilias (Ets-1 y Ets-2, ERG, GABP, PEA3, alces, ELF y PU) (Davidson *et al.*, 2001), todos los miembros de esta familia tienen un dominio de unión a ADN único de ~85 aminoácidos de longitud, este contiene un motivo invariable C/A GGA A/T que se encuentra localizado dentro de las regiones promotor o potenciador de múltiples genes; además, esta familia constituye una clase de fosfoproteínas que actúan en trans que han demostrado tener papeles importantes en proliferación celular, la diferenciación y la transformación oncogénica (Eckel *et al.*, 2003; Sharrocks, 2001; Wasylyk *et al.*, 1993).

En los humanos, el gen de Ets-1 codifica dos transcritos de ARNm, uno de larga duración de transcripción (6,8 kb), y uno de corte y empalme alternativo de la transcripción (2,7 kb) (Collyn d'Hooghe *et al.*, 1993). Se ha demostrado en células T humanas que el producto del gen de Ets-1 puede consistir de al menos seis proteínas, cuatro especies principales con pesos moleculares aparentes de 51 kDa (p51), 48 kDa (p48), 42 kDa (p42) y 39 kDa (p39); y dos proteínas menores de 52 kDa (pp52) y 49 kDa (PP49), las cuales han demostrado ser las formas fosforiladas de p51 y p48, respectivamente (Koizumi *et al.*, 1990).

4.3 Genes relacionados con la proliferación celular

4.3.1 Gen CDC14A

En todas las células eucariotas, la entrada en la mitosis está regulada por la activación de quinasas dependientes de ciclina (CDK); por el contrario, la salida de mitosis depende de la inhibición de la actividad CDK y una inversión de eventos de fosforilación de CDK

(Morgan, 1999). CDC14A (ciclo división celular 14A) es una fosfatasa de doble especificidad, se requiere para la separación del centrosoma y la citocinesis durante la división celular. En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la función primaria de Cdc14 es para inactivar la actividad de la CDK al final de la mitosis, permitiendo de ese modo a las células reentrada en fase G1 (Chen *et al.*, 2009).

En humanos, se han identificado dos homólogos funcionales de levadura Cdc14, Cdc14A y Cdc14B (Li *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 2005). Hasta hace poco, la mayoría de los estudios se centraron en la función de Cdc14A en el ciclo de la duplicación del centrosoma, sin embargo en un estudio se observó que ya sea arriba o debajo del gen, la regulación de la expresión de Cdc14A puede causar una división celular cromosómica aberrante de las células hijas (Mailand *et al.*, 2002). Además, Cdc14A tiene un papel importante en la desfosforilación del sitio 315/serina de la proteína p53, y se evidenció que existe poca expresión de Cdc14A en líneas celulares de cáncer que tienen p53 tipo salvaje (Paulsen *et al.*, 2006). Se ha demostrado que Cdc14B tiene un papel importante en la estabilidad en la dinámica de los microtúbulos del huso, a través de la agrupación y estabilización de la proteína (Cho *et al.*, 2005). Sin embargo, la red de regulación de Cdc14A / B no se ha aclarado totalmente.

4.3.2 Gen RPS6KB1

La proteína ribosomal S6 de 70kDa (p70S6K) es una serina/treonina quinasa codificada por RPS6KB1 (situado en locus 17q23), esta proteína está regulada por vía PI3K / AKT / mTOR y desempeña un papel crucial en el control del ciclo celular, el crecimiento y la supervivencia (Heinonen *et al.*, 2008; Couch *et al.*, 1999; Bärlund *et al.*, 2000).

Por otra parte, en estudios recientes por hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés) se ha demostrado que existe un incremento sobre la distribución y frecuencia en el número de copias del locus 17q23 en 166 diferentes tipos de tumores, observándose un incremento en la amplificación exclusivamente en el cáncer de mama

(Andersen *et al.*, 2002); y en otros estudios por hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés), este locus ha demostrado ser amplificado en hasta un 20% de las líneas celulares de cáncer de mama primario (Bärlund *et al.*, 2000).

4.4 Técnicas de diagnóstico para TMC

En pacientes caninos la técnica de diagnóstico más utilizada es la histopatología convencional. En el caso de humanos, la inmunohistoquímica (IHQ) en paralelo con la histopatología ha desempeñado un papel cada vez más importante como una herramienta diagnóstica para la identificación de neoplasias y patógenos (Eyzaguirre y Haque, 2008). En la patología mamaria humana, la IHQ se utiliza rutinariamente para ayudar en el pronóstico y determinar el tratamiento específico para el paciente (Payne *et al.*, 2008), sin embargo, el costo de la técnica limita su aplicación en el área veterinaria.

4.5 Tratamiento para TMC

Los tratamientos contra el tumor mamario en la perra incluyen la cirugía, la quimioterapia, los tratamientos hormonales, la radioterapia, entre otros. A pesar de que estos tratamientos son efectivos, ocasionan efectos adversos; tales como la toxicidad e inmunosupresión en el caso de las quimioterapias, y una posible metástasis debido a la inadecuada recesión de los tumores al momento de la cirugía (Herme *et al.*, 2005).

Los tratamientos convencionales para cáncer como la radioterapia, quimioterapia y la terapia hormonal resultan en efectos adversos en células normales como la inducción de apoptosis a través de la vía de p53 (Elmore, 2007).

Actualmente se ha incursionado en el desarrollo de nuevas estrategias de terapia génica para suprimir la expresión de genes involucrados en el desarrollo de las neoplasias, resultado ser efectivas de forma experimental. Es importante determinar la biología

molecular del cáncer en tumor mamario canino ya que nuestro grupo de trabajo ha realizado experimentos *in vitro* e *in vivo* silenciando la expresión del gen WT1 logrando reducir la proliferación celular, inducir apoptosis, aumentar la sobre vida y quimio sensibilización (Zapata et al., 2012; Zamora et al., 2009).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del material biológico

Se obtuvieron 15 muestras de tumor mamario canino de clínicas veterinarias localizadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México y 2 muestras de tejido sano de glándula mamaria del centro antirrábico de Monterrey, bajo las condiciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-003-Z00-1995.

Las muestras fueron divididas en 2, una parte fue conservada en formol al 10% para el análisis histopatológico, y otra parte fue almacenada a -70 °C para la extracción de ARN.

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 minutos y se colocaron en un bloque con parafina líquida en estufa a 60° durante 2 horas. Se realizaron los cortes seriados de 5mm a 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 tiñó con toda 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.

5.3 Extracción de ARN

Se colocaron 50 mg de muestra en un tubo estéril libre de RNAsas y DNAsas con 1ml TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies™, California, USA). Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionó a cada tubo 200µL de

cloroformo, el cual se 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 estéril libre de RNAsas y DNAsas. A continuación se precipitó el ARN, agregando a cada tubo 500µL de isopropanol y se mezcló por inversión (3 y 6 veces). Los tubos se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 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 a 12,000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Finalmente se eliminó el alcohol y el paquete de ARN se re suspendió en un volumen de 20 µL 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 (Biotek Instruments, Inc., Winoosky, VT) 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 estéril libre de nucleasas de 1.5 ml que contenía: 5µg de ARN, 1µl de dNTP's (10mM), 1µl de Oligo dT (0-05µg/µl) (Invitrogen Life Technologies™, California, USA), y se aforó hasta un volumen de 12 µl con agua grado molecular libre de nucleasas. Los tubos se incubaron en un termoblock sin agitación a 65°C por 5 minutos. Después se adicionó a cada uno 4 µl de buffer de la enzima RT 5X, 2µl de DTT (100Mm) y 1µl de inhibidor de RNAsas (Invitrogen Life Technologies™, California, USA) y se incubaron a 42°C por 2-3 minutos sin agitación. Posteriormente se agregó a cada tubo 1µl de la enzima Transcriptasas Reversa (RT) (200U) (Invitrogen Life Technologies™, California, USA) y se incubaron a 42°C por 50 minutos sin agitación. Para finalizar la reacción, se aumentó la temperatura a 70°C por 15 minutos y el ADNc obtenido se almacenó a -20°C. Se realizó en un termociclador Maxygen II de la marca Axxygen (Corning Life Sciences, Union City, CA, USA).

5.5 PCR para el análisis de la expresión de los genes estudiados

Se usó 1µl del ADNc obtenido de cada muestra y se amplificó utilizando una solución que contenía 2.5U (0.5µl) de Taq DNA polimerasa, 5µl de buffer de reacción 5x MyTaq (BIOLINE™) con 2.5mM de dNTP's y 7.5Mm de MgCl₂, 100ng/µl de cada uno de los primers (ver Tabla 1.), la solución se aforó con agua DEPC hasta un volumen de 25 µl. Se utilizó un termociclador Maxygen II de la marca Axygen (Corning Life Sciences, Union City, CA, USA) bajo condiciones específicas de amplificación para cada gen, ver Tabla 2.

Tabla 1. Primers para PCR de los genes estudiados

Gen	Primers (Forward y Reverse 5'-3')	Amplicon (pb)
B-Actina	F- CGTGCGTGACATCAAGGAAGAAG R- CAGGAAAGAAGGTTGGAAGAGTGC	178 (Lu et al. 2010)
Bcl-2	F- TGGATGACTGAGTACCTGAA R- GGCCTACTGACTTCACTTAT	206 (Nagamatsu et al. 2008)
Bcl-xL	F- GGCCTACTGACTTCACTTAT R- CTCTCGGCTGCTGCATTGTT	185 (Nagamatsu et al. 2008)
Bax	F- GGTTGTTGCCCTCCTCTACT R- GTAAGCACTCCAGCCACAAA	219 (Nagamatsu et al. 2008)
VEGF	F- AGGAGGGCAGAATCATCACG R- CAAGGCCACAGGGATTTTCT	341 (Zhang et al. 2014)
Ets-1	F- GGGTGACGACTTCTTGTGTTG R- GTTAATGGAGTCAACCCAGC	274 (Ito et al., 1998)
RPS6KB1	F- GCACAGCAAATCCTCAGACACCT R- GTTCGGCTGTCGTATTGGAAGTG	115(Król et al. 2010)
CDC14A	F- CTCGACTGTTTGCAGGGAATCAGA R- CTGGAACAATCCAGTTGAAGTCA	126 (Król et al. 2010)

Tabla 2. Condiciones de amplificación para cada gen

Gen	Inicio	Elongación (35x)	Finalización
β -Actina		94°C x 1 min; 59.6°C x 30 seg; 72°C x 40 seg.	
Bcl-2		94°C x 1 min; 56.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	
Bcl-xL		94°C x 1 min; 64.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	
Bax	94°C x 3 min.	94°C x 1 min; 60.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	72°C x 5 min.
VEGF		94°C x 1 min; 60.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	
Ets-1		94°C x 1 min; 57.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	
RPS6KB1		94°C x 1 min; 60.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	
CDC14A		94°C x 1 min; 60.0°C x 1 min; 72°C x 40 seg.	

5.6 Densitometría

Los productos de amplificación se mezclaron con 1 μ L de GetRead (GenScript,), y los genes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 120 minutos a 90 volts. Los gels fueron fotodocumentados utilizando un equipo PhotoDoc-it™ (Ultra Violet Products, Ltd., Upland, CA), el cual cuenta con una cámara Canon con un sensor de 14.1 megapíxeles. Las fotografías obtenidas fueron utilizadas para el análisis de expresión de densitometría mediante un software myImage Analysis de ThermoScientific versión 2.0 (Waltham, MA, USA), el cual asigna valores cuantitativos a las bandas de acuerdo a la intensidad promedio por pixel de cada una.

5.7 Correlación entre la expresión de los genes estudiados y el tipo histopatológico

Con los datos de la densitometría y el software statistix 10.0 se analizaron las muestras por poblaciones con una media del 95%.

6 RESULTADOS

6.1 Clasificación histológica

Se realizó el análisis histopatológico de un total de 17 muestras, 15 de tumor mamario canino y 2 de glándula mamaria sana. De las muestras de tumor mamario canino 9 se clasificaron como tumores benignos lo que representa el 52.9% del muestreo total y 6 como tumores malignos lo que representa el 35.2% del muestreo total, ver Tabla 3 y Figuras 2 a la 4.

Tabla 3. Clasificación histológica del total de las muestras

Clasificación histopatológica de las muestras analizadas		
Tumores benignos 60% (9/15)	Tumores malignos 40% (6/15)	Tejido sano
Mixto benigno (5)	Carcinoma simple	Glándula mamaria sana (2)
Adenoma	Carcinoma complejo mioepitelial	
Adenoma simple	Carcinoma escamoso	
Adenoma Mixto	Carcinoma sólido (2)	
Adenoma complejo	Osteosarcoma	

()= Número de tumores con la misma clasificación

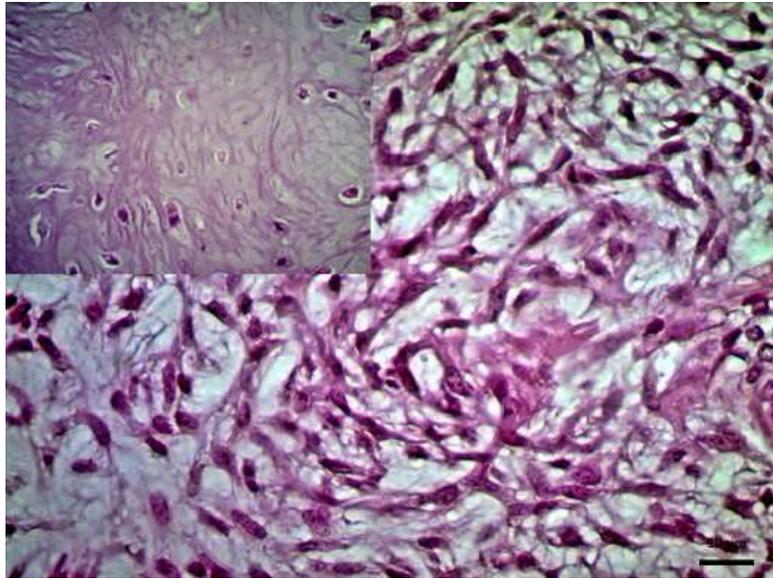


Figura 2. Canino, hembra, glándula mamaria, tumor mixto de glándula mamaria. Se aprecia una zona de celularidad, una matriz mucinosa y una temprana formación condroide. H&E, barra: 10 μ m. En el recuadro se aprecia una zona del mismo tumor con mayor diferenciación condroide. H&E, 400x.

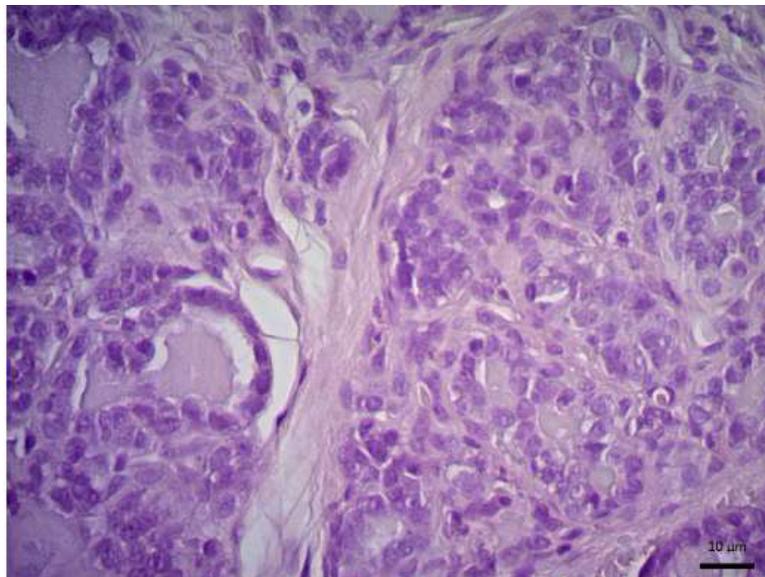


Figura 3. Canino, hembra, glándula mamaria, adenoma simple. El patrón glandular se muestra en orden y las células cuboidales aparecen con polaridad hacia su membrana basal formando acinos. Sin embargo, hay zonas en las que el epitelio muestra desorden y proyecciones hacia el lumen H&E, barra: 10 μ m.

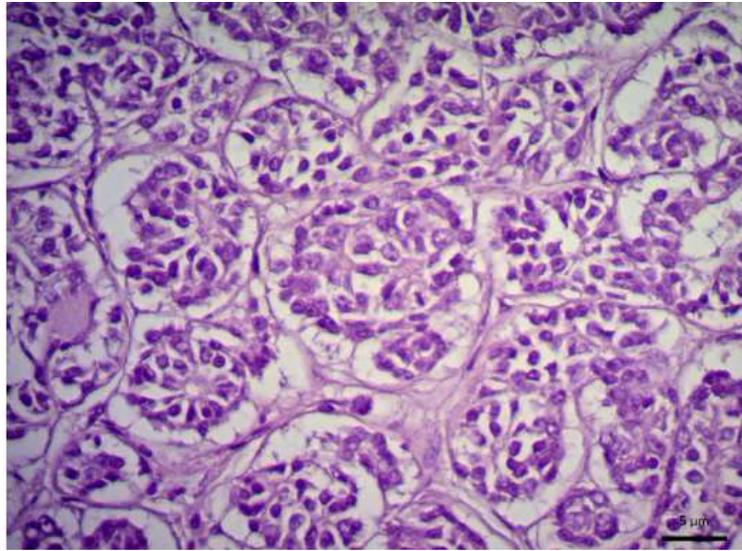


Figura 4. Canino, hembra, glándula mamaria, carcinoma simple. Los acinos se encuentran hiper celulares compuesto por células pleomórficas, sin orden, ni polaridad. Muchas de estas están desprendidas de la membrana basal y se mantienen en conglomerado. Hay mitosis aisladas y figuras con cromatina aberrante. H&E, barra: 5 μ m.

6.2 Extracción de ARN

Se realizó la extracción del ARN de 15 muestras de tumor de glándula mamaria y de 2 tejidos sanos, ver Figura.2.

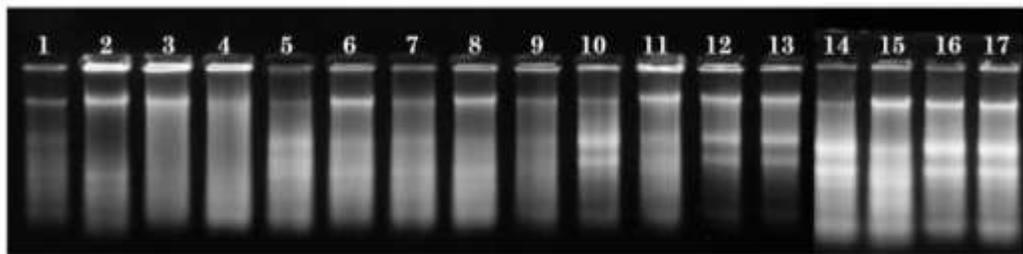


Figura 5. Análisis de la integridad del ARN. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carriles del 1 al 9 tumores mamarios benignos, del 10 al 15 tumores mamarios malignos, y del 16 al 17 glándula mamaria sana.

6.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con apoptosis

Se analizó la integridad del ADN complementario mediante la amplificación del gen constitutivo beta actina, logrando amplificar la banda esperada de 178 pb en las 17 muestras analizadas.

En el caso de BCL-2 se amplificó la banda en todas las muestras (tumores benignos, malignos y muestras de tejido sano) observándose menor intensidad en la muestra de carcinoma sólido y en las 2 muestras sanas.

Al analizar la expresión del gen BAX, se observó amplificación en el 55% de los tumores benignos, en 66% de los tumores malignos y no se logró amplificar en las muestras de tejido sano.

No se logró observar amplificación del gen BCL-XL en ninguna de las muestras analizadas, ver Figura 6.

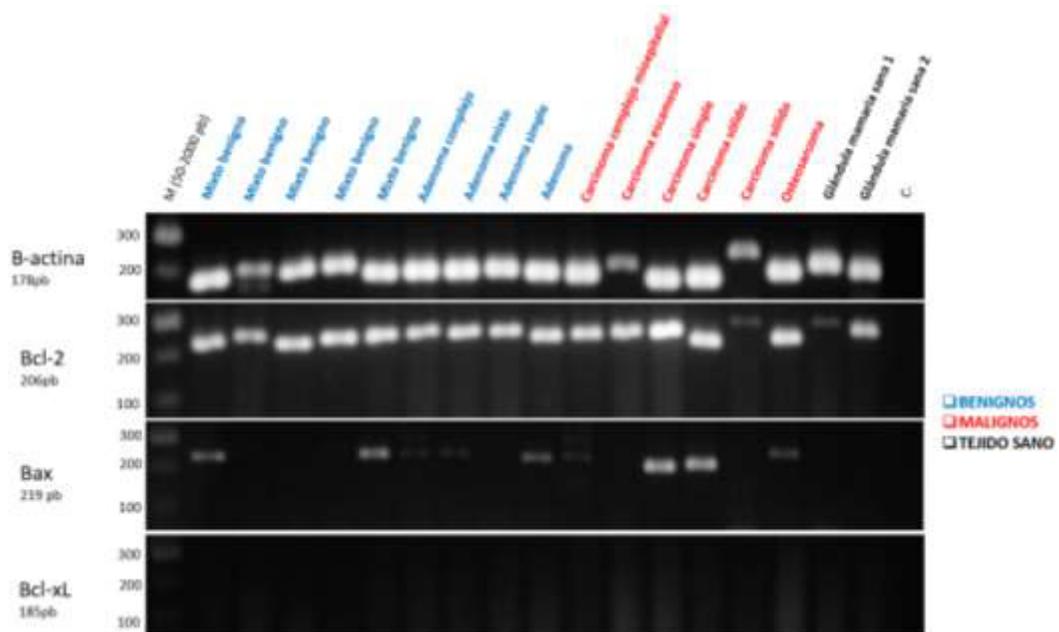


Figura 6. Análisis de expresión de los genes β -actina, Bcl-2, Bax y Bcl-xL. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en negro.

6.4 Análisis de la expresión de genes relacionados con angiogénesis

Se analizó la integridad del ADN complementario mediante la amplificación del gen constitutivo beta actina, logrando amplificar la banda esperada de 178 pb en las 17 muestras analizadas.

No se logró observar amplificación de los genes VEGF y Ets-1 en ninguna de las muestras analizadas, ver Figura 7.

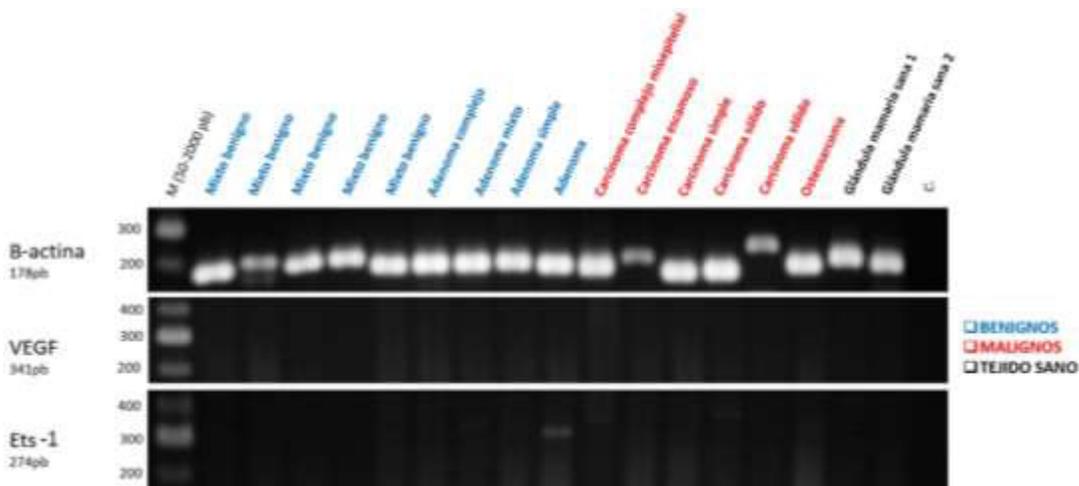


Figura 7. Análisis de expresión de los genes β -actina, VEGF y Ets-1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en negro.

6.5 Análisis de la expresión de genes relacionados con proliferación celular

Se analizó la integridad del ADN complementario mediante la amplificación del gen constitutivo beta actina, logrando amplificar la banda esperada de 178 pb en las 17 muestras analizadas.

En el caso de CDC14A se amplificó la banda en todas las muestras de tumores benignos (100%), en el 83% de los tumores malignos y en el 50% las muestras de tejido sano, aunque se observó una menor intensidad en la muestra sana.

Al analizar la expresión del gen RPS6KB1, se observó amplificación en todas las muestras (tumores benignos, malignos y muestras sanas) en la misma intensidad, ver Figura 8.

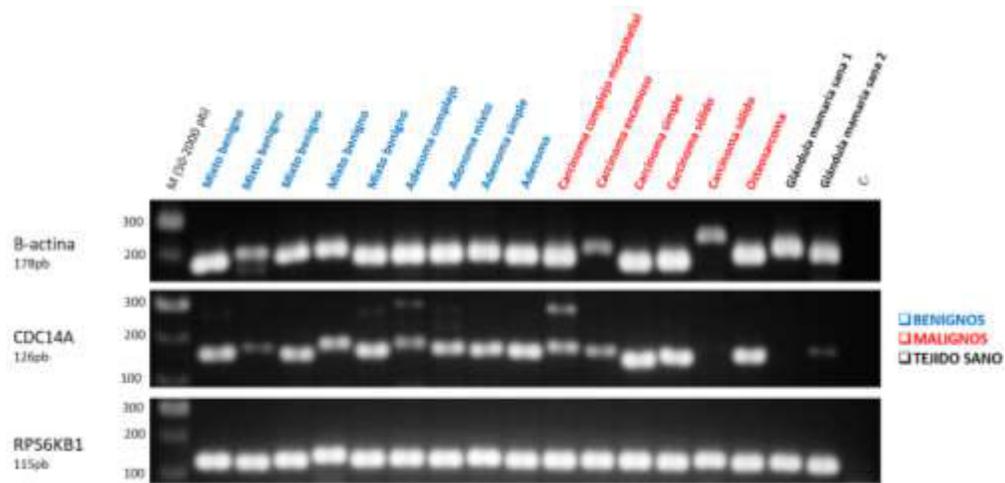


Figura 8. Análisis de expresión de los genes β -actina, CDC14A y RPS6KB1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en negro.

6.6 Análisis de densitometría

El análisis cuantitativo de la expresión de los genes amplificados se realizó con el software myImage Analysis de ThermoScientific versión 2.0, donde se muestran los valores de densidad promedio por pixel de expresión por genes y poblaciones, ver Tabla 4. Y se graficó la expresión relativa de todos los genes en las tres poblaciones, donde se observó que los genes con mayor densidad promedio de expresión fueron RPS6KB1, Bcl-2 y CDC14A, ver Figura 9.

Tabla 4. Densidad promedio de expresión de los genes estudiados

Medias (Densidad/área)

Genes	Benignos (9)	Malignos (6)	Tejido sano (2)
Beta actina	34404.2222	30133.6667	31076
BCL-2	24958.4444	28233.8333	13700.5
BAX	4903.77778	10215.6667	-695.5
BCL-xL	1397.22222	1890	104
VEGF	2248.33333	2376.83333	1370.5
ETS-1	2503.33333	3392.16667	1758.5
CDC14A	16028.3333	18230.5	4011
RPS6KB1	29512.5556	26397.3333	26754.5

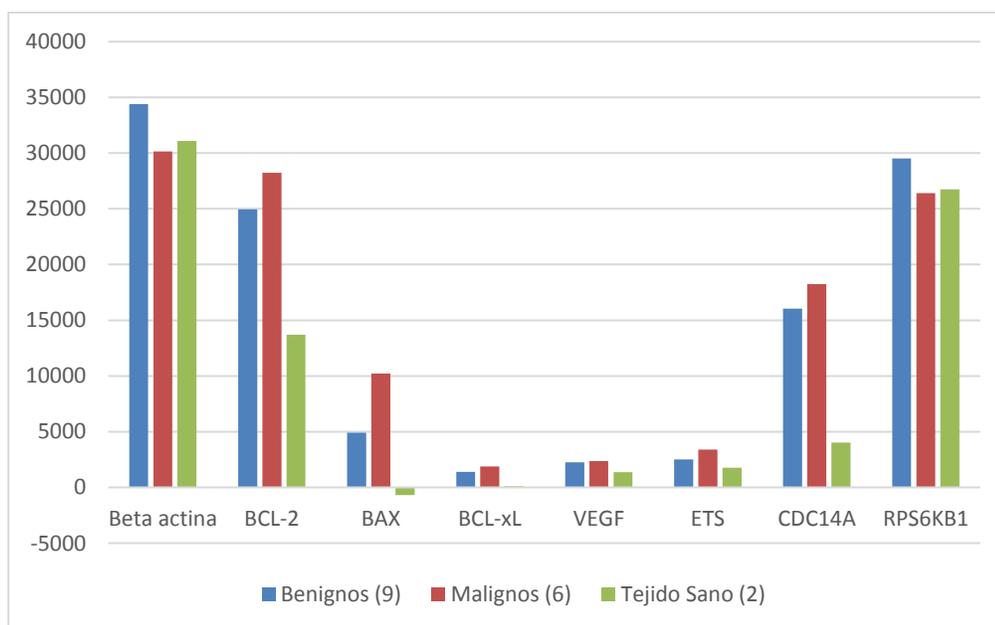


Figura 9. Análisis de la densidad promedio de amplificación de genes estudiados.

Gráfica de barras de la densidad promedio por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde. La intensidad promedio se determinó por píxeles de los productos amplificados de los genes estudiados sobre beta actina con el software ThermoScientific versión 2.0.

6.6.1 Análisis de densitometría de los genes relacionados con apoptosis

La expresión relativa del gen Bcl-2 de la mayoría de las muestras de tumores benignos y malignos se encuentra entre el 60 y 90%, sin embargo, se observó sobre expresión en dos muestras de tumores malignos, en el carcinoma simple y el carcinoma escamoso donde los valores de expresión fueron de 116 % y 208% respectivamente, ver Figura 10. En el caso de la expresión relativa del gen Bax en la mayoría de las muestras de las tres poblaciones se encontraba por debajo del 30%, sin embargo, un carcinoma sólido y el carcinoma simple tuvieron los valores de expresión más altos de 55% y 75% respectivamente, ver Figura 11. Con respecto a la expresión relativa del gen Bcl-xL de la mayoría de las muestras de las tres poblaciones fue mucho menor al 8%, pero nuevamente observamos que el carcinoma escamoso y el carcinoma simple obtuvieron los mayores valores de expresión, 11% y 14% respectivamente, ver Figura 12.

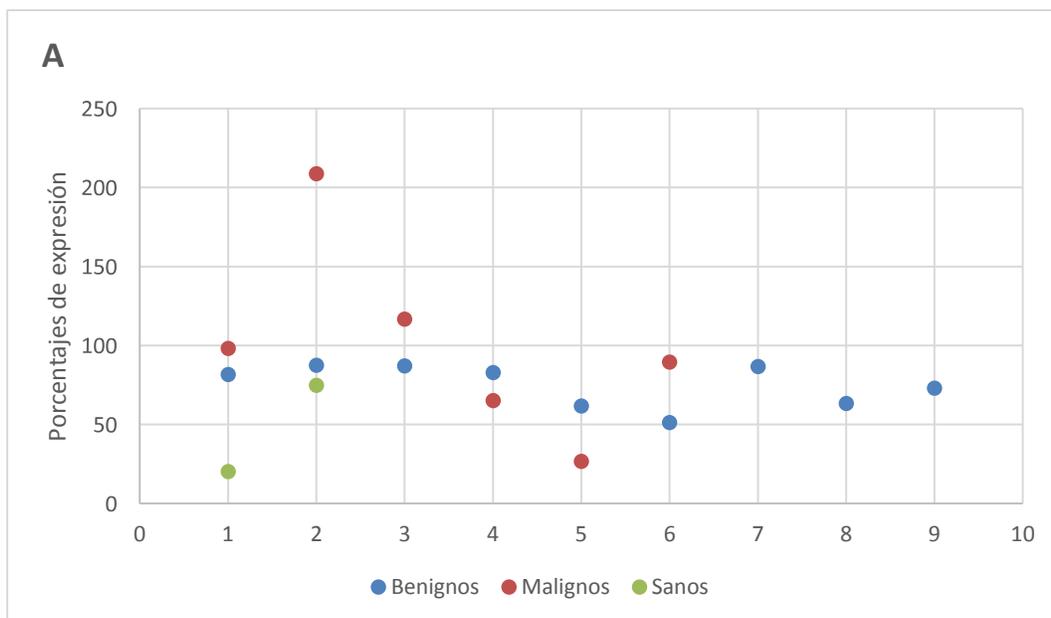


Figura 10. Análisis de la expresión relativa de gen Bcl-2 por poblaciones. El gráfico A muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

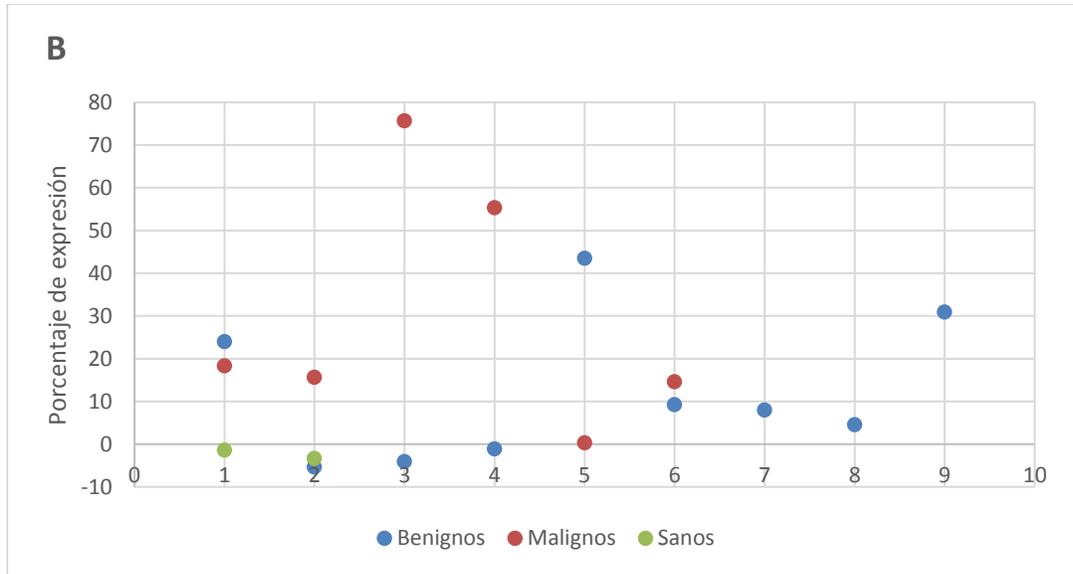


Figura 11. Análisis de la expresión relativa de gen Bax por poblaciones. El grafico B muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

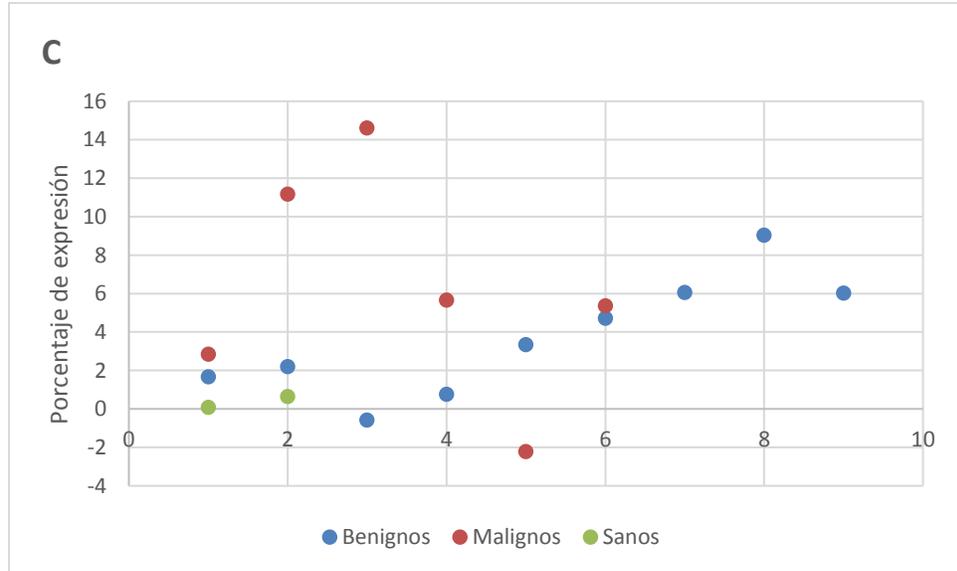


Figura 12. Análisis de la expresión relativa de gen Bcl-xL por poblaciones. El grafico C muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

6.6.2 Análisis de densitometría de los genes relacionados con angiogénesis

La expresión relativa del gen VEGF en la mayoría de las muestras de las tres poblaciones (tumores benignos, tumores malignos y tejido de glándula mamaria sana) se encuentra por debajo del 11%, sin embargo, dos muestras de tumor maligno el carcinoma escamoso y el carcinoma complejo mioepitelial se expresaron en 14% y 20% respectivamente, y un tumor mixto benigno mostró una expresión de 17%, ver Figura 13. En el caso de la expresión relativa del gen Ets-1 en la mayoría de las muestras de las tres poblaciones (tumores benignos, tumores malignos y tejido de glándula mamaria sana) se encuentran por debajo del 14%, sin embargo, tres muestras de tumores malignos mostraron mayor expresión, el carcinoma simple con 15%, el carcinoma complejo mioepitelial con 16% y el carcinoma escamoso con 20%, ver Figura 14.

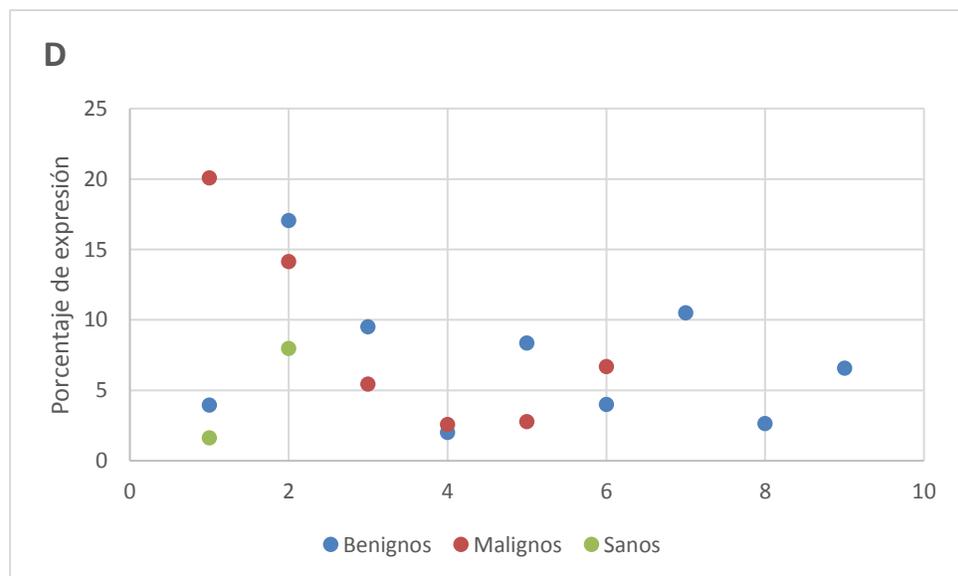


Figura 13. Análisis de la expresión relativa de gen VEGF por poblaciones. El gráfico D muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

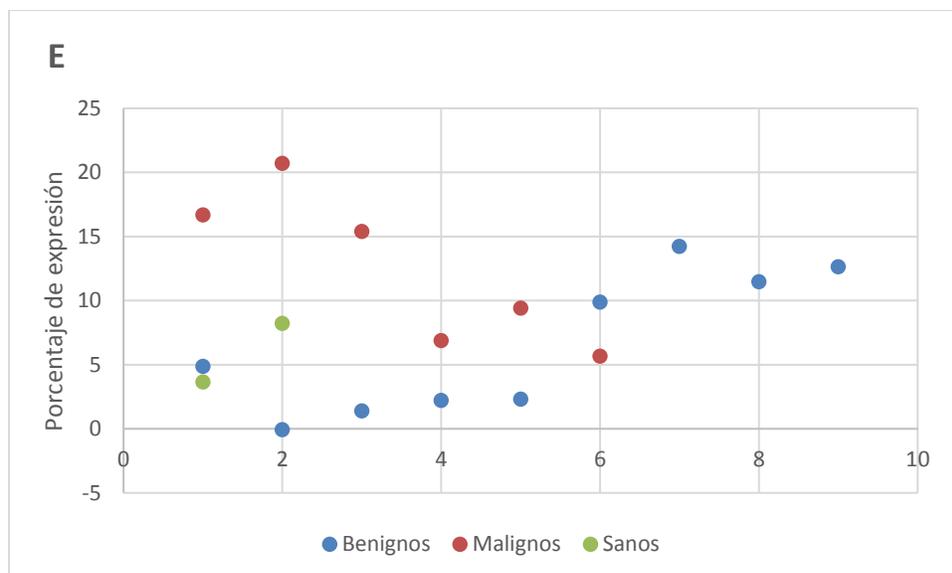


Figura 14. Análisis de la expresión relativa de gen Ets-1 por poblaciones. El gráfico E muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

6.6.3 Análisis de densitometría de los genes relacionados con proliferación celular

La expresión relativa del gen CDC14A en la mayoría de las muestras de las tres poblaciones (tumores benignos, tumores malignos y tejido de glándula mamaria sana) se encuentra entre el 30% y 70%, sin embargo, se observó mayor expresión en el carcinoma simple con 80%, y sobre expresión en el carcinoma escamoso donde el valor de expresión fue de 104%, ver Figura 15. Por otra parte, cabe destacar que de todos los genes analizados, la expresión relativa del gen RPS6KB1 fue la de mayor valor para las tres poblaciones (tumores benignos, tumores malignos y tejido de glándula mamaria sana) donde la muestra en la que se observó menor expresión fue el osteosarcoma con 52%, y donde cuatro muestras mostraron sobre expresión con los valores de 123% y 147% en dos tumores mixto benigno (tumores benignos), y de 135% y 153% en un carcinoma sólido y el carcinoma escamoso (tumores malignos) respectivamente, ver Figura 16.

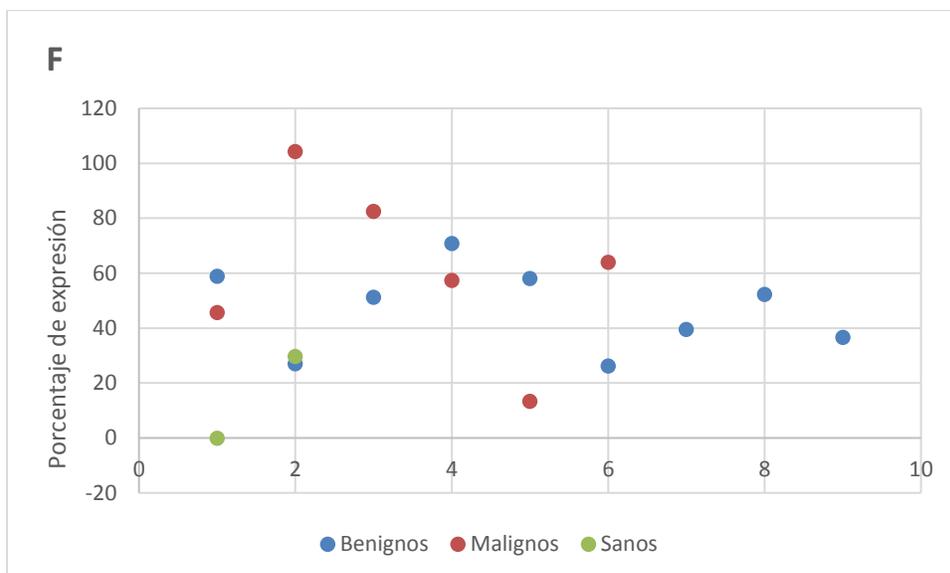


Figura 15. Análisis de la expresión relativa de gen CDC14A por poblaciones. El grafico F muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

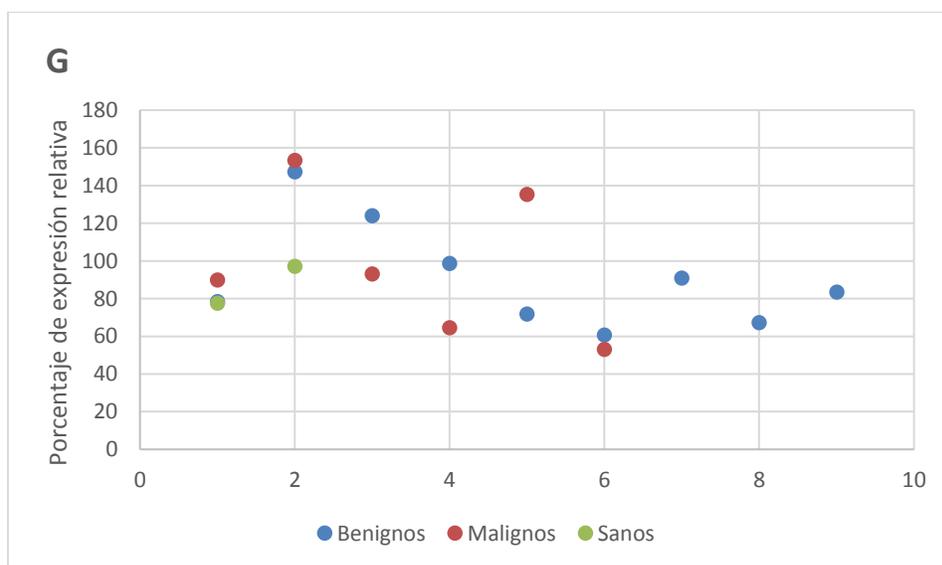


Figura 16. Análisis de la expresión relativa de gen RPS6KB1 por poblaciones. El grafico G muestra la dispersión de la expresión relativa de las muestras por poblaciones de tumores benignos en azul, tumores malignos en rojo y tejido sano en verde.

6.7 Correlación entre la expresión de los genes estudiados y el tipo histopatológico

Con los datos obtenidos del análisis de la intensidad promedio por pixel de los genes estudiados (ver Anexo), se realizó una tabla que muestra los promedios de los porcentajes de las expresiones relativas con respecto al gen constitutivo β -actina. Estos resultados muestran que en promedio, los valores de expresión relativa más altos de los tumores benignos y malignos son los de los genes Bcl-2, RPS6KB1 y CDC14A; y que de estos tres, el gen Bcl-2 tiene una sobreexpresión de 0.81% con respecto al gen constitutivo β -actina. Mientras que los genes que mostraron muy baja o nula expresión en los tumores benignos, malignos y el tejido sano fueron Bax, Bcl-xL, VEGF y Ets-1 (ver Tabla 5).

Tabla 5. Promedio de porcentajes de expresión de los genes estudiados.

Tipo de muestra	Genes estudiados						
	Bcl-2	Bax	Bcl-xL	VEGF	Ets-1	CDC14A	RPS6KB1
Tumores benignos	74.96	12.18	3.69	7.18	6.54	46.70	91.32
Tumores malignos	100.81	29.99	6.24	8.62	12.46	61.16	98.08
Tejido sano	47.48	-2.36	0.36	4.80	5.94	14.76	87.31

7. DISCUSION

El cáncer es una enfermedad que afecta a diferentes especies animales, y ya que el incremento de casos asociados a neoplasias en caninos ha ido en aumento, es inevitable mejorar las estrategias diagnosticas de los mismos. Tan solo en E.U.A. aproximadamente 6 millones de perros son diagnosticados con cáncer (Printz, 2011), y la American Pet Product Association en el 2011 reportó que los gastos referentes a mascotas han aumentado en un estimado de 51 billones de dólares tan solo en este país.

Los tumores de mama son las neoplasias más frecuentes en las perras y las mujeres, aunque en la perra es 4 veces más frecuente (Gupta *et al.*, 2012; Misdrop, 2002). En este estudio al igual que en lo reportado por Misdrop (2002) al rededor del 40-50% de los tumores que son analizados por histopatología resultan ser malignos.

La complejidad de los tejidos de las neoplasias mamarias caninas ha requerido de nuevas propuestas para su clasificación (Goldschmidt *et al.*, 2011). Los TMC más frecuentes son el tumor mixto benigno y el carcinoma en el caso de los malignos y los benignos respectivamente (sleeckx *et al.*, 2011), lo cual coincide con los resultados de esta investigación.

Durante las últimas décadas han surgido una variedad de propuestas de agentes etiológicos para el desarrollo de tumor mamario canino, dentro de las cuales se encuentran la predisposición genética, la alimentación, la predisposición a agentes químicos, edad, sexo, raza e incluso la esterilización según lo descrito por Torres y Eslava (2007).

En los caninos se ha evaluado el papel de algunos de los marcadores moleculares implicados en la carcinogénesis mamaria analizando los cambios de expresión, la evidencia indica que el aumento de expresión de receptor de estrógeno (RE), estradiol, así como proteínas implicadas en la proliferación celular, evasión de la apoptosis, la angiogénesis e invasión, pueden conferir alguna ventaja de crecimiento selectivo en los TMC (Vinothini *et al.*, 2009). En neoplasias mamarias caninas se ha observado que la

expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL aumenta o no presenta variación, mientras que proteínas pro-apoptóticas como Bax, caspasas 8 y 9 disminuyen su expresión, sin embargo la falta de información sobre la funcionalidad de estas proteínas y sus patrones de expresión han limitado su uso como marcadores pronósticos (Salas y Romero, 2011). Existen datos que indican que la sobreexpresión de Bcl-2 está relacionado con la baja regulación de Bax y la interrupción en la progresión de la apoptosis es dependiente al desequilibrio de Bcl-2/Bax, que desempeña un papel en el desarrollo del cáncer (Yildirim *et al.*, 2014). En este estudio encontramos un incremento de la expresión del gen Bcl-2 y baja expresión del gen Bax como lo descrito por Kumaraguruparan y colaboradores (2006); y el carcinoma escamoso, seguido de el carcinoma simple y el carcinoma complejo miepitelial son los tumores malignos que mostraron la mayor sobreexpresión. Hay algunos estudios acerca de la disminución de expresión de BCL-xL en tumores caninos pero solo uno artículo sobre su relación con TMC (Yildirim *et al.*, 2014). Kumaraguruparan y colaboradores (2006) reportaron que la expresión de Bcl-xL disminuye en TMC en comparación de los tejidos normales, y nosotros encontramos que los niveles de expresión de Bcl-xL de los tumores malignos son casi tan bajos como los de los tejidos sanos.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de las células endoteliales vasculares (CE) y ha demostrado ser crucial en el desarrollo de la progresión tumoral (Roy *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Qiu y colaboradores (2008), encontraron que la tasa de sobreexpresión de la proteína VEGF fue del 33,3% en los tejidos de las glándulas mamarias normales y del 78% en los tumores de glándula mamaria canina, encontraron que esta proteína no se relaciona con la edad o el tamaño del tumor pero si está estrechamente relacionada con metástasis en los ganglios linfáticos y el estadio clínico. En nuestro estudio se encontró muy baja expresión de gen VEGF en todas las muestras analizadas, tan baja incluso que no se percibió en las fotografías de los geles, esto pudo deberse a que en el momento en el que se realizó este trabajo aún no se encontraba identificada la secuencia genómica que codificaba para este gen en el canino y se utilizaron primers que fueron sintetizados a partir de la secuencia humana (Zhang *et al.*, 2014).

Ets-1 es un proto-oncogen que se expresa en la glándula mamaria durante el desarrollo de los conductos mamarios epiteliales, pero una vez terminado este proceso es casi indetectable pero se ha encontrado en los cáncer de mama, particularmente en los márgenes tumorales, las células endoteliales y en el estroma de los fibroblastos, su sobreexpresión se asocia con los carcinomas invasivos y de mal pronóstico en el cáncer de humanos (Furlan *et al.*, 2014). En este estudio encontramos baja expresión de Ets-1 en todas las muestras analizadas. En un estudio realizado por Buggy y colaboradores (2004) encontraron que los niveles de RNAm eran similares en fibroadenomas y carcinomas primarios de mama humanos.

CDC14A controla el ciclo celular y actúa principalmente en anafase, controlando la activación de los microtúbulos y la estabilización de la fibra, conduciendo así a la finalización del ciclo celular (Rao *et al.*, 2008). Król y colaboradores (2010) demostraron alto potencial proliferativo en varias líneas celulares de adenocarcinomas mamarios y en cáncer anaplásico mamario canino con alta expresión de CDC14A y otras proteínas. En nuestro estudio encontramos que la expresión de CDC14A se encontraba en todas las muestras de tumores benignos y malignos así como en el tejido sano, pero se encontró solamente sobreexpresión en el carcinoma escamoso.

La proteína ribosomal S6 quinasa 1 (S6K1) es el efector río a bajo del complejo rapamicina 1 (mTORC1) en mamíferos, que es un complejo de proteínas que regulan las funciones celulares esenciales, incluyendo la supervivencia celular, la proliferación, el metabolismo, la migración y la angiogénesis; se ha logrado amplificar en líneas células de cáncer de mama en humanos y caninos (Park *et al.*, 2015; Król *et al.*, 2010), en este trabajo encontramos expresión de RPS6KB1 en todas las muestras pero solo en dos tumores mixto benigno y en el carcinoma escamoso se encontró sobre expresada.

Otro factor importante a tomar en cuenta para estudios posteriores es el de considerar que al utilizar tejido sano como control no se debe olvidar que el ciclo estral de las perras es distinto al de otros mamíferos y el estado hormonal de cada fase del ciclo estral de la

glándula mamaria de la perra es muy complejo, y esto pudiera alterar la expresión de genes como los relacionados con la proliferación celular (Rao *et al.*, 2008).

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.
- Se detectó la expresión en el gen Bcl-2 por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con sobre expresión en el carcinoma simple y el carcinoma escamoso con valores de 116% y 208% respectivamente.
- Se detectó la expresión en el gen Bax por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con valores de expresión más altos de 55% y 75% para un carcinoma sólido y el respectivamente.
- Se detectó la expresión en el gen Bcl-xL por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con valores de expresión más altos de 11% y 14% para el carcinoma escamoso y el carcinoma simple respectivamente.
- Se detectó la expresión en el gen VEGF por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con valores de expresión más altos de 14%,17% y 20% en el carcinoma escamoso, un tumor mixto benigno y el carcinoma complejo mioepitelial respectivamente.
- Se detectó la expresión en el gen Ets-1 por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con valores de expresión más altos de 15%, 16% y 20% en el carcinoma simple, el carcinoma complejo mioepitelial y el carcinoma escamoso respectivamente.
- Se detectó la expresión en el gen CDC14A por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con un valor de expresión de 80% en el carcinoma simple y sobre expresión en el carcinoma escamoso con un valor de 104%.
- Se detectó la expresión en el gen RPS6KB1 por RT-PCR en todas las muestras de TMC, con expresión de 52% en el osteosarcoma, y sobre expresión con valores de 123% y 147% en dos tumores mixto benigno, 135% y 153% en un carcinoma sólido y el carcinoma escamoso respectivamente.
- En promedio los resultados mostraron que los genes en los que se observó mayor expresión fueron Bcl-2, CDC14A y RPS6KB1 en las tres poblaciones (tumores

benignos, tumores malignos y glándula mamaria sana de canino) pero solo el carcinoma escamoso mostro sobreexpresión en estos tres genes.

- Los resultados obtenidos por RT-PCR sugieren que Bcl-2 podría ser considerado como un biomarcador para este tipo de neoplasias, asociarse a malignidad y pobre pronóstico, sin embargo, son necesarios más estudios con un número de muestras más amplio.

ANEXO

Density (Intensity/area) de tumores benignos									
	LINEA 1	LINEA 2	LINEA 3	LINEA 4	LINEA 5	LINEA 6	LINEA 7	LINEA 8	LINEA 9
	Mixto Benigno	Adenoma complejo	Adenoma Mixto	Adenoma simple	Adenoma				
Beta actina	32379	20166	28124	33496	42028	47569	35407	39435	42104
Bcl-2	29229	20366	27220	30533	28990	27537	33422	28014	33668
Bax	9808	1311	1218	1977	20062	6607	5051	4068	14948
Bcl-XL	2182	2078	1508	1910	3023	3850	3734	5115	4124
VEGF	3295	5290	4621	2713	5473	3912	5647	3072	4752
Ets	3367	1835	2225	2562	2791	6431	6709	6233	7018
CDC14A	20612	7395	16050	25128	25942	14381	15779	22244	17226
RPS6KB1	30264	33723	39155	37682	35102	33945	36909	31510	39937

Density (Intensity/area) de tumores malignos						
	LINEA 10	LINEA 11	LINEA 12	LINEA 13	LINEA 14	LINEA 15
	Carcinoma complejo mioepitelial	Carcinoma escamoso	Carcinoma simple	Carcinoma sólido	Carcinoma sólido	Osteosarcoma
Beta actina	30270	18525	31848	45216	22284	40039
Bcl-2	32310	39923	39520	32499	9422	38571
Bax	7654	5031	25500	26667	2385	8001
Bcl-XL	2489	3593	6138	4150	1196	3740
VEGF	7890	4507	3728	3195	2645	4656
Ets	6695	5431	6564	4879	3831	4047
CDC14A	15523	20311	27525	27493	5090	27109
RPS6KB1	31906	32350	34335	34183	34298	26388

Expresión relativa de los genes normalizada con beta actina de tumores benignos									
	LINEA 1	LINEA 2	LINEA 3	LINEA 4	LINEA 5	LINEA 6	LINEA 7	LINEA 8	LI NEA 9
	Mixto Benigno	Mixto Benigno	Mixto Benigno	Mixto Benigno	Mixto Benigno	Adenoma complejo	Adenoma Mixto	Ad enoma simple	Ad enoma
Bcl-2	81. 5820733	87. 3943811	87. 0194095	82. 7992314	61. 701554	51. 1879842	86. 6225824	63. 3346421	73. 0317561
Bax	24. 0264535	- 5.3495986 5	- 4.1124414 4	- 1.0754354 4	43. 4776215	9.2 4275448	7.9 7905024	4.5 6484753	30. 8851593
Bcl-XL	1.6 7260586	2.2 0215463	- 0.5689001 3	0.7 7171016	3.3 3839894	4.7 2388269	6.0 6548263	9.0 4070148	6.0 2583549
VEGF	3.9 6481428	17. 0574567	9.5 2257009	2.0 2380214	8.3 6566062	3.9 9663351	10. 4953624	2.6 4886795	6.5 8609385
Ets	4.8 7335067	- 0.0739332 5	1.3 9808136	2.2 097564	2.3 0893671	9.8 8799931	14. 2200895	11. 4749378	12. 6461809
CDC14 A	58. 8590324	27. 0226025	51. 208448	70. 8175789	58. 0028433	26. 1183884	39. 5031746	52. 2601754	36. 570953
RPS6K B1	78. 3909596	147 .216941	123 .852904	98. 6673278	71. 7093975	60. 6379076	90. 8886093	67. 1744536	83. 4050986

Density (Intensity/area) de Tejido sano		
	LINEA 16	LINEA 17
	Glándula mamaria sana 1	Glándula mamaria sana 2
Beta actina	36180	28432
Bcl-2	10898	24137
Bax	1847	1410
Bcl-XL	1693	1837
VEGF	2631	4230
Ets	3128	4087
CDC14A	2230	10348
RPS6KB1	32940	32261

Expresión relativa de los genes normalizada con beta actina de tumores malignos						
	LINEA 10	LINEA 11	LINEA 12	LINEA 13	LINEA 14	LINEA 15
	Carcinoma complejo mioepitelial	Carcinoma escamoso	Carcinoma simple	Carcinoma sólido	Carcinoma sólido	Osteosarcoma
Bcl-2	98.11639 12	208.7655 39	116.6078 78	65.20711 14	26.62201 96	89.5513927
Bax	18.35399 45	15.65192 25	75.69403 62	55.34260 9	0.289731 17	14.6280502
Bcl-XL	2.851239 67	11.17085 86	14.62211 77	5.658618 65	- 2.20860644	5.35700482
VEGF	20.07575 76	14.14859 79	5.447775 82	2.580366 48	2.778569 39	6.68917004
Ets	16.68732 78	20.71118 82	15.39943 82	6.888555 45	9.413888 1	5.66363472
CDC14A	45.60950 41	104.2671 29	82.45803 12	57.32505 58	13.35613 19	63.9825814
RPS6KB1	89.73829 2	153.2466 03	93.04657 39	64.42277 09	135.1382 16	52.9310212

Expresión relativa de los genes normalizada con beta actina de tumores malignos		
	LINEA 16	LINEA 17
	Glándula mamaria sana 1	Glándula mamaria sana 2
Bcl-2	20.260372	74.7003897
Bax	-1.36480687	-3.36004706
Bcl-XL	0.09155937	0.64701125
VEGF	1.63376252	7.97735461
Ets	3.65951359	8.22733623
CDC14A	-0.13733906	29.6669363
RPS6KB1	77.5221745	97.1068304

LITERATURA CITADA

Andersen C., Monni O., Wagner K., Bärlund M., Bucher C., Haas P., Nocito A., Bissig H., Sauter G., Kallioniemi A. 2002. High-throughput copy number analysis of 17q23 in 3520 tissue specimens by fluorescence in situ hybridization to tissue microarrays. *American Journal of Pathology*. 161:73-79.

Bärlund M., Forozan F., Kononen J., Bubendorf L., Chen Y., Bittner M., Torhorst J., Haas P., Bucher C., Sauter G., Kallioniemi O., Kallioniemi A., 2000. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray A. *Journal of the National cancer institute*. 92: 1252-1259.

Bhagwat A. and Vakoc C. 2015. Targeting transcription factors in cancer. *Trends in Cancer*. 1: 53-65.

Boise L., González M., Postema C., Ding L., Lindsten T., Turka L., Mao X., Nuñez G., Thompson C. 1993. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74: 597-608.

Buggy Y., Magure T., McGreal G., McDermott E., Hill A., O'Higgins N. and Duffy M. 2004. Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2004: 1308-1315.

Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6: 389-395.

Chen J., Hu H., Zhang S., He M., Hu R. 2009. Brap2 facilitates HsCdc14A Lys-63 linked ubiquitin modification. *Biotechnology Lett*. 31: 615-621.

Cho H., Liu Y., Gomez M., Dunlap J., Tyers M., Wang Y. 2005. The dual-specificity phosphatase CDC14B bundles and stabilizes microtubules. *Molecular and Cellular Biology*. 25: 4541-4551.

Collyn M., Galiégue S., Szymiczek D., Lantoine D., Quief S., Loucheux-Lefebvre M., Kerckaert J. 1993. Quantitative and qualitative variation of ETS-1 transcripts in hematologic malignancies. *Journal Leukemia*. 7: 1777-1785.

Couch F., Wang X., Wu G., Qian J., Jenkins R., James C. 1999. Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Research*. 59: 1408-1411.

Davidson B., Reich E., Goldberg I., Gotlieb W., Kopolovic J., Berner A., Ben-Baruch G., Bryne M, and Nesland J. 2001. Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 7: 551-557.

Dorn C., Taylor D., Schneider R., Hibbard H., Klauber M. 1968. Survey of animal neoplasmas in Alameda and Contra Costa counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute/National Institutes of Health*. 40: 307-318.

Eckel K., Tentler J., Cappetta G., Diamond S., Gutierrez A. 2003. The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA and Cell Biology*. 2: 79-94.

Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35: 495-516.

Ellis M., and Hicklin J. 2008. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*. 8: 579-591.

Erber R., Thurnher A., Katsen A., Katsen A., Groth G., Kerger H., Hammes H., Menger M., Ullrich A., and Vajkoczy P. 2004. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *The FASEB Journal*. 2: 338-340.

Eyzaguirre E, Haque AK. 2008. Application of immunohistochemistry to infections. *Archives Pathology and Laboratory Medicine*. 132:424-431.

Ferrara N., Gerber H., and LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 9: 669-676.

Folkman J. 1995. Clinical applications of research on angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*. 26: 1757-1763.

Furlan A., Vercamer C., Bouali F., Damour I., Lelievre A., Wernert N., Desbiens X. and Pourtier A. 2014. Ets-1 controls breast cancer cell balance between invasion and growth. *International Journal of Cancer*. 135: 2317-2328.

Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. Alnemri E., Baehrecke E., Blagosklonny M., Dawson V., El-Deiry W., Fulda S., Gottlieb E., Green D., Hengartner M., Kepp O., Knight R., Kumar S., Lipton S., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M., Piacentini M., Rubinsztein D., Shi Y., Simon H., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., and Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death and Differentiation*. 19: 107-120.

Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V. 2011. Classification and Grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48: 117-131.

Goping I., Gross A., Lavoie J., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S., and Gordon S. 1998. Regulated Targeting of BAX to Mitochondria. *The Journal of Cell Biology*. 143: 208-215.

Holinger E., Chittenden T., Lutz R. 1999. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 13298-13304.

Hollingsworth C., Kohn C., Steinberg M., Rothenberg L., Merido J. 1995. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *American Journal of pathology*. 147: 33-41.

Heinonen H., Nieminen A., Saarela M., Kallioniemi A., Klefström J., Hautaniemi S., Monni O. 2008. Deciphering downstream gene targets of PI3K/Mtor/p70S6K pathway in breast cancer. *BMC Genomics*. 9: 1-12.

Hermo, G., Garcñia, M., Torres, P., Gobello, C. 2005. Tumores de mama en la perra. *Ciencia Veterinaria*, 7: 5-29.

Jeng P., and Cheng E. 2013. Cancer therapeutics: Pulling the plug on Bcl- xL. *Nature Chemical Biology*. 9, 352-352.

Klopfleisch, R., Euler, H., Sarli, G., Pinho, S., Gartner, F., & Gruber, A. D. 2011. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology Online*, 48: 98-116.

Koizumi S., Fisher R., Fujiwara S., Jorcyk C., Bhat N., Seth A., Papas T. 1990. Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5: 675-681.

Król M., Pawlowski M., Skierski J., Turowski P., Majewska A., Polanska J., Ugorski M., Morty E. and Motyl T. 2010. Transcriptomic “portraits” of canine mammary cancer cell lines with various phenotypes. *Journal of Applied Genetics*. 51: 169-183.

Kumaraguruparan R., Karunagaran D., Balachandran C., Manohar B., Nagini S. 2006. Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*. 365: 168-176.

Li L., Ernsting B., Wishart M., Lohse D., and Dixon J. 1997. A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 29403-29406.

Luna L., López D., González P., Triana M., Königsberg F. 2008. El Fantástico mundo de la proteína Bcl-2. *Revista de Educación Bioquímica*. 27: 93-102.

Luque C. and Herráez S. 2006. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Madrid, España. Editorial Harcourt. V1, P.p. 412.

Mailand N., Lukas C., Kaiser B., Jackson P., Lukas B. 2002. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nature Cell Biology*. 4: 318-322.

Michaels J., Keep O., Senovilla L., Lissa D., Castedo M., Kroemer G., and Galluzzi. 2013. Functions of BCL-XL at the interface between cell death and metabolism. *International Journal of Cell Biology*. 2013: 1-10.

Millanta F., Caneschi V., Ressel L., Citi S., Poli A. 2010. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*. 142: 36–42.

Misdorp W. 2002. Tumors of the mammary gland. In, Meuten DJ (Ed): *Tumors in domestic animals*, 4th ed., Iowa State Press, Iowa, 589-602.

Morgan D. 1999. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biology*. 1: 47-53.

Moulton J., Rosenblatt L., Goldman M. 1986. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Veterinary Pathology*. 23: 741-749.

Nagamatsu K., Tsuchiya F., Oguma K., Maruyama H., Kano R., Hasegawa A. 2008. The effect of small interfering RNA (siRNA) against the Bcl-2 gene on apoptosis and chemosensitivity in canine mammary gland tumor cell line. *Research in Veterinary Science*. 84: 49-55.

Nechushtan A., Smith C., Hsu Y., Youle R. 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO Journal*. 18: 2330-2341.

Ng. F., Nguyen M., Kwan T., Branton P., Nicholson D., Cromlish J., and Shore G. 1997. P28 Bap31, a Bcl-2/Ccl-XL-and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*. 139: 327-338.

Norbury C. and Hickson I. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Pharmacology and Toxicology*. 41: 367-401.

Ofengeim D., Chen Y., Miyawaki T., Li H., Sacchetti S., Flannery R., Alavian K., Pomtarelli F., Roelofs B., Hickman J., Hardwick M., Zukin R., Jonas E. 2012. N-terminally cleaved Bcl-xL mediates ischemia-Induced neuronal death. *Nature Neuroscience*. 15: 574-580.

Park J., Jin H., Lee H., Kim J., Park I., Noh W., Chang Y., Hong Y., Kim K. and Lee J. 2015. S6K1 inhibition enhances the apoptotic cell death of breast cancer cells in response to Bcl-2/ Bcl-xL inhibition by the downregulation of surviving. *Oncology Letters*. 10: 829-834.

Paulsen M., Starks A., Derheimer F., Hanasoge S., Li L., Dixon J., Ljungman M. 2006. The p53-targeting human phosphatase HCdc14A interacts with the CdkI-cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Molecular Cancer*. 5: 1-11.

Pawlowski J and Kraft A. 2000. Bax-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 97: 529-531.

Payne SJ, Bowen RL, Jones JL. 2008. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology*. 52: 82–90.

Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R., Rusnati M. 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2: 159-178.

Printz, C. (2011). Pet animals with cancer help advance human cancer research: similarities help to explore future human treatments. *Cancer*. 117: 4807-4808.

Qiu C., Lin D., Wang J., Li C. and Deng G. 2008. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumors. *Veterinary Research Communications*. 32: 463-472.

Rao N., Wolferen M., Ham R. Leenen D. Koerkamp M., Holstege F. and Mol J. 2008. cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. *Animal Genetics*. 39: 333-345.

Roy H., Bhardwaj S., Ylä-Herttuala S. 2006. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters*. 580: 2879-2887.

Salas Y. and Romero L. 2011. Cáncer de mama en perras (*Canis lupus familiaris*): Causas, factores de riesgo y marcadores moleculares en su clasificación y pronóstico. Similitud con el cáncer de mama humano. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 16: 56-64.

Schmitt E., Beauchemin M, and Bertrand R. 2007. Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1 (cdc2) during G₂/M cell-cycle check point. *Oncogene*. 26: 5851-5865.

Sharrocks A. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2: 827-837.

Sorenmo, K. 2003. Canine mammary gland tumors. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*. 33: 573-596.

Taylor R., Cullen S. and Martin S. 2007 Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Molecular Cell Biology*. 9: 231-241.

Torres G., Eslava P. 2007. Tumores mamarios en caninos: adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia*. 11: 99-110.

Vail D. and MacEwen E.. 2000. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*. 18: 781-92.

Vázquez M., Esteban A., Bueno A., Sacristán M. 2005. Functional homology among human and fission yeast Cdc14 phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 29144-29150.

Vinothini G., Balachandran C., and Nagini S. 2009. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: Correlation with histological grading. *Oncology Research*. 18: 193-201.

Wasylyk B., Hahn S. and Giovane A. 1993. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem*. 211: 7-18.

Watson D., McWilliams M., Nunn M., Duesberg P., O'Brien S., and Papas T. 1985. The Ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 21: 7294-7298.

Wei F., Rivard J., Mueller D., Behrens T. 1994. Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 153: 4388- 4398.

Wolter K., Hsu Y., Youle R. 1997. Movement of BAX from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 139: 1281-1292.

Yang W., Liu C., Chang C., Lee C., Chang K. and 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.

Zamora D., Zapata P., Franco A., Saavedra S., Trejo M., Resendez D., Isaias J. and Rodriguez C. 2009. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Therapy*. 16: 892-899.

Zhang Y., Yang H., Barnie P., Yang P., Su Z., Chen J., Jiao Z., Lu L., Wang S., Xu H. 2014. The expression of toll-like receptor 8 and its relationship with VEGF and Bcl-2 in cervical cancer. *International Journal of Medical Sciences*. 11: 608-613.

Zheng T. 2001. Death by design: the big debut of small molecules. *Nature Cell Biology*. 3: 43-46.

Zapata P., Manilla E., Zamora E., Saavedra S., Franco A., Trejo M., Davalos G. and Rodriguez C. 2012. WT1 silencing by RNAi synergizes with chemotherapeutic agents and induces chemosensitization to doxorubicin and cisplatin in B16F10 murine melanoma cells. *Oncology Letters*, 3: 751-755.