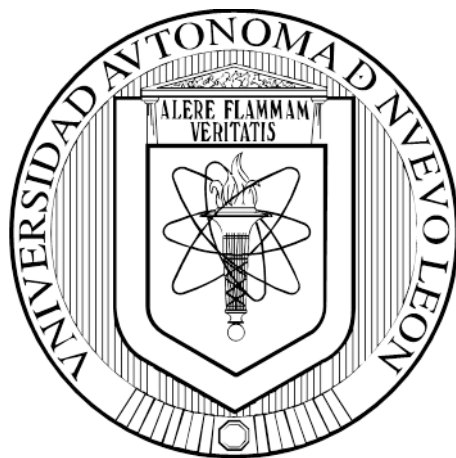


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

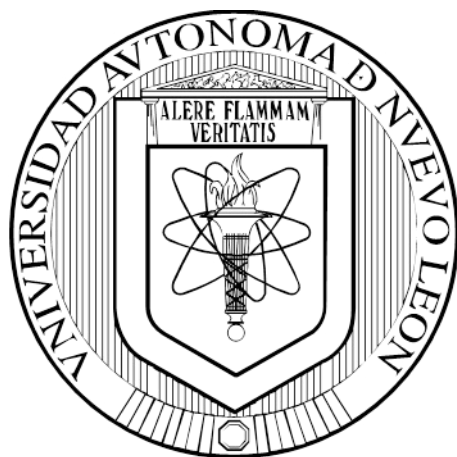
**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 (Tumor de Wilm's) EN
DIFERENTES NEOPLASIAS CANINAS**

PRESENTA
MVZ. LUISA CATALINA GONZÁLEZ NAVARRO

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

OCTUBRE, 2018

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



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 (Tumor de Wilm's) EN
DIFERENTES NEOPLASIAS CANINAS**

PRESENTA
MVZ. LUISA CATALINA GONZÁLEZ NAVARRO

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

OCTUBRE, 2018

ANÁLISIS DE LA EXPRESION DE WT1 (Tumor de Wilm's) EN DIFERENTES

NEOPLASIAS CANINAS

PRESENTADO POR:

MVZ LUISA CATALINA GONZÁLEZ NAVARRO

COMITÉ DE TESIS



Director

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



Director-externo

Dr. Pablo Zapata Benavides




Co-asesor

MC. Armando Trejo Chávez



Co-asesor

Dra. Sibilina Cedillo Rosales



Co-asesor

Dra. Martha Virginia Garza Zermeño

ANÁLISIS DE LA EXPRESION DE WT1 (Tumor de Wilm's) EN DIFERENTES
NEOPLASIAS CANINAS

Este trabajo fue realizado en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies y el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila y la Codirección del Dr. Pablo Zapata Benavides.



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



Dr. Pablo Zapata Benavides.

DEDICATORIA

Por fin lo logré, por fin me gradúo y cierro una etapa más en mi vida. Puedo decir ahora que me siento más preparada para continuar mi vida como Médico Veterinario y poder brindar un mejor servicio a mis futuros pacientes. No fue fácil el camino recorrido y durante todo este trayecto tuve personas a mi lado que hicieron este camino más llevadero.

Primero quiero agradecer a Dios y mis abuelitos que desde el cielo me cuidan, ellos me permitieron levantarme todos los días y vivir esta maravillosa experiencia.

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por ser los principales promotores de mis sueños; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. A mi hermano por el apoyo moral que siempre me aportó y por cocinarme a pesar de tener 12 horas de guardia más clases.

A mi novio por escucharme siempre que practicaba para los seminarios, por aguantarme cuando estaba muy estresada y por brindarme consuelo en momentos de debilidad.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado durante mis estudios de Postgrado, permitiéndome realizar una meta más en mi vida.

En especial a la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila y al Dr. Pablo Zapata Benavides por apoyarme en este proyecto, lo cual me han hecho un mejor estudiante y un mejor clínico.

A la Dra. Sibilina Cedillo Rosales por el apoyo brindado en toda la trayectoria de la maestría. Gracias por sus conocimientos y sus consejos.

Al MC. Armando Trejo Chávez que, a pesar del tiempo, siempre estuvo dispuesto a ayudarme con los diagnósticos histopatológicos y tenerme paciencia para que lograra entender los tejidos.

Gracias a la Dra. Vicky Garza Zermeño y al Hospital de Pequeñas Especies de la FMVZ por proporcionarme las muestras de tumores caninos.

A los laboratorios de Genética y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por el material brindado.

A mis técnicas y amigas Cinthia y Leslee, que siempre me brindaron su apoyo en momentos de estancamiento en el PCR.

A mis amigas y amigo Nohemi, Domenica y René por sus consejos en lo personal y en lo profesional.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
INDICE	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCION	1
2.JUSTIFICACION	3
3. HIPOTESIS	4
4. OBJETIVO	4
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
5. ANTECEDENTES	5
5.1 Cáncer	5
5.2 Bases moleculares.....	5
5.2.1 Ciclo Celular	5
5.2.2 Alteraciones en las señales de crecimiento	6
5.2.3 Pérdida de las señales inhibitoras de crecimiento	7
5.2.4 Evasión de la apoptosis.....	7
5.2.5 Alteración en la reparación del ADN.....	8
5.2.6 Potencial replicativo ilimitado	8
5.2.7 Angiogénesis sostenida	9
5.2.8 Invasión y metástasis	9
5.3 Oncología veterinaria.....	10
5.4 Cáncer en caninos	11

5.5 Factores genéticos asociados a neoplasias en caninos.....	13
5.6 Tumor de Wilms (WT1)	14
5.7 WT1 como supresor de tumores	16
5.8 WT1 como oncogén.....	17
5.9 Wt1 en humanos	18
5.10 WT1 en caninos	19
6. Materiales y métodos.....	20
6.1 Recolección de muestras.....	20
6.2 Diagnóstico histopatológico por tinción H&E	20
6.3 Extracción de ARN con Trizol	21
6.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	21
6.5 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo β-actina y WT1	22
6.6 Densitometría y correlación entre la expresión de WT1 y su tipo histopatológico	22
7. Resultados	23
7.1 Diagnóstico histopatológico por tinción H&E	23
7.2 RT-PCR para el análisis de la expresión del gen constitutivo β-actina y WT1	31
7.3 Análisis de la Densitometría	33
7.4 Correlación entre la expresión de WT1 y su tipo histopatológico.....	38
8. Discusión.....	39
9. Conclusión.....	41
10. Referencias	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasas de incidencias comparadas entre humano y canino.	12
Tabla 2. Resultados de la histopatología.	23
Tabla 3. Frecuencia de presentación de acuerdo a la raza	24
Tabla 4. Porcentaje de expresión de WT1 en tumores benignos y malignos por región	31
Tabla 5. Densidad de expresión en región del bazo.....	34
Tabla 6. Densidad de expresión en región de glándula mamaria	35
Tabla 7. Densidad de expresión en región de la cabeza	35
Tabla 8. Densidad de expresión en región posterior	36
Tabla 9. Densidad de expresión en región del cuello.....	37
Tabla 10. Promedio de expresión de WT1 en tumores benignos y malignos.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de WT1	15
Figura 2. Tumor mixto de glándula mamaria	25
Figura 3. Mixoma	26
Figura 4. Tumor mixto de glándula mamaria con calcificación	26
Figura 5. Miofibroma	27
Figura 6. Hemangioma	27
Figura 7. Fibroadenoma	28
Figura 8. Tumor venéreo transmisible	28
Figura 9. Carcinoma anaplásico	29
Figura 10. Carcinoma epidermoide inverso	29
Figura 11. Linfoma mixto	30
Figura 12. Expresión de β-actina y WT1 en tumores de la región del bazo.....	31
Figura 13. Expresión de β-actina y WT1 en tumores de la región de GM.....	32
Figura 14. Expresión de β-actina y WT1 en tumores de la región de cabeza	32
Figura 15. Expresión de β-actina y WT1 en tumores de la región posterior	33
Figura 16. Expresión de β-actina y WT1 en tumores de la región del cuello.....	33

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

μg	microgramo
μl	microlitro
AA	aminoácido
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
°C	grados Celsius
DEPC	dietilpírocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
gr	gramo
hrs	horas
IV	intravenosa
KTS	lisina-treonina-serina
Min.	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
nt	nucleótidos

OH	Hidroxilo
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrogeno
RNAm	RNA mensajero
Rpm	revoluciones por minuto
RT	transcriptasa reversa
Taq	polimerasa de <i>Termophilus acuaticus</i>
UV	ultravioleta
Vol.	Volúmenes
WT1	gen del Tumor de Wilms

RESUMEN

El desarrollo de neoplasias es común en animales de compañía presentándose de un 15-30% en perros. Actualmente, uno de los genes estudiados en cáncer en humanos es el gen del Tumor de Wilm's (WT1), el cual ha sido reconocido como biomarcador asociado a malignidad, quimioresistencia y mal pronóstico en diversos tipos de neoplasias y ha sido utilizado como blanco terapéutico, donde su silenciamiento resulta en una disminución en la proliferación de células cancerosas, aumento de la supervivencia, inducción de muerte celular y quimiosensibilización.

En el presente estudio se analizó la expresión de WT1 en 50 neoplasias caninas que se desarrollan en tejidos como glándula mamaria, vulva, escroto, bazo, prepucio, región de la cabeza y cuello.

La mayor frecuencia de neoplasias (58%) se encontró en el grupo de 11 a 15 años, siendo las hembras las más afectadas (62%). La mayor frecuencia de neoplasias se encontró en caninos Mestizos con un 22%. y en relación a los canes de raza, el Poodle resultó la más afectada (20%).

Se encontró expresión de WT1 en el 76% (38/50) de las muestras de tumores analizadas. En la correlación de la expresión de WT1 con el tipo histopatológico, se observó mayor expresión en tumores malignos en regiones de bazo con un promedio de densidad/píxel de 9791.98, glándula mamaria con 30407.85 y cuello 7739.35.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se entiende como el desarrollo de alteraciones genéticas que nos otorgan crecimientos y diseminación anormal de células en un organismo. A nivel mundial en el año 2015 se reportaron 8.8 millones de muertes por el cáncer en humanos. (Hernández-García, *et al.*, 2018).

Los tipos de cáncer a nivel mundial más comunes en humanos y de alta mortalidad anual son de pulmón, mama, hígado, estómago y colon-recto. (Alarcón, *et al.*, 2015)

En caninos la prevalencia se ha incrementado en los últimos años, esto a causa del incremento real del cáncer o por el interés de los propietarios de las mascotas en buscar nuevas alternativas de diagnóstico y tratamiento (Torres González-Chávez, *et al.*, 2015).

Algunas razas de perros como el labrador, poodle y chihuahueño son más susceptibles a la presentación de tumores malignos, desempeñando las hormonas un papel muy importante en el desarrollo de neoplasias (De la Cruz *et al.*, 2017).

En Estados Unidos se encuentra el cáncer como una de las causas más importantes para la muerte de los caninos. De tal modo que se hizo un registro de tumores como es el *California Animal Neoplasm Registry*, donde podemos encontrar la epidemiología, etiología, patogenia, tratamiento y pronóstico (De la Cruz *et al.*, 2017).

A pesar que la oncología veterinaria es una especialidad que apenas se está dando a conocer a nivel mundial, nos ofrece soluciones de tratamiento y así mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes, evitando en muchos casos la eutanasia (De la Cruz *et al.*, 2017).

En la actualidad existen marcadores moleculares pronósticos para los tumores en medicina humana, que poco a poco se han integrado en medicina veterinaria.

Uno de los genes estudiados en humanos es el gen de WT1 o Tumor de Wilm's, se ve relacionado en el desarrollo de diferentes órganos en el desarrollo embrionario, en sus inicios fue catalogado como un gen supresor de tumores, sin embargo, en la actualidad se ha encontrado sobreexpresado en distintos tumores en humanos, y está estrechamente relacionado con mal pronóstico y la quimioresistencia, por lo que se le conoce como oncogén (Hernández *et al.*, 2004). En humanos se ve sobreexpresado en leucemias y tumores sólidos como en cáncer de mama, pulmón y mesotelioma (Xu *et al.*, 2013).

En caninos la expresión de este gen se ha visto relacionado con un tumor estromal de cordones sexuales y en linfoma donde su expresión en este tumor indica una resistencia a la terapia dirigida, lo cual da una pauta para seguir estudiando este gen como un posible blanco terapéutico (Ichimura *et al.*, 2009; Sakai *et al.*, 2017).

Debido a que hay escasos reportes de la expresión de WT1 y su papel como factor pronóstico en caninos, el objetivo de este trabajo es analizar la expresión de WT1 en diferentes neoplasias caninas para evaluar su potencial como posible biomarcador.

2. JUSTIFICACIÓN:

La expresión de genes durante diferentes etapas del proceso neoplásico nos permite buscar biomarcadores que sirvan como blancos terapéuticos para nuevas estrategias de terapia génica.

En humanos, *WT1* ha sido considerado como un biomarcador y blanco terapéutico para diferentes tipos de tumores. En caninos, no se ha analizado la asociación entre la expresión de *WT1* y el desarrollo de neoplasias, para determinar su potencial como biomarcador y futuro blanco para el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas en cáncer.

3. HIPÓTESIS

En caninos, *WT1* se encuentra sobre expresado en neoplasias malignas asociado a estadíos tumorales avanzados y metástasis.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Analizar la expresión de WT1 en diferentes neoplasias caninas para evaluar su potencial como posible biomarcador.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Realizar el diagnóstico histopatológico de las muestras de neoplasias en caninos recolectadas en el HVPE de la FMVZ.

4.2.2 Analizar la expresión de ARNm de WT1 por PCR en punto final en las muestras de neoplasias en caninos.

4.2.3 Correlacionar la expresión de WT1 con el tipo histopatológico de las neoplasias.

5. ANTECEDENTES

5.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial, asociada a alteraciones genéticas y epigenéticas en las proteínas que regulan el ciclo de proliferación celular, produciendo una neoplasia. Si dicha neoplasia continúa su división celular de tal modo que invade a otros órganos se le conoce como metástasis (Monzón *et al.*, 2011).

Las mutaciones a nivel del genoma pueden ser por delección, sustitución o adición y afectan a los mecanismos responsables de mantener y reparar el ADN. Estas pueden ser heredadas o esporádicas, ocasionando en la célula transformaciones fisiológicas (Meza-Junco *et al.*, 2006)

Cuando una lesión es identificada como neoplasia, para su clasificación se utiliza un sistema binominal. Con este sistema las neoplasias se catalogan en: benignas o malignas y dependiendo de su lugar de origen en: mesenquimales o epiteliales (De la Cruz *et al.*, 2017).

5.2 Bases moleculares del cáncer

5.2.1 Ciclo celular

Es un mecanismo el cual nos permite originar células nuevas. Constituido de dos etapas: interfase y mitosis (M). La interfase se divide en fase G1, S y G2 y la mitosis en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Monzón *et al.*, 2011).

En la fase G1 ocurre el incremento del tamaño celular y la acumulación de ATP necesaria para la siguiente fase, en la fase S se lleva a cabo la replicación del ADN, en la fase G2 la célula se prepara para el proceso de mitosis. En la fase M se realiza la separación del genoma duplicado durante la fase S y la separación del citoplasma en el proceso de citocinesis. se busca que cada célula hija contenga una copia idéntica del ADN. Existen células que entran en fase de reposo o fase G0 y están tienen la capacidad de permanecer, días, meses y años (Monzón *et al.*, 2011).

Para que esto se lleve a cabo deben existir mecanismos de regulación de ciclo celular el cual se encuentra compuesto por dos familias de proteínas: las cinasas dependientes de ciclina (CDKs), reguladas por la fosforilación y desfosforilación en aminoácidos serina y treonina, y las ciclinas (cdc) estas se unen a las CDKs y así activan el dominio cinasa para que se pueda realizar la fosforilación de estas y otras proteínas blanco (Monzón et al., 2011).

5.2.2 Alteraciones en las señales de crecimiento

Para que una célula siga su proliferación debe sufrir varios mecanismos entre ellos la alteración a las señales de crecimiento, esto puede ser debido a mutaciones en genes que codifican las proteínas que participan en las vías de señalización, provocando una proliferación sostenida. Los protooncogenes son genes que participan en esta vía, cuando mutan son conocidos como oncogenes y codifican oncoproteínas que tendrán como función de ligandos, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales citoplasmáticas o de transcripción (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Existen proteínas transmembrana con un dominio fijador del ligando y otro dominio citoplasmático tirosina-cinasa (receptores asociados a tirosincinasa). En condiciones cuando un factor de crecimiento se une al receptor, el receptor se dimeriza y esto activa el dominio citoplasmático con actividad de cinasa para que se inicie la cascada de señalización intracitoplasmática que activará factores transcripcionales que promoverán la producción de RNAm para proteínas que activen la proliferación celular. En versiones oncogénicas estos tipos de receptores tienden a realizar una dimerización permanente y la activación de la señal, sin la unión del receptor con el factor de crecimiento (Maldonado y Santos, 2006)

Los factores de transcripción tienen secuencias de aminoácidos específicos que nos permiten la unión al ADN y de esta forma activar o inhibir la transcripción de genes que participan en la proliferación celular o en el mantenimiento de la integridad del ADN. Las familias Myb, Myc, Jun y Fos, son los más comúnmente alterados en los tumores (Monzón *et al.*, 2011).

5.2.3. Pérdida de las señales inhibitoras de crecimiento

Las proteínas participantes en estas señales son producto de los genes supresores de tumores. Los dos más caracterizados codifican para proteínas p53 y pRB (Retinoblastoma). Se dice que para que se presente un tumor, uno de los alelos mutados puede ser heredado y la segunda mutación ocurre por algún factor externo. La disminución de la proteína p53 a través de distintos mecanismos se ve relacionada a gran cantidad de cánceres, de igual manera, mecanismos que activan la fosforilación de pRB permiten la liberación de factores transcripcionales que promueven la síntesis de proteínas que permiten la continuidad del ciclo celular (proliferación celular). Por otro lado, WT1 se ha visto relacionada con el tumor de Wilm's en el riñón, así como de mama, pulmón, colon, entre otros (Monzón *et al.*, 2011).

5.2.4 Evasión de la apoptosis

Durante el proceso tumoral, la célula adquiere un fenotipo que se caracteriza por la falta de respuesta frente a las señales de inhibición por contacto (baja expresión o modificación de la señalización de las Cadherinas a nivel membrana), lo cual la lleva a una proliferación incontrolada y permite a la célula sobrevivir (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Existen receptores de membrana (receptor para ligando Fas, receptor TNF, receptores de TRADD) que reciben señales externas e inducen muerte celular (apoptosis vía extrínseca) y proteínas que reciben e integran señales de origen intracelular que promueven la permeabilización de la mitocondria para la salida de factores como el citocromo C (apoptosis vía intrínseca). Ambas vías activan caspasas iniciadoras y convergen en la activación de las caspasas ejecutoras (3,6 y 7), que inician una proteólisis de citoesqueleto, condensación y fragmentación de cromatina, vacuolización citoplasmática, obteniendo como resultado cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células vecinas (Meza-Junco *et al.*, 2006).

Una proteína que inicia el proceso de apoptosis al aumentar es p53, incrementa la transcripción de genes proapoptóticos como Bax. Una disminución en la proteína p53 altera la transcripción de Bax por ende disminuye la actividad apoptótica (Meza-Junco *et al.*, 2006).

5.2.5 Alteración en la reparación del ADN

Dentro de la célula existen 6 mecanismos de reparación de ADN, los primeros actúan en una de las cadenas del ADN: reparación de desapareamiento de bases (unión deficiente) (MMR, *mismatch repair*), reparación por escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*), reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*) y los que actúan en las rupturas bicatenarias del ADN; reparación por recombinación con cromosoma homólogo (HR), unión de extremos de tipo no homólogo (NHEJ) (Tafurt y Marin, 2014).

La reparación HR es un mecanismo el cual, el cromosoma dañado se repara a base del cromosoma homólogo no dañado, esta reparación se da pos-replicación (Tafurt y Marin, 2014).

La reparación de tipo NER es un mecanismo adaptable donde participan distintas proteínas que detecta la lesión, remueve los nucleótidos dañados. Una vez realizado este mecanismo los nucleótidos faltantes se agregan mediante la síntesis de ADN y posteriormente sellado por una ligasa (Tafurt y Marin, 2014).

La Reparación de tipo BER es utilizado para evitar daños y pérdidas de bases generada por la presencia de sitios apurínicos o la aparición de uracilos en el ADN por la deaminación de la citocina, y otros procesos donde solo se elimina el nucleótido dañado y se sustituye por otro. (Tafurt y Marin, 2014).

5.2.6 Potencial replicativo ilimitado

Para que no ocurra un fenómeno de replicación descontrolado, existen mecanismos de control como: la senescencia y crisis celular. La senescencia es el detenimiento de la replicación. Si la célula evade la senescencia y continúa su replicación, entra el control de crisis celular que constituye el acortamiento y fusión de extremos cromosomales (Monzón *et al.*, 2011; Tafurt y Marin, 2014).

En las células cancerígenas la evasión de la senescencia se lleva a cabo mediante el entrecruzamiento cromosomal que por recombinación mantiene una longitud telomérica. Y la crisis celular ocurre con un aumento de células tumorales junto con aumento de los niveles

de expresión de la telomerasa, la cual es responsable de agregar una secuencia repetida de TTAGGG en los extremos de los cromosomas, lo que está relacionado a su agresividad (Tafurt y Marin, 2014).

5.2.7 Angiogénesis sostenida

Así como el tejido normal, el tumor necesita de nutrientes y eliminar sus desechos metabólicos para su supervivencia y proliferación. Los tumores no pueden aumentar más de 1 o 2 mm de diámetro si no están vascularizados, debido a esto la angiogénesis es una condición importante para el crecimiento y metástasis (Monzón *et al.*, 2011; Tafurt y Marin, 2014).

La vascularización tisular es regulada por factores proangiogénicos y antiangiogénicos los cuales son producidos por las células y son secretados para que actúen en forma paracrina. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) son unos de los principales promotores del angiogénesis. Estos se unen a un receptor de membrana tipo tirosincinasa ocasionando el crecimiento y alargamiento de ramificaciones de los vasos sanguíneos contiguos. Estos vasos son tortuosos e irregulares carentes de capa media (Balzano y Diez, 2010).

5.2.8 Invasión y metástasis

El último paso de una célula tumoral es poder salir del sitio de origen y establecerse en otros sitios para la generación de nuevos tumores. El tumor primario pierde la cadherina E, lo cual inhibe la adhesión de las células a otras células, permitiéndole el desprendimiento del tejido, por otro lado, se detiene la inhibición por contacto de crecimiento y replicación celular.

Cuando el gen CDH1 se ve alterado existe una transición de la célula epitelial a fenotipo mesenquimal, lo que le permite al tumor desprenderse e invadir el vaso sanguíneo y producir metástasis (Balzano y Diez, 2010).

5.3 Oncología veterinaria

Es una rama de la medicina veterinaria que estudia los procesos neoplásicos. Ha ido incrementando con los años debido a que las mascotas tienden a vivir más años por la buena práctica en la prevención, diagnóstico y terapia que controlan con mayor facilidad enfermedades infecciosas antiguamente que causaban morbilidad y mortalidad (Flores, 1996).

Debido a esto los caninos tienen vidas más prolongadas, son expuestos a mayor tiempo a cancerígenos ambientales y teniendo una respuesta inmunitaria pobre, llegan a presentar tumoraciones benignas o malignas. Debido a las nuevas terapias en humanos, los propietarios de los perros se ven envueltos en optar por nuevas alternativas para el tratamiento de la neoplasia en lugar de optar por la eutanasia (Flores, 1996).

La oncología veterinaria es una especialidad poco conocida, sin embargo, ofrece soluciones para mejorar el diagnóstico, tratamiento y la calidad de vida del paciente (De la Cruz *et al.*, 2017).

Las pruebas de sangre, radiografías, ultrasonido, biopsia y su examen rutinario en el veterinario pueden ayudar a su pronto diagnóstico (De la Cruz *et al.*, 2017).

Síntomas que debemos considerar para una posible neoplasia:

- Úlceras persistentes al tratamiento
- Mal olor en alguna herida, aun ya con tratamiento
- Dificultad del animal para levantarse o realizar ejercicio físico
- Dolor o rigidez en alguna parte del cuerpo
- Disminución o pérdida del apetito
- Hemorragias
- Dificultad para orinar, defecar, tragar o respirar (Ferreira, 2003).

El tratamiento ante las neoplasias incluye la cirugía, la quimioterapia, los tratamientos hormonales, radioterapia. Aunque estos tratamientos sean efectivos, ocasionan efectos secundarios como la toxicidad e inmunosupresión hablando de las quimioterapias, y es

posible que en algunos casos se presente la metástasis debido a la mala resección del tejido neoplásico (Hermo *et al.*,2005).

En las radioterapias, quimioterapias y terapia hormonal, tiene como efectos adversos el provocar la apoptosis en células normales mediante la vía de p53 (Elmore, 2007).

5.4 Cáncer en caninos

El cáncer en los animales de compañía es una enfermedad importante y existen pocos registros en medicina veterinaria y específicamente en caninos, a diferencia de la medicina humana. (Elgue *et al.*, 2012).

En Estados Unidos se estima que uno de cada cuatro pacientes caninos fallece de cáncer, ya que es la principal causa de mortalidad rebasando los 2 años de edad (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015).

Del 100% de los tumores que se presentan en caninos, el 5% tiene un origen genético, siendo el 95% restante causado por factores como son: químicos, radiación, virus oncogénicos que directa o indirectamente causan cambios en el ADN (Fajardo *et al.*, 2006). El desarrollo de neoplasias en animales de compañía se presenta de un 15-30% en perros y un 26% en gatos (Bronden *et al.*,2007).

En estudios comparativos con humanos se muestran que la presentación de ciertos tumores en tanto el perro como en el humano da cierta similitud en el riesgo por edad, sexo y biología tumoral (Tabla 1).

Localización	Humano	Canino
General	300	213
Boca y faringe	12.6	20.2
TGI	73.6	24.8
Sistema respiratorio	47.1	8
Hueso	0.9	5.3
Tejidos Blandos	2.1	27.2
Glándula Mamaria	43.6	50.9
Útero	42	0.5
Ovario	13.9	1.9
Próstata	50	7
Sistema Urinario	12	2.4
Sistema Nervioso	5.8	2

Sistema Endocrino	5.5	6
Leucemias y Linfomas	21.3	25.7

Tabla 1. Tasas de incidencias comparadas entre humano y canino. (Misdorp, 1996)

En los Registros de Neoplasias de California (CANR), Estados Unidos y Canadá (VMPD), demuestran que las razas puras son más propensas a desarrollar neoplasias (Elgue *et al.*, 2012).

Las principales neoplasias por orden de presentación son las cutáneas con un 40-45%, siguiendo los tumores mamarios representando un 25-30 %. En países tropicales destacan la localización genital por el Tumor Venéreo Transmisible (TVT) (González- Chávez *et al.*, 2015).

La localización de tumores como anteriormente se mencionó el órgano principalmente afectado es la piel, sin embargo, es más común en perros viejos y normalmente son benignos, en contraste con los gatos que con mayor frecuencia son malignos (Aparicio y Forero, 2003).

En la glándula mamaria, el 50% de los tumores afectan a las perras, su esterilización es importante dentro de los primeros 12 meses de edad, para reducir un factor de riesgo en la presentación del cáncer (Mangieri, 1994).

En cabeza y cuello la neoplasia más común es en boca, siendo muy comúnmente malignos y en nariz causando estos tumores dificultad para respirar y hemorragias nasales (Monteiro *et al.*, 2011).

Los linfomas en perros son comunes, presentándose entre el 60-70% de origen celular B y entre el 10-38% de origen celular T (Veloza *et al.*, 2017) y se caracterizan por el crecimiento de uno o varios ganglios linfáticos (Torres y Eslava, 2007). En testículos se ven presentes las neoplasias en aquellos casos donde existe una retención testicular (Eslava y Torres, 2008).

En cuanto a tumores abdominales, son frecuentes, sin embargo, la forma de diagnosticarlos en una etapa temprana es complicado. En estas afecciones los animales presentan pérdida de peso y/o aumento de tamaño del abdomen (Hernández *et al.*, 2004).

Los perros de talla grande y mayores a siete años de edad, son más susceptibles tumores de hueso, sobre todo en huesos de patas, proximal a una articulación (Couto, 1998).

En relación al sexo, Vascellari y col. (2009), reportaron que en hembras la neoplasia más frecuente es el tumor mamario, siguiendo con piel y tejidos blandos, sin embargo, en machos los tumores en la piel y tejidos blandos ocupan los primeros lugares.

Con respecto a la raza, las de talla pequeña son más susceptibles a presentar neoplasias, entre las que destacan el Poodle, Maltes, Chihuahua, Cocker Spaniel, Springer Spaniel, Beagle (Salas *et al.*, 2016). En cuanto a las razas de talla grande se encuentra el Gran Danés y el Bóxer (Elgue *et al.*, 2012).

La edad en la presentación de neoplasias juega un papel importante, algunos tipos de tumores como el linfosarcoma y osteosarcoma caninos, son comúnmente presentados en animales geriátricos (Elgue *et al.*, 2012).

Con el avance en la sociedad, ha aumentado la conciencia por el bienestar animal de las mascotas, incrementándose así los tratamientos integrales (Ortiz *et al.*, 2015).

La terapia génica es una nueva modalidad para el tratamiento contra el cáncer. Se lleva a cabo mediante inactivación de genes disfuncionales, adición de genes funcionales e inserción de un gen (Mulherkar, 2001).

5.5 Factores genéticos asociados a neoplasias en caninos

Debido al aumento en el riesgo de presentación de tumor de glándula mamaria en caninos se menciona que tiene como un factor de riesgo los procesos genéticos, lo cual está íntimamente relacionado con la expresión disminuida del gen supresor de la proliferación celular p53 y protooncogenes como el c-erB2 y c-myc, que son responsables de la proliferación celular incontrolada (Torres y Eslava, 2007).

En relación a la piel, el gen Birt-Hogg-Dubé (BHD) se ve relacionado con la dermatofibrosis nodular en el pastor alemán junto con el factor de crecimiento transformable beta -1 (TGF- β 1). También se ve relacionado la sobreexpresión del gen p53. En tumores melanocíticos son los inhibidores de ciclinas/CDk como P21/waf-K1, P27/kip1, P16/ink-4a. En el melanoma se ve relacionado la mutación del gen N-ras (Withow y Vail, 2009).

En relación con el linfoma, el EBV (Epstein.Barr Virus) algunos autores mencionan que pueden estar relacionados con el linfoma de Hodking, en Burkitt y carcinoma nasofaríngeo,

esto en humanos. En caninos se ha observado el virus en linfomas de tipo B y expresa una proteína LMP-1 en la enfermedad linfoproliferativa maligna, transformando los linfocitos, indicándonos que la iniciativa de este virus es colonizar las células B generando así una activación clonal perdiendo su control en el ciclo celular produciendo linfomas (Veloza *et al*, 2017).

En relación al osteosarcoma, se ve elevada los niveles de proteína p53, siendo el 84% casos apendiculares y 56% casos axiales. También se encuentra el VEGF siendo un factor pronóstico negativo, así como factor de transcripción mesenquimatoso-epitelial (MET) que tiene funciones en la angiogénesis y metástasis (Selvarajah y Kirpensteijn, 2010).

Durante la última década las investigaciones con base molecular han ido en aumento tanto en caninos como humanos. Algunas investigaciones se enfocan en la determinación de genes relacionados con metástasis, proliferación celular, resistencia a fármacos, etc. (Selvarajah y Kirpensteijn, 2010).

5.6 Tumor de Wilm's (WT1)

El gen WT1 se identificó por primera vez en 1990 y fue clasificado como un gen supresor de tumores, debido a que las mutaciones y deleciones del gen se encontraban en el Tumor de Wilm's tumor renal en niños (Sakai *et al.*, 2017).

Es una proteína nuclear que contiene cuatro anillos de zinc y está constituida por 448 aminoácidos (Rodríguez *et al.*, 2001). Se encuentra en el cromosoma 11p13 que codifica para 10 exones y genera un ARNm de 3.5 Kb. Posee tres sitios de inicio de la traducción dando origen a 3 isoformas con distinto peso molecular: 62-64 kDa, 52-54 kDa y 36-38 kDa. La proteína más común de WT1 es la isoforma 52-54 kDa (Hernández *et al.*, 2004).

Posee un dominio C-terminal se encuentra unido al ADN que forma a los 4 dedos de zinc de tipo Kruppel, codificados por los exones 7-10 y un dominio N- terminal que está constituido por prolina y glutamina, un dominio de trasactivación, de dimerización y represión. (Hernández *et al.*, 2004).

Durante la maduración de su ARN sufren dos tipos de splicing alternativos: el primero en el exón 5 donde se insertan u omiten 17 aa entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al ADN y el segundo sucede entre el exón 9 y 10, en donde se insertan u omiten 3 aa: lisina, treonina y serina (KTS). Los procesos de maduración del ARNm generalmente se encuentran unidos a la isoforma KTS (+), mientras que los procesos de transcripción están con la isoforma KTS (-) (Fig. 1) (Hernández *et al.*, 2004).

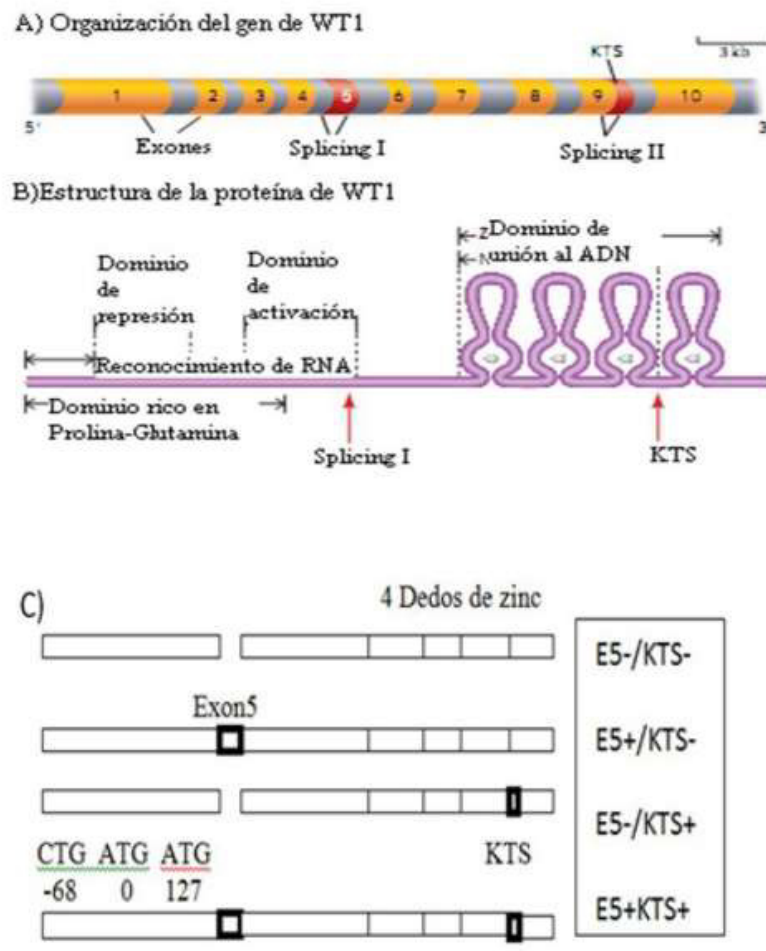


Figura 1. Estructura de WT1. A) Organización del gen WT1. Se muestran los 10 exones que conforman el RNAm y los dos sitios de splicing alternativos. B) Estructura de la proteína de WT1 donde se muestra el dominio de represión, activación, sitios de splicing, un dominio rico en Prolina-Glutamina en el extremo C y dominio de unión a ADN mediante los cuatro dedos de zinc en el extremo N. C) Isoformas de WT1 como resultado de los splicing alternativos: E5- /KTS-, E5+/KTS, E5-/KTS+, E5+/KTS+ de acuerdo a la presencia o ausencia de 17 AA en el exón 5, y de 3 AA (Lisina- Treonina- Serina). Se observan los 3

sitios de iniciación de la traducción que genera tres isoformas con diferente peso molecular: 60-62kD, 52- 54kD, 36-38kD.

La diferencia entre las isoformas se da por la presencia o ausencia de la secuencia de KTS, ya que las isoformas en las que no se encuentra el KTS son más afines al ADN. Se ha comprobado que mediante la localización de la proteína de WT1 es diferente la isoforma ya sea – o +. El KTS – se encuentra localizado en el núcleo ya sea en forma difusa o en grandes dominios. Al contrario de la forma KTS +, esta se encuentra en el interior o alrededor del núcleo. Generalmente esto se ve asociado a procesos de maduración del ARNm mientras el KTS – es asociado a procesos de transcripción (Zamora-Ávila *et al.*, 2007)

Todas aquellas mutaciones que afecten a la región de anillos de zinc altera la funcionalidad de esta proteína en humanos (Rodríguez *et al.*, 2005).

WT1 es un gen que codifica para un factor de transcripción SLUG y JUNB, también regula genes involucrados en la diferenciación sexual, proliferación celular como es el factor de crecimiento epidérmico (FCE) y apoptosis (Fernández *et al.*, 2009).

Durante la embriogénesis se expresa especialmente en el epitelio que da origen a los podocitos, igual que en el mesénquima renal, epitelio glomerular, gónadas fetales, bazo, corazón, glándulas adrenales, mesotelio, medula espinal y cerebro (Fernández *et al.*, 2009).

5.7 WT1 como supresor de tumores

El gen *WT1* se descubrió a partir de las deleciones en el cromosoma 11 asociados a síndrome de WARG, que se caracterizaba por aniridia, malformación genitourinaria, Tumor de Wilms, Síndrome de Drash-Drash (DDS) y Síndrome de Frasier. Por lo cual se comprobó que solo el 15% de los tumores de Wilms tenían mutaciones en el gen *WT1* y que estos presentaban una pérdida en la función de ambos alelos, lo cual se consideró como un gen supresor de tumores (Shin-ichi *et al.*, 2006).

La mayoría de las mutaciones puntuales en WT1 de DDS se encuentran en el dedo de zinc 2 o 3 dando como resultado proteínas cortas de aminoácidos que pueden actuar de forma

negativa dominante que inhiben la forma salvaje de WT1 expresada en el alelo restante (Yang *et al.*, 2007).

La introducción de WT1 isoforma -/+ en G401 línea celular tumoral proveniente de riñón la cual no expresa WT1 endógeno altera su morfología celular y reduce la formación de tumores en ratones. En líneas celulares Hep2B y de osteosarcoma Saos-2 y U20S alteran las vías de señalización provocando apoptosis (Yang *et al.*, 2007).

Otra de las cualidades como supresor de tumores es regular los receptores de factor de crecimiento, como el EGRF y el receptor de insulina, lo cual en las células altera las señales de supervivencia y provoca la muerte celular (Yang *et al.*, 2007).

5.8 WT1 como oncogén

Su expresión comenzó a estudiarse en tumor renal pediátrico (tumor de Wilms), sin embargo, el gen se encuentra inactivado en un 10% de los tumores de Wilms (Rodríguez *et al.*, 2005).

El gen se encuentra relacionado en la regulación de factores de crecimiento, como el factor A de crecimiento derivado de plaquetas, factor 2 de crecimiento *insulin-like* (IGF2), factor 1 de estimulación colónica, el factor de receptor de estimulación insulínica y de factores alfa de ácido retinoico. Para su actividad reguladora WT1 se ha visto ligado al p53, esto quiere decir que si el p53 está ausente el gen WT1 actúa como factor de transcripción (Rodríguez *et al.*, 2005).

Estudios han demostrado que en las leucemias linfoblástica aguda humana (ALL) el gen *WT1* se encuentra sobreexpresado lo cual actúa como oncogén y es considerado como un antígeno tumoral (Hernández *et al.*, 2004).

En tumores sólidos como cáncer de mama, ovario, útero, tiroides, carcinoma hepatocelular, pulmón y melanoma cuando son tratadas con oligonómeros antisentido WT1, se inhibe su crecimiento (papel de supresor tumoral). Lo cual nos indica que si existe un desbalance en las isoformas de WT1 este puede actuar como gen supresor de tumores o como oncogén (Oji *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2004).

En un estudio realizado se compararon mesoteliomas y adenocarcinomas para observar la expresión de WT1, lo que confirmaba que la expresión de WT1 se daba a nivel nuclear en mesoteliomas malignos, en contraste de los adenocarcinomas que no mostraban tinción nuclear (Mathew *et al.*, 2001).

5.9 WT1 en humanos

WT1 se encuentra sobreexpresado en neoplasias hematológicas como las leucemias y tumores sólidos como cáncer de mama, de próstata, de colon, de ovario, de pulmón, mesotelioma y melanoma en humanos. (Loeb *et al.*,2001, Koesters *et al.*,2004, Perry *et al.*,2006).

El gen *WT1* de tipo salvaje (no mutado) desempeña un papel importante en el cáncer de pulmón de *novo*. En el estudio de Oji y col. (2002), se detectó WT1 mediante RT-PCR en 96% de las muestras examinadas de cáncer de pulmón *novo* y en comparación por inmunohistoquímica se llegó a un 83% de sobreexpresión de WT1.

Se registró la expresión de WT1 en los tejidos de tumores primarios en estómago, próstata, sistema biliar, urinario y melanoma en humanos. Hace referencia la comparación del uso de anticuerpos monoclonales vs policlonales (Nakatsuka *et al.*, 2006).

El WT1 tiene dos sitios donde se adjuntan el exón 5 con 17AA y el sitio KTS (exón 9 y 10), formando 4 variantes - 17AA / KTS -, + 17AA / - KTS, - 17AA / + KTS , y +17AA / + KTS, teniendo distintas funciones en varios tipos de cáncer. La forma +17AA/KTS- induce la apoptosis en las células del osteosarcoma mediante la represión transcripcional de EGRF. La forma +/+ en células mamarias causan cambios morfológicos de ser células epiteliales, las convierten a mesenquimales. El -/- en cáncer de ovario en forma *in vitro* produce migración celular (Keiko *et al.*,2014).

En otro estudio similar hicieron la comparativa de las variantes que se adjuntan en el WT1 mediante PCR en tiempo real obteniendo que las variantes +17AA son de suma importancia

para la transformación maligna en leucemia mieloide aguda (AML) (Kramarzona *et al.*,2012).

En la actualidad, es también estudiado como blanco terapéutico como el desarrollo de vacunas para la leucemia. WT1 es de especial interés para la inmunoterapia en las recaídas de las AML después del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-HSCT). WT1 se es utilizado de forma segura y factible en pacientes con MDS/ AML avanzado y los pacientes que expresan células T específica para WT1 muestran mejor supervivencia libre para la progresion después de TCMH (Dagvadorj *et al.*, 2017).

5.10 WT1 en caninos

Los reportes de WT1 en caninos son escasos. Pearson y col. (1997) demostraron que puede ser un marcador específico el anticuerpo WT1 para nefroblastoma en perros. Puede funcionar para determinar si existe un solo tipo neoplásico o un grupo heterogéneo.

Se reportó un caso de tumor estromal de cordones sexuales, el cual fue positivo para WT1 para la porción del luteoma mientras que las células de Sertoli no presentaron inmunoreactividad, por lo cual en el trabajo se llegó a la conclusión que la ausencia de WT1 hace la diferencia de fenotipo (Ichimura *et al.*,2009).

Un estudio demostró a base de 11 casos de nefroblastoma de medula espinal en caninos la tinción con WT1 puede ayudar al diagnóstico (Brewer *et al.*, 2011)

Sakai y col. (2017) demostraron mediante la inmunohistoquímica que la expresión de cWT1 se detectó tanto en tejido normal como en el linfoma, lo cual indica que existen posibilidades de tolerancia a la inmunoterapia de antígeno tumoral asociado (TAA).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Muestras

La recolección de muestras de tumores se realizó en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Fueron recolectadas 50 muestras las cuales se identificaron con nombre del paciente, edad, sexo, raza y sitio de obtención del tejido.

Las muestras fueron divididas en dos secciones, una fue colocada en un frasco con PBS al 4% para la realización del diagnóstico histopatológico mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E), la otra sección fue almacenada a -20°C para la realización de las pruebas moleculares.

6.2 Diagnóstico histopatológico por tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)

Las muestras de tumores fueron fijadas con formalina bufferada al 4%, 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°C durante 2 horas. Se realizaron los cortes seriados de 4 mm 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 teñió con la técnica convencional de H&E. La deshidratación se realizó con etanol a concentraciones de 80%, 96%, 100% y xilol durante 10 minutos cada uno. Se montaron con resina sintética-Entellan. Posteriormente las muestras ya montadas y teñidas se analizaron al microscopio óptico para realizar la clasificación histopatológica de las neoplasias.

6.3 Extracción de ARN con Trizol

El tejido fue pesado a 100 mg, el cual se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se agregó 1 ml de Trizol hasta que se uniformizó la mezcla y fue incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, después pasó a un tubo para microcentrífuga de 2 ml y posteriormente fueron adicionados 200µl de cloroformo y pasaron al vórtex (agitación vigorosa) por 15 segundos, la muestra fue incubada por 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugada a 12000 g por 5 minutos a 4°C. Después de centrifugar la muestra, ésta fue separada en 3 fases: una acuosa o superior la cual contiene el ARN, una interfase o fase media que contiene las proteínas y una fase inferior roja que corresponde a la fase orgánica que contiene el ADN. La fase acuosa o superior fue colocada en un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de Isopropanol, posteriormente fue mezclada por inversión 10 veces, pasó a centrifugarse por 10 minutos a 4°C a 12000 g, decantamos el Isopropanol y fue agregado 1ml de etanol al 80%, posteriormente vórtex por 3 segundos y centrifugado a 12000g por 5 minutos, a 4°C. Después procedimos a decantar el etanol y dejamos secar por 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN resuspendido con 20µl de H₂O DEPC y fue incubado a 55°C por 10 minutos para posteriormente leer su concentración a 260 nm. El ARN fue almacenado a -70°C.

6.4 Síntesis del ADN complementario (ADNc):

En un microtubo de 1.5 µl fue adicionado un volumen correspondiente a 5µl de ARN, 1µl de oligo desoxitimidina (oligo dT 0.5mg/µl) y 1µl de una mezcla de dNTPs 10mM y fue llevado a un volumen de 12µl con agua DEPC; calentado a 65°C por 5 minutos, después se agregaron 4µl de Buffer First Strand 5x, 2 µl de Dithiothreitol (DTT) 0.1M y 1 µl de Inhibidor de ribonucleasa, se mezcló y las muestras fueron incubadas a 42°C por 2 minutos; posteriormente fue adicionado 1 µl de Superscript RT (1U/µl) a cada muestra y mezclamos por pipeteo, incubamos a 42°C por 50 minutos y se inactivo la reacción calentándola a 70°C por 15 minutos (Sambrook et al ,1989).

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

Para amplificar el fragmento de ADNc de β -actina de canino fueron utilizados los primers Fw5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA3' y Rw5'CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC3'. El control positivo utilizado para éstos primers fue ADN obtenido a partir de sangre de canino. La amplificación fue realizada comenzando con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 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 (Biorad). Los primers de β -actina amplificaron un fragmento (359 pb).

Para el análisis de la expresión de WT1, el ADNc (1 μ l) obtenido se amplificó utilizando una solución que contenía 2.5 U (0.5 μ l) de Taq ADN polimerasa, 5 μ l de Buffer de reacción 5x MyTaq (BIOLINE™) con 2.5 mM dNTP's y 7.5 mM de MgCl₂, 25 ng (0.5 μ l) del primer: Fw5'GAGAAACCATAACCAGTGTG'3, 25 ng (0.5 μ l) del primer Rw5'GTTTTACCTGTATGAGTCCT'3. La solución se aforó con agua DEPC hasta un volumen de 25 μ l. El control positivo fue obtenido a partir de riñón canino. La amplificación fue realizada comenzando con una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 56.3 °C durante 1 minuto y extensión de 72 °C durante 3 minutos, finalizando con una extensión final de 72 °C durante 10 minutos utilizando un termociclador PCR CAP 96X 0.2ml (Biorad). Los primers de WT1 amplificaron un fragmento (176 pb).

6.6. Densitometría y Correlación entre la expresión de WT1 y el tipo histopatológico

Los productos de amplificación se mezclaron con 1 μ l de Gelred (GenScript), y los genes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 90V 1:30 horas. Los geles fueron fotodocumentados. Las fotografías obtenidas fueron utilizadas para el análisis de expresión de la densitometría mediante un software ImageJ 1.52^a (Wayne Rasband) el cual asigna valores cuantitativos de acuerdo a la intensidad por pixel de cada una.

Para la correlación se utilizó el programa Excel 2016, para la obtención de promedios.

7. RESULTADOS

7.1 Diagnóstico histopatológico por tinción Hematoxilina y Eosina (H&E)

Los resultados están basados en el total de 50 muestras que se analizaron por presentar de manera macroscópica lesiones de apariencia tumoral, las cuales se estudiaron por histopatología. El 82% de las 50 muestras (41) correspondió a procesos neoplásicos, y el 18% restante (9 muestras) correspondieron a procesos pre-neoplásicos con el 12% (6 muestras) y procesos inflamatorios con el 6% (3 muestras) (Tabla 2).

Tipo de tumores	No. de casos	Porcentaje del total de tumores analizados
Tumores benignos		
Tumor mixto de glándula mamaria	6	12
Mixoma	8	16
Adenoma mamario	4	8
Lipoma	1	2
Miofibroma	2	4
Hemangioma	3	6
Fibroadenoma	2	4
TVT	1	2
Tumores malignos		
Carcinoma epidermoide inverso	5	8
Carcinoma anaplásico	5	12
Linfoma mixto	2	2
Linfoma	2	6
Procesos pre-neoplásicos		
Comedón actínico	4	8
Displasia de folículo piloso	2	4
Procesos inflamatorios		
Calcinosis cutis	2	4
Granuloma xantomatoso	1	2
Total de casos	50	100

Tabla 2. Resultados de la histopatología

Las neoplasias (82% de 50 muestras) se clasificaron por su comportamiento *benigno o maligno*, basado en los criterios de Briones (2002) se seleccionaron las 50 muestras en las cuales las neoplasias benignas se desarrollaron con mayor frecuencia con un total de 27 (54%), seguido por las neoplasias malignas con el 28%. El 18% restante representa las muestras no neoplásicas, las cuales no se incluyeron en esta clasificación.

Las hembras obtuvieron una mayor frecuencia de presentación de tumores en comparación de los machos con 31 casos (62% del total de 50 muestras) y 19 casos (38%) respectivamente. Las razas y la frecuencia de los perros domésticos a los que pertenecieron las 50 muestras de tumores se observan en la tabla 3, en la cual, de manera descriptiva, el mestizo obtuvo mayor frecuencia, siguiendo Poodle y chihuahueño.

RAZA	NO. DE CASOS	PORCENTAJE DEL TOTAL DE TUMORES ANALIZADOS
MESTIZO	11	22
POODLE	10	20
CHIHUAHUEÑO	5	10
LABRADOR	4	8
BOXER	3	6
PITBULL	3	6
SPRINGEL SPANIEL	3	6
BASETHOUND	2	4
BEAGLE	2	4
PASTOR ALEMAN	1	2
DOGO DE BURDEOS	1	2
BULLDOG FRANCES	1	2
GOLDEN RETRIEVER	1	2
PUG	1	2
BULLTERRIER	1	2
COCKER SPANIEL	1	2
TOTAL	50	100

Tabla 3. Frecuencia de presentación de acuerdo a la raza.

El rango de edad de los pacientes abarcó desde los menores de 5 años a los 20 años. Las diferentes edades de los 50 casos se agruparon de la siguiente manera: < 5- 5 años, con 8% del total; 6 a 10 años, con 28% del total; 11 a 15 años, con 58% del total; y 16 a 20 años, con el 6% del total.

Las imágenes de los procesos tumorales más frecuentes se observan de la figura 2 a la 12.

Procesos tumorales benignos

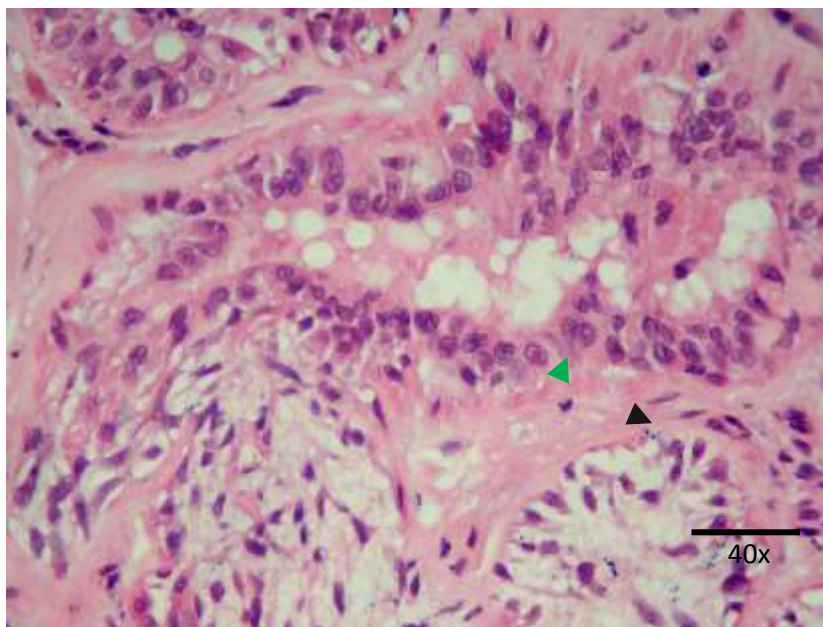


Figura 2. Tumor mixto de glándula mamaria. Canino, hembra, glándula mamaria. H&E. 40x. Neoplasia benigna, se encuentra delimitado. En la parte externa se encuentra rodeada por tejido conectivo, mientras que en la parte interna tiene un epitelio ductal dilatado fibroso en forma de hoz, se aprecia también un tejido adiposo con focos de necrosis. Tejido condroide (flecha negra) rodeado por tejido glandular (flecha verde).

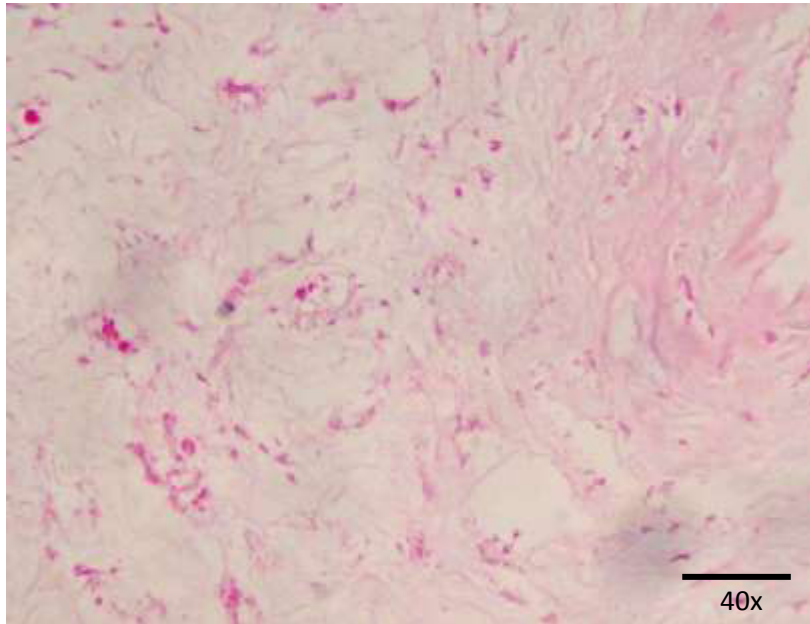


Figura 3. Mixoma. Canino, hembra, región de la cabeza. H&E. Neoplasia benigna derivada de tejido conjuntivo, tiene una matriz blanda mucoidal. Se observan células poliédricas y estrelladas.

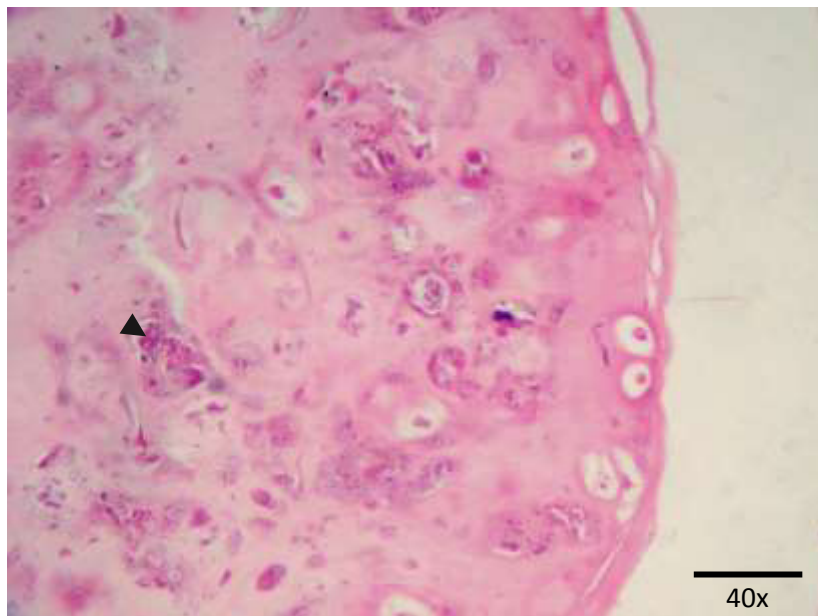


Figura 4. Tumor mixto de glándula mamaria, con calcificación. Canino, hembra, glándula mamaria. H&E. 40x. Neoplasia benigna, se aprecia zonas de calcificación (flecha negra), matriz osificante y tejido condroide.

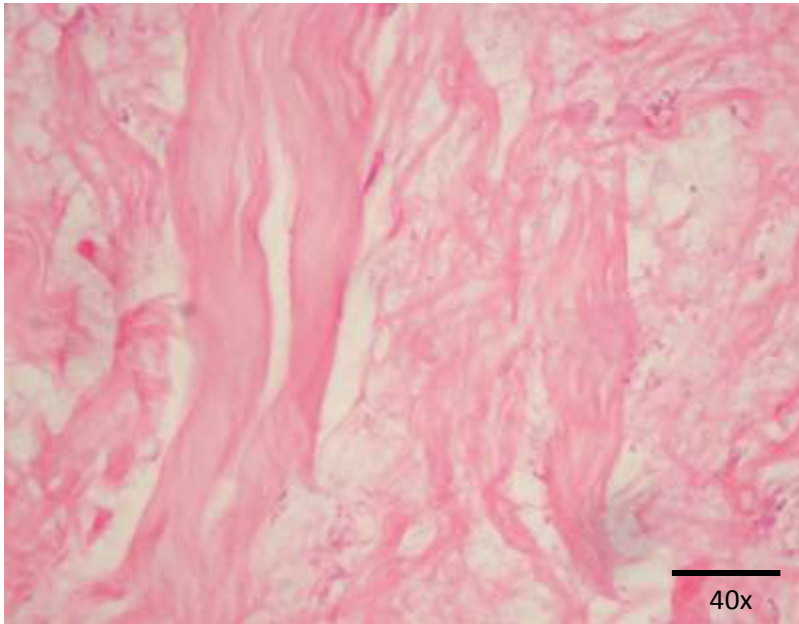


Figura 5. Miofibroma. Canino, macho, miembro posterior izquierdo. H&E. 40x. Es un tumor fibroso. Se presenta proliferación de células fusiformes con abundantes fibras colágenas y estructuras vasculares.

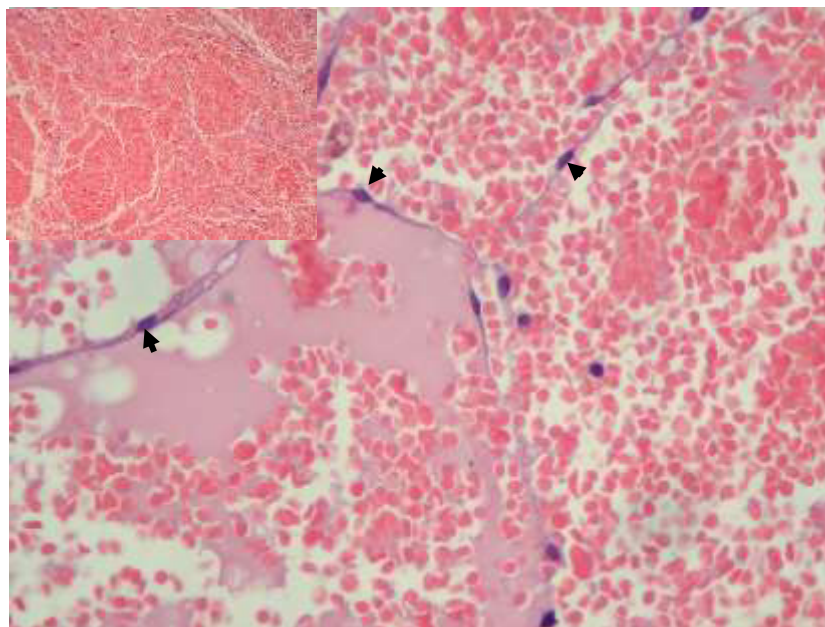


Figura 6. Hemangioma. Canino, hembra, órgano bazo. H&E. 40x. Presenta proliferación de tejido conectivo separado en lóbulos con formación de vasos sanguíneos (cabeza de flecha negra). En el recuadro superior izquierdo se aprecia la formación de vasos sanguíneos dando un patrón lobular dentro de la pulpa roja.

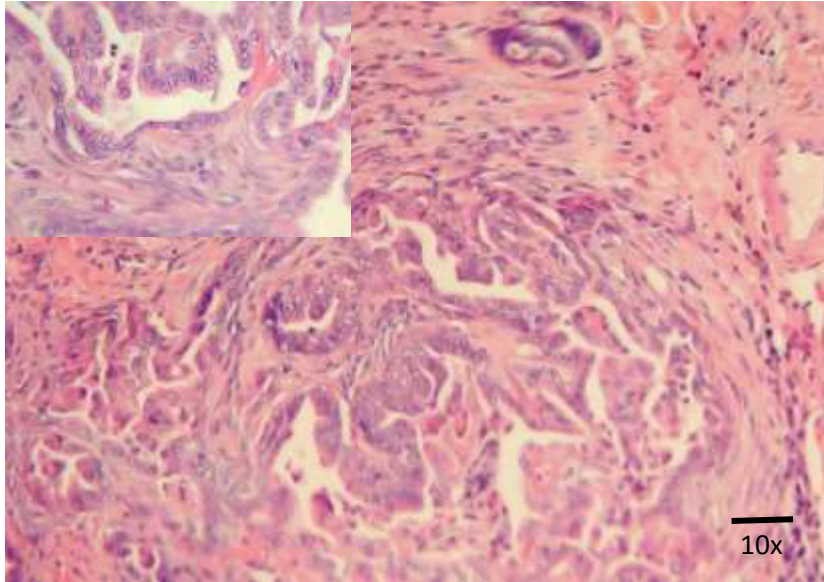


Figura 7. Fibroadenoma. Canino, Hembra, glándula mamaria. H&E.10x . Se observa tejido conectivo bien diferenciado con restos de colesterol, conductos galactóforos hiperplásicos con contenido proteico. Presenta células inflamatorias infiltradas, macrófagos principalmente realizando eritrofagia.

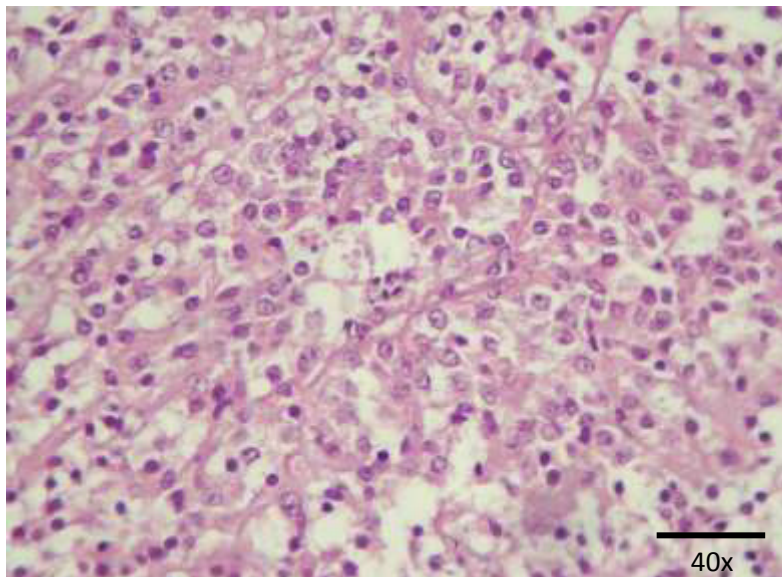


Figura 8. Tumor venéreo transmisible. Canino. Hembra, vulva. H&E. 40x. Se aprecia un tejido homogéneo de una masa compacta de células que crecen en hileras y es de origen mesenquimatoso. Presenta infiltrado de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y haces de colágeno.

Tumores malignos

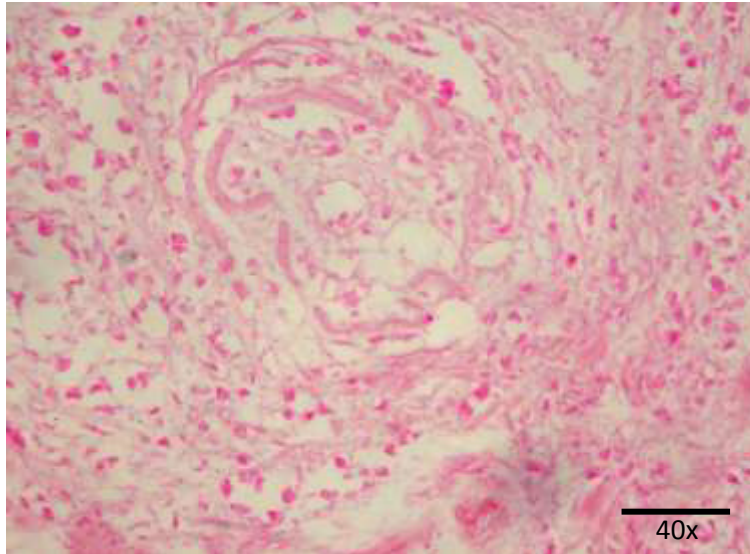


Figura 9. Carcinoma anaplásico. Canino, hembra, glándula mamaria. H&E. Tejido no encapsulado con estructuras remolinadas sin patrón definido con áreas de necrosis.

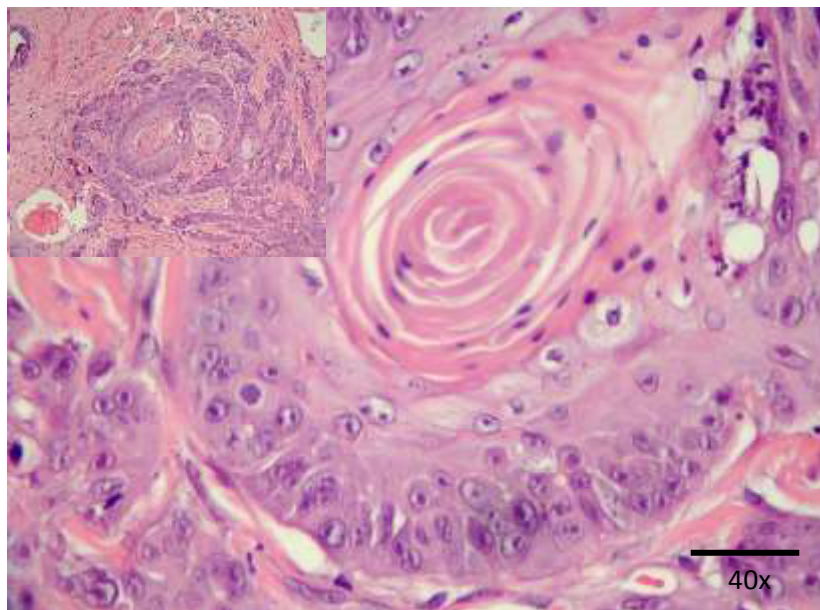


Figura 10. Carcinoma epidermoide inverso. Canino, hembra, glándula mamaria. H&E. Se aprecia el epitelio plano estratificado dañado indicando que se encuentra ulcerado, presenta edema intersticial y degeneración balanoide con áreas de necrosis. Mitosis atípicas, proliferación de tejido conectivo con proliferación de neutrófilos. El tejido epiteloide se

encuentra dentro de la dermis. Presenta nucléolos prominentes, cromatina de cara cerrada. En el recuadro superior se aprecia la escala de 10x.

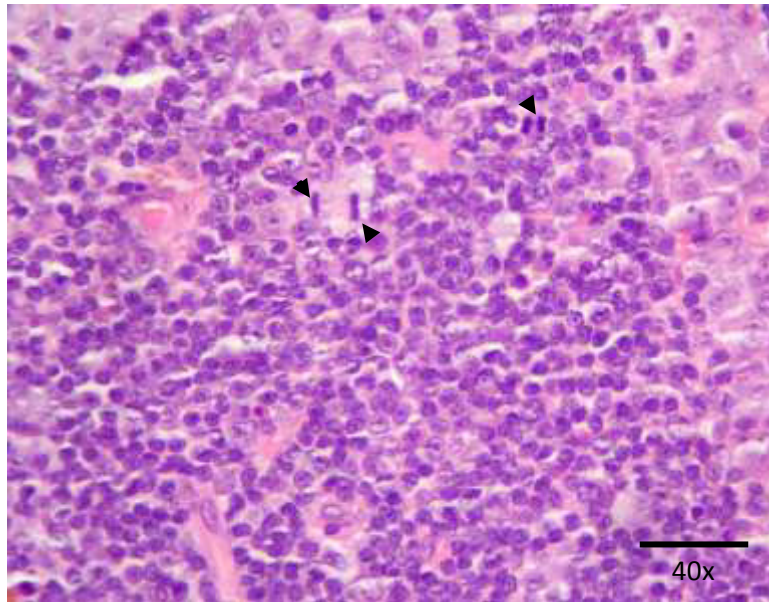


Figura 11. Linfoma mixto. Canino, macho, bazo. H&E. 40x. Se aprecia una masa no encapsulada con proliferación de tejido linfoide, con células de tipo redondo que se encuentran delimitadas de tejido conectivo, sin embargo, en otras localizaciones se encuentran extendidas. Presenta células grandes uniformes tanto en citoplasma como en núcleo, así como células pequeñas con núcleos prominentes con escaso citoplasma. Se observan células en mitosis (cabeza de flecha negra).

7.2 RT-PCR para β -actina y expresión total de WT1

Se analizó la integridad de los ADN complementarios de las muestras de tumores y de riñón canino y del ADN de las muestras de sangre mediante la amplificación el gen constitutivo de β -actina, observándose la banda esperada de 539 pb en todas las muestras. En el análisis de la expresión del gen WT1, se logró la amplificación de la banda esperada de 176 pb en la muestra de riñón, así como en algunas muestras de tumores de distintas regiones (figuras 17-21).

En la tabla 4 se puede observar el porcentaje de expresión de WT1 en tumores benignos y tumores malignos en cada región.

REGIÓN	PORCENTAJE DE PRESENTACION	
	TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
BAZO	0 %	100 %
GLÁNDULA MAMARIA	66.66 %	33.33 %
CABEZA	28.57 %	28.57 %
REGIÓN POSTERIOR	50 %	14.28 %
CUELLO	80 %	0 %

Tabla 4. Porcentaje de expresión de WT1 en tumores benignos y malignos por región.

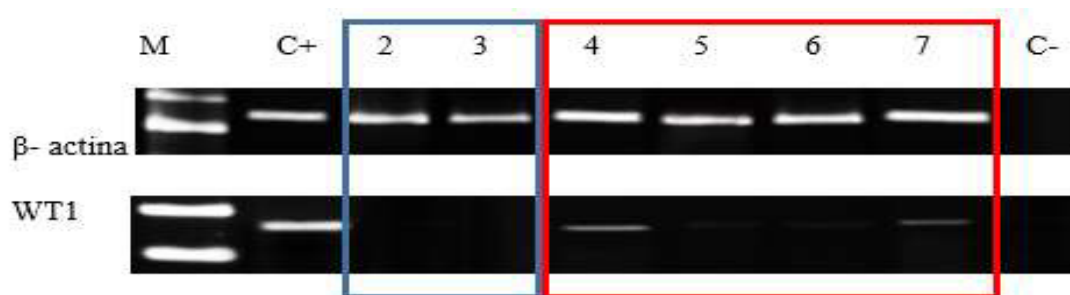


Figura 12. Expresión de β - actina y WT1 en tumores de la región del bazo. Observando expresión de WT1 en tumores malignos. Mostrándose en el carril 2-3 tumor benigno (azul) y del 4-7 tumores malignos (rojo).

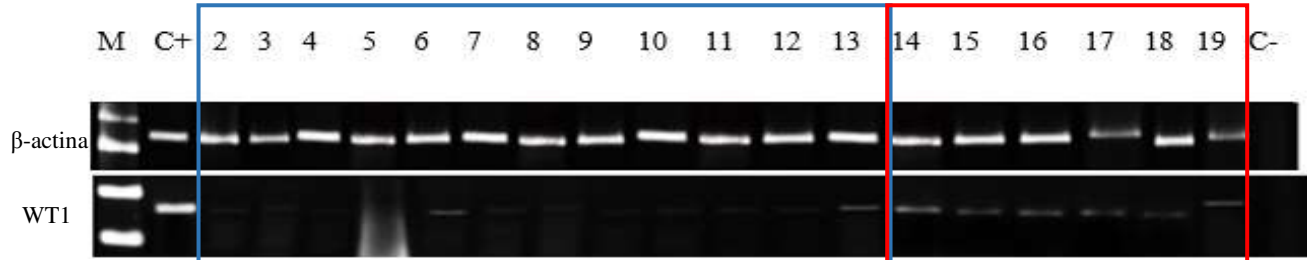


Figura 13. Expresión de β - actina y WT1 en tumores de la región de la glándula mamaria. Observando expresión en la mayoría de los tumores tanto benignos como malignos. Tumores benignos (azul), tumores malignos (rojo).

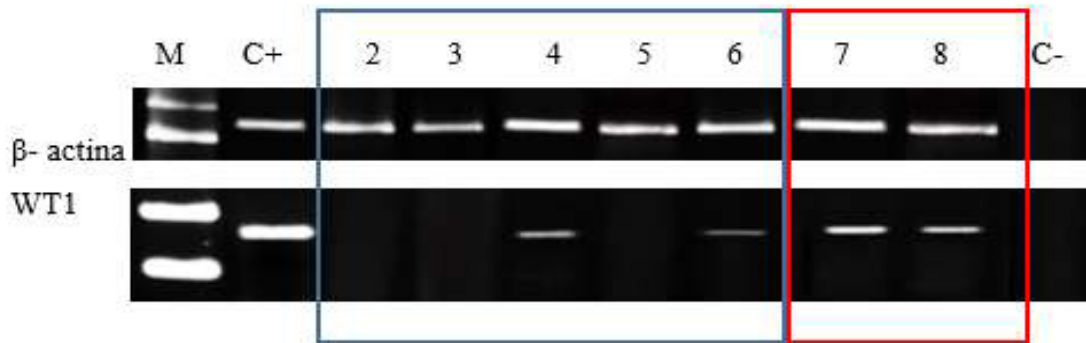


Figura 14. Expresión de β - actina y WT1 en tumores de la región de la cabeza. Observando expresión de WT1 tumores benignos (azul) y expresión de WT1 en los dos tumores maligno (rojo).

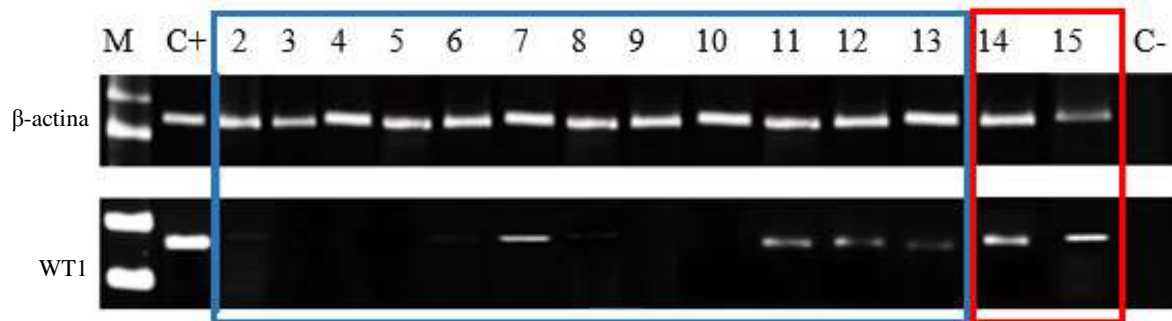


Figura 15. Expresión de β - actina y WT1 en región posterior (vulva, prepucio, miembros posteriores, región inguinal). Observando expresión de WT1 tumores benignos (azul) y expresión de WT1 en los dos tumores malignos (rojo).

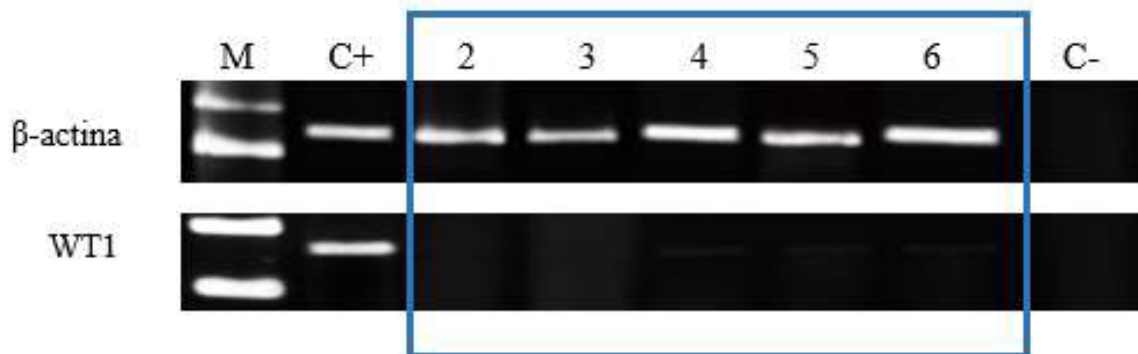


Figura 16. Expresión de β - actina y WT1 en tumores de la región del cuello. Observando expresión de WT1 en tumores benignos (azul),

7.3 Análisis de densitometría

El análisis cuantitativo de la expresión de genes amplificados por el software ImageJ 1.52^a (Wayne Rasband), donde se muestran los valores de densidad por regiones por pixel de expresión de genes y poblaciones.

La expresión del gen WT1 en la región del bazo se observó solo en tumores malignos como son los linfomas donde la densidad del área corresponde entre los 1630.062 a los 5670.598 como se muestra en la tabla 5.

TIPO DE TUMOR	B-ACTINA	WT1
	ÁREA	ÁREA
C+	13743.79	23118.832
HEMANGIOMA	18639.69	0
HEMANGIOMA	12253.154	0
LINFOMA	19719.912	5670.598
LINFOMA	18196.347	1811.598
LINFOMA	18828.225	1630.062
LINFOMA	23535.447	4078.376
MIXTO		

Tabla 5. Densidad de expresión de los genes estudiados en región de Bazo. Se separaron los resultados de acuerdo al tipo de tumor presentándose primero los tumores benignos (hemangiomas), seguido de los tumores malignos (linfomas).

En la región de glándula mamaria la expresión de este gen se puede apreciar tanto en tumores benignos como los malignos, sin embargo, se puede observar que la densidad de área es distinta en tumores malignos, siendo esta mayor en comparación de los benignos (Tabla 6).

TIPO DE TUMOR	B- ACTINA	WT1
	ÁREA	ÁREA
C+	11303.82	18327.891
FIBROADENOMA	15316.062	1411.891
FIBROADENOMA	10117.234	1908.012
TMGM	16313.648	1174.477
TMGM	15256.891	0
TMGM	15557.062	4470.548
TMGM	16921.598	3461.477
TMGM	15665.891	1909.012
TMGM	16152.012	3074.477
ADENOMA	18616.184	4144.598
ADENOMA	17405.255	2671.355
ADENOMA	17737.255	1731.113
ADENOMA	18438.012	4141.426
CARCINOMA ANAPLÁSICO	17127.841	7685.841
CARCINOMA A.	17614.841	7519.255
CARCINOMAA A.	17711.134	5771.134

CARCINOMA A.	10887.548	3364.719
CARCINOMA A.	17715.134	5761.132
CARCINOMA EPIDERMIOIDE	17711.134	4892.426

Tabla 6. Densidad de expresión de los genes estudiados en región de Glándula mamaria.

Se observa que existen casos de expresión de WT1 en tumores benignos como malignos.

En la tabla 7 se puede apreciar que los procesos pre-neoplásicos (comedón actínico) de esta zona no presentan expresión de WT1, los tumores benignos y malignos presentan expresión de dicho gen.

TIPO DE TUMOR	B-ACTINA ÁREA	WT1 ÁREA
C+	11561.548	19594.397
COMEDON ACTINICO	16009.326	0
LIPOMA	10376.376	0
MIXOMA	16839.497	3968.305
MIXOMA	15320.861	0
MIXOMA	16072.447	2844.184
CARCINOMA EPIDERMOIDE	20098.397	6898.548
CARCINOMA E.	17579.811	5044.841

Tabla 7. Densidad de expresión de los genes estudiados en región de cabeza. Se observa que existen casos de expresión de WT1 en tumores benignos como malignos, sin embargo, los niveles cuantitativos de la banda no son los mismos, teniendo mayor expresión en los tumores malignos.

En la región posterior donde se ven incluidos tumores de vulva, escroto, región inguinal, miembros posteriores, se observa la densidad de expresión de WT1 en procesos inflamatorios como es el granuloma xantomatoso y en procesos pre-neoplásicos como el comedón actínico, así de igual manera en tumores benignos como el mixoma, miofibroma y en tumores malignos como es el carcinoma epidermoide. Observándose una mayor expresión de la densidad de WT1 en tumores malignos (Tabla 8).

TIPO DE TUMOR	B-ACTINA	WT1
	ÁREA	ÁREA
C+	12076.941	17102.184
GRANULOMA XANTOMATOSO	16150.184	1680.134
GRANULOMA X.	10793.355	0
CALCINOSIS CUTIS	17385.77	0
CALCINOSIS CUTIS	15713.598	0
COMEDON ACTINICO	16643.012	2795.376
COMEDON ACTINICO	18216.426	4051.77
MIXOMA	16403.426	578.042
MIXOMA	17334.134	0
MIXOMA	19728.548	0
TVT	17796.255	6100.205
MIOFIBROMA	18772.548	5248.305
MIOFIBROMA	19836.841	3416.497
CARCINOMA E.	17948.669	9861.497
CARCINOMA E.	18929.376	7402.134

Tabla 8. Densidad de expresión de los genes estudiados en región posterior. Se observa que existen casos de expresión de WT1 en tumores benignos como malignos, sin embargo, los niveles cuantitativos de la banda no son los mismos, teniendo mayor expresión en los tumores malignos.

En la región del cuello solo se muestran dos tipos de procesos pre-neoplásicos donde la displasia del folículo piloso en esta región expresó en pequeñas cantidades el gen WT1 en comparación de los tumores benignos de esta zona (Tabla 9).

TIPO DE TUMOR	B- ACTINA	WT1
	ÁREA	ÁREA
C+	15673.033	23274.882
COMEDON ACTINICO	22020.004	0
DISPLASIA DE FOLICULO PILOSO	14037.64	282.74
MIXOMA	22911.569	2018.305
MIXOMA	20996.125	1731.113
HEMANGIOMA	21837.539	1706.841

Tabla 9. Densidad de expresión de los genes estudiados en región del cuello. Se observa que existen casos de expresión de WT1 en tumores benignos.

7.4 Correlación entre la expresión de WT1 y el tipo histopatológico

Con los datos obtenidos con el análisis de intensidad, se realizó una tabla en donde se muestran los promedios de las expresiones relativas con respecto al gen constitutivo β -actina. Estos resultados muestran que, en promedio, los valores de expresión relativa más altos se muestran en tumores malignos en regiones como el bazo, glándula mamaria y región de la cabeza, como se muestra en la tabla 9.

	PROMEDIO DE EXPRESIÓN	
	TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
REGION DEL BAZO		
B-ACTINA	20681.88233	60667.0585
WT1	0	9791.987333
REGION GLANDULA MAMARIA		
B-ACTINA	176083.426	82163.44388
WT1	26187.03922	30407.85763
REGION DE LA CABEZA		
B-ACTINA	45215.47517	23028.3655
WT1	4442.335667	7739.354833
REGION POSTERIOR		
B-ACTINA	92514.51613	20314.841
WT1	12353.61413	10786.76375
REGION DEL CUELLO		
B-ACTINA	51186.87367	0
WT1	4318.365	0

Tabla 10. Promedio de expresión de WT1 en tumores benignos y malignos.

8. DISCUSIÓN

Debido a que el cáncer afecta a distintos tipos de animales y con el tiempo ha ido en aumento en la especie canina, al igual que los humanos, lo cual es inevitable mejorar las estrategias diagnósticas (Dobson, 2013). En EUA 6 millones de perros son diagnosticados con cáncer (Printz, 2011).

En este estudio, las hembras presentaron mayor desarrollo de neoplasias que los machos, al igual que los estudios realizados por Ventura y colaboradores (2012), Merlo y colaboradores (2008) y Fajardo y colaboradores (2013), en donde las hembras tienen mayor frecuencia de presentación de procesos neoplásicos. El sexo es un factor que influye en el desarrollo de ciertas neoplasias, ya que existen estudio que demuestran que un desbalance hormonal provoca estimulación excesiva en algunos órganos con células hormonodependientes.

Los pacientes que mostraron mayor frecuencia en el desarrollo de tumores estadísticamente fueron los del grupo de 11 a 15 años de edad, a diferencia de los estudios realizados por Ramos y Ramos (2014), Boerkamp y colaboradores (2014) y Fajardo y colaboradores (2013) donde sus estudio muestran que la mayor frecuencia de presentación de tumores es en el grupo de 8 a 11 años de edad, sin embargo, este estudio con relación a los de Ramos y Ramos, Boerkamp y colaboradores y Fajardo y colaboradores se demuestra que en el periodo de edad de 0 a 5 tres años existe un menor desarrollo de lesiones tumorales. Dicho desarrollo incrementa conforme aumenta la edad, alcanzando un pico mayor a la edad de 12 y 13 años.

En este estudio, los tumores malignos fueron el 28%, y los benignos el 54%, de las 50 muestras recibidas; es decir que fueron más las neoplasias benignas que las malignas. Siendo similar al estudio realizado por Ramos y Ramos (2014), en el cual el 39,1% correspondió a neoplasias benignas, y el 21,7%, a malignas, donde se muestra que la presentación de tumores benignos es mayor en comparación de los tumores malignos.

El gen WT1 ha sido blanco de distintos estudios, debido a su función transcripcional regulatoria de genes esenciales para favorecer cáncer y su capacidad también como gen supresor de tumores y oncogén. Esto se llegó a que diversos estudios determinaron que WT1 se encontraba sobreexpresado en diversos tipos de tumores sólidos y leucemias (Yang *et al.*, 2007).

En humanos, se ha encontrado expresión de WT1 en melanoma, lo que sugiere que podría funcionar como marcador diagnóstico. En líneas celulares de melanoma murino (B16F10) se ha observado alta expresión de WT1 y su silenciamiento con ARN de interferencia induce muerte celular, lo cual indica que la expresión de este gen es importante para la proliferación celular (Zamora-Ávila *et al.*,2009).

Tamaki y colaboradores (1999) demostraron que en síndromes mielodisplásicos (MDS) en humanos los niveles de expresión de WT1 son un marcador tumoral. Por lo tanto, el monitoreo de los niveles de expresión de WT1 ha hecho posible la evaluación continua de dicha enfermedad. Así como también mencionan que es útil para el diagnóstico de enfermedad residual mínima de MDS con alta sensibilidad, lo que permite evaluar la eficacia del tratamiento.

En los resultados obtenidos en el presente estudio se encontró expresión de WT1 en riñón por RT-PCR el cual fue incluido como control positivo de expresión, ya que este gen se expresa durante el desarrollo embrionario para dar lugar al sistema genitourinario, concordando con lo reportado para humanos (Mrowka y Schedl, 2000).

Al analizar las muestras de tumores tanto benignos como malignos fueron positivas en su totalidad las muestras malignas al RT-PCR. En la región del bazo fueron positivas las muestras de linfoma, similar a lo obtenido a Sakai y colaboradores (2017) donde ellos obtuvieron reactividad al cWT1 en todas las muestras de tejido de linfoma canino.

En glándula mamaria la proteína de WT1 se ha visto expresada tanto en tejido normal como tumoral (Silberstein *et al.*,1997), en nuestros resultados se observa una expresión tanto en tumores benignos como en malignos, sin embargo, haciendo una comparativa con nuestros resultados, los niveles de expresión son distintos, teniendo mayor expresión de WT1 en tumores malignos como son los carcinomas anaplásicos.

En caninos se han evaluado distintos marcadores moleculares implicados en distintos tumores, de los más estudiados son los de glándula mamaria por su alta presentación. Los marcadores que destacan es el aumento en la expresión de receptor de estrógeno, estradiol, así como proteínas de proliferación celular, evasión de la apoptosis, angiogénesis e invasión (Vinothini *et al.*,2009).

9. CONCLUSIONES

- El perro mestizo presentó mayor frecuencia en el desarrollo de neoplasias, y las razas más frecuentes fueron poodle y chihuahueño. No obstante, la raza no es un factor de riesgo para el comportamiento del tumor, es decir, el desarrollo benigno o maligno de este.
- Las neoplasias que afectan con mayor frecuencia al perro doméstico en orden decreciente, son el Mixoma, seguido por Tumor Mixto de Glándula Mamaria y Carcinoma anaplásico.
- El sexo es un factor que influye en el desarrollo de neoplasias, ya que las hembras presentan mayor desarrollo tumoral, pero este no es un factor de riesgo en el comportamiento benigno o maligno de la neoplasia.
- Las muestras de tumores malignos tienen una mayor expresión en comparación de las muestras de tumores benignos en las regiones del bazo, glándula mamaria y cabeza.

10. LITERATURA CITADA

1. Alarcón B, Guarína N, Muñoz-Galindo I, Díaz J y Arévalo H. Prevalencia del cáncer en una aseguradora en salud en Colombia 2013. 2015. Instituto Nacional de Cancerología. Publicado por Elsevier España <http://dx.doi.org/10.1016/j.rccan.2015.07.001>
2. Aparicio, C., Forero, J. (2003). Estudio retrospectivo de masas cutáneas neoplásicas en caninos diagnosticadas histopatológicamente en la Universidad de La Salle.
3. Balzano L y Diez N. Mecanismos asociados a la agresividad tumoral y su empleo para diagnosticar este fenómeno. Revista de Estudios Transdisciplinarios Fundación Instituto de Estudios Avanzados Vol. 2. N° 1. Caracas, enero-abril 2010 pp.n 77-86
4. Boerkamp K, Teske E, Bono L, Grinwins G, Van den Bossche L, Rutteman G. Estimated incidence and distribution of tumors in 4,653 cases of archival submissions derived from the dutch Golden Retriever population. BMC Vet Res [internet]. 2014 [citado 2014 sep 27];10(34). Disponible en: doi: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/34>
5. Briones F. Escárte P. Neoplasias en pequeños animales [internet]. 2002 [citado 2013 dic 4]. Disponible en: <http://www.homeovet.cl/Libros/Neoplasias%20en%20Pequenos%20animales.pdf>
6. Brewer DM1, Cerda-Gonzalez S, Dewey CW, Diep AN, Van Horne K, McDonough SP. Spinal cord nephroblastoma in dogs: 11 cases (1985-2007). J Am Vet Med Assoc. 2011 Mar 1;238(5):618-24. doi: 10.2460/javma.238.5.618.
7. Brønden L. B., Flagstad A. y Kristensen A. T. 2007. Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. Veterinary and Comparative Oncology, 5, 3, 133–144
8. Dagvadorj, N., Deuretzbacher, A., Weisenberger, D. y otros. Cancer Immunol Immunother (2017) 66: 319. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1938-y>
9. De la Cruz Hernández NI, Monreal García AE, Carvajal de la Fuente V, Barrón Vargas CA, Martínez Burnes J, Zarate Terán A, Carmona Aguirre D, García Luna F, Merino Charres O, Rangel Lucio JA. Frecuencia y caracterización de las principales neoplasias presentes en el perro doméstico en Tamaulipas (México). Rev Med Vet. 2017;(35):53-71. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4389>.

10. Dobson, J. M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci*, 2013, 941275. doi: 10.1155/2013/941275
11. Elgue V., Piaggio J., Amaral C., Pessina P. Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 25-30 (2012).
12. Elmore S. 2007, Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 35:495-516
13. Eslava, P., Torres, G. (2008). Neoplasias testiculares en caninos: un caso de tumor de células de Sertoli. *Revista MVZ Córdoba*, 13(1), 1215-1225.
14. Fajardo R., Alpizar A, Perez L. Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, Mexico from 2002 to 2008. 2013. 305- 308.
15. Fernández Nicolás, Figueroa Víctor y Pérez Jaime. 2009. Gen WT-1. Expresión en la nefrogénesis. *Urol.colomb.* Vol. XVIII, No. 3: pp 113-120.
16. Ferreira de la Cuesta G. (2003). *Patología Veterinaria* primera edición, editorial Universidad de Antioquia. Anexo. pp: 573-585.
17. Flores, E. (1996). *Oncología veterinaria en Chile*. Tecnovet, 2(1)
18. González-Chávez MT, Peraza- González B, Rodríguez YF, Rodríguez-Aurrecochea JC, Calaña-Seoane L, Márquez-Álvarez M, Zamora-Montalvo Y, Rubio-García JL, Martín-Romero JA, Camacho-Socarrás C. Frecuencia de presentación de neoplasias en caninos del municipio San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba. *Rev. Salud Anim.* Vol. 37 No. 1 (ene.-abr.) 2015: 39-46. ISSN: 2224-4700
19. Hermo G.,García M., Torres P., Gobello C. 2005. Tumores de mama en perra. *Ciencia veterinaria*. 7:5-29
20. Hernández C, Gallón G, Restrepo LF. Análisis de biopsias gástricas endoscópicas en caninos. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20:250-259.
21. Hernández-García F, Robaina- Castillo J, Pérez- Calleja N, Gonzalez- Diaz E, Gonzalez-Sanchez M y Angulo-Peraza M. Curso electivo para la realización de audiencias sanitarias sobre cáncer por estudiantes de medicina. *Educ Med*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.edumed.2018.06.005>

22. Hernández Herrera A, Aguirre Cavazos A, Fuentes Vélez H, Rodríguez Padilla C, Trejo Ávila L, Zapata Benavides P. *Wt1: Sexo, Vida Y Muerte. Ciencia UANL / Vol. VII, No. 3, Julio-Septiembre 2004.*
23. Ichimura R, Shibutani M, Mizukami, S, Suzuki T, Shimada Y, & Mitusmori K. A Case Report of an uncommon Sex-Cord Stromal Tumor Consisted of Lutel and Sertoli Cells in a Spayed Bitch. 2009. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(2), 229-234.
24. Keiko Yamanouchi, Tsuyoshi Ohta, Zhiyang Liu, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama, Viji Shridhar, Sohei Matsumura, Toshifumi Takahashi, Kazuhiro Takahashi, Hirohisa Kurachi, The Wilms' Tumor Gene WT1 -17AA/-KTS Splice Variant Increases Tumorigenic Activity Through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in an In Vivo Ovarian Cancer Model, *Translational Oncology*, Volume 7, Issue 5, 2014, Pages 580-589, ISSN 1936-5233, <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2014.07.008>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936523314000813>)
25. Koesters R, Linnebacher M. Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P and von Knebel Doeberitz M. 2004. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 109: 385–392.
26. Kramarzova K., Stuchly J., Willasch A., Schwarz J., Cermak J., MAchova-Polakova K., Fuchs O., Stary J., Trka J. y Boublikova L. Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* (2012) 26, 2086–2095. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.76>
27. Kun Yeong Lee, Hong-Gyum Kim, Joohyun Ryu, Do Young Lim, Hanyong Chen, Ann M. Bode, Zigang Dong. El WT1 traducido por CUG, no AUG-WT1, es un oncogén [resumen]. En: *Actas de la Asociación Americana para la Reunión Anual de Investigación del Cáncer 2018; 2018 abril 14-18; Chicago, IL. Filadelfia (PA): AACR; Cancer Res 2018; 78 (13 Suppl): Resumen nr 549.*
28. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D and Sukumar S. 2001. Wilms' tumor suppressor gene (WT1) is expressed in

- primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 61:921–925
29. Maldonado L, Santos N, Cura M. TEMA 16: Neoplasias: Bases moleculares. *Biología del crecimiento* (en línea) 2006. Disponible en: http://eusalud.uninet.edu/apuntes/tema_16.pdf
 30. Mangieri, J. (1994). Neoplasias mamarias. En: *Oncología Veterinaria*. Tercera Edición. Prensa Veterinaria Argentina. Buenos Aires; p. 129-210
 31. Matthew R. Foster, Joyce E. Johnson, Sandy J. Olson y D. Craig Allred (2001) Análisis inmunohistoquímico de la tinción citoplásmica nuclear versus de WT1 en mesoteliomas malignos y adenocarcinomas pulmonares primarios. *Archivos de patología y medicina de laboratorio*: octubre de 2001, vol. 125, No. 10, pp. 1316-1320.
 32. Merlo DF, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Caparrós C, Rato A, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):976-84. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>
 33. Meza-Junco, Judith, Montañó-Loza, Aldo, & Aguayo-González, Alvaro. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70. Recuperado en 24 de agosto de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000100008&lng=es&tlng=es.)
 34. Misdorp W. (1996) Veterinary cancer epidemiology, *Veterinary Quarterly*, 18:1, 32-36, DOI: 10.1080/01652176.1996.9694610
 35. Monteiro B, Boston S, Monteith G. 2011. Factores que influyen en la extirpación completa de mastocitomas y sarcomas de tejido blando: un estudio retrospectivo en 100 perros. *Can Vet J* 2011. 52:1209-1214
 36. Monzón O, Mora E, Torres L, Gutiérrez L, Rubi C. Bases Moleculares Del Cáncer. *Repert.med.cir.*2011; 20 (4): 210-216.
 37. Mrowka, C., & Schedl, A. (2000). wilms' Tumor Suppressor Gene WT1: From Structure to Renal Pathophysiologic Features. *J Am Soc Nephrol*, 106-115.
 38. Mulherkar R. Gene therapy for cancer. *Current Science*. 2001;81(5):555-560.

39. 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.
40. Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, EH, Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T. y Sugiyama, H. (1999), Expresión del gen *WT1* del tumor de Wilms en tumores sólidos y su implicación en el crecimiento de células tumorales. *Revista japonesa de investigación del cáncer*, 90: 194-204. doi: [10.1111 / j.1349-7006.1999.tb00733.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00733.x)
41. Oji Y, Miyoshi S., Maeda H, Hayashi S., Tamaki H., Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E., Nakano Y., Hirabayashi H., Shintani Y, Oka Y., Tsuboi A., Hosen N., Asada M., Fujioka T., Murakami M., Kanato K., Motomura M., Kim EH, Kawakami M., Ikegame K., Ogawa H., Aozasa K., Kawase I., Sugiyama H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int.J.Cancer*:100,297–303(2002). DOI10.1002/ijc.10476
42. Ortiz-Ortiz D., Del Ángel J. y Quijano I. Estudio Retrospectivo De Neoplasias En Perros En El Año 2014. Editor Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia. 2015.
43. Pearson GR, Gregory SP, Charles AK. Immunohistochemical demonstration of wilms tumour gene product WT1 in a canine “Neuroepithelioma” providing evidence for its classification as an extrarenal nephroblastoma. *Journal of Comparative Pathology*. Volumen 116, Número 3, Abril de 1997 , páginas 321-327. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80006-0)
44. Perry BN, Cohen C, Govindarajan B, Colsonis G and Arbiser J. Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Arch Dermatol*. 2006; 142:1031–1034.
45. 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](https://doi.org/10.1002/cncr.26604)
46. Ramos R, Ramos P. Frecuencia de tumores de piel en el perro. Estudio retrospectivo. *Actualidades en Medicina Veterinaria y Zootecnia México*. 2014;3(11):10-9.

47. Rodríguez J.M, Panizo A. y Sola I. Valor diagnóstico de la proteína WT-1 como marcador inmunohistoquímico. *Rev. Esp. Patol.* 2005. Vol. 34. No2.
48. Sakai O., Sakurai M, Sakai H, Kubo M, Hiraoka H, Baba K, Okuda M and Mizuno T. Molecular cloning of canine Wilms' tumor 1 for immunohistochemical analysis in canine tissues *J. Vet. Med. Sci.* 79(7): 1272–1277, 2017. Doi: 10.1292/Jvms.17-0229.
49. Salas Y, Aburto E., Alonso R., Márquez A., Corona H., Romero L. Asociación histológica con factores potenciales de riesgo y tiempo de sobrevida en el tumor mamario canino DOI: <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.3.1.359> Vol. 3, No. 1, Enero-Marzo. 2016.
50. Selvarajah GT y Kirpensteijn. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma. *The Veterinary Journal* 185 (2010) 28–35
51. Shin-ichi, N., o. Yusuke, H. Tetsuya , K. Takayoshi, K. Michio, T. Tamotsu , K. Kiyoshi, k. Yuko, Y. Akira, O. Meinoshin , K. Yayoi, O. Yoshihiro, K. Ichiro, S. Haruo, and A. Katsuyuki 2006, Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells: *Modern Pathology*, p. 804-814.
52. Tafurt Y, Marin MA. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud.* 2014; 13(2): 95-110.
53. Torres, G., Eslava, P. (2007). Tumores mamarios en caninos: Adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia*, 11(1), 99-110.
54. Torres González-Chávez, Mitchell, Peraza González, Breydis, Fabré Rodríguez, Yolexis, Rodríguez Aurrecochea, Juan Carlos, Calaña Seoane, Lilibet, Márquez Álvarez, Mario, Zamora Montalvo, Yendry, Rubio García, Juan Luís, Martín Romero, Julio Alberto, & Camacho Socarrás, Claudia. (2015). Frecuencia de presentación de neoplasias en caninos del municipio San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba. *Revista de Salud Animal*, 37(1), 39-46. Recuperado en 23 de agosto de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2015000100006&lng=es&tlng=es.

55. Vascellari, M.; Baioni, E.; Ru, G.; Carminato, A y Mutinelli, F. (2009). Animal tumor registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumors in dogs and cats. *BMC Vet Res.* 5:39.
56. Veloza LC, Collazos M, Olaya N, Salas S, Corredor A, Diez H, Castellanos I, Gutierrez MF. Presencia del marcador LMP-1 del virus Epstein-Barr en linfomas de caninos. *Rev Med Vet Zoot.* 64(3), septiembre-diciembre 2017: 11-21. doi: 10.15446/rfmvz.v64n3.68691
57. Ventura R. Colodel M. Rocha N. Cytological examination in veterinary medicine: Retrospective study of 11, 468 cases (1994-2008). *Pesq Vet Bras.* 2012;32(11):1169-73. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100016>
58. Vinothini G., Balachandran C. y Nagini S. 2009. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: Correlation with histological grading. *Oncology Research.* 18:193-201
59. Withorow Stephen J., Vail Davis M. *Oncología de pequeños animales*, 2009. Edición 4. Multimedica Ediciones Veterinarias. pp 371-373.
60. 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).
61. Yang, L., Han, Y., Suarez-Saiz, F., & Minden, M. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21, 868-876.
62. Zamora-Avila, D. E., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M. A., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Avila, L. M., Resendez-Perez, D., y otros. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther*, 892-9.
63. Zamora-Ávila, D. E., M. A. Franco-Molina, L. M. Trejo-Avila, C. Rodriguez-Padilla, D. Resendez-Perez, and P. Zapata-Benavides, 2007, RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line: *Melanoma Res*, p. 341-348.