

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



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms) Y SU
ASOCIACIÓN CON PPAR- β/δ EN PIEL SANA Y MELANOMA DE
EQUINO**

PRESENTADA POR

MVZ. ITZEL YANINA RANGEL SÁNCHEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

MAYO, 2017

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



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms) Y SU
ASOCIACIÓN CON PPAR- β/δ EN PIEL SANA Y MELANOMA DE
EQUINO**

PRESENTADA POR

MVZ. ITZEL YANINA RANGEL SÁNCHEZ

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

MAYO, 2017

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

POSGRADO CONJUNTO EN CIENCIA ANIMAL



TESIS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms) Y SU
ASOCIACIÓN CON PPAR- β/δ EN PIEL SANA Y MELANOMA DE
EQUINO**

PRESENTADA POR

MVZ. ITZEL YANINA RANGEL SÁNCHEZ

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

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO,

MAYO, 2017

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (Tumor de Wilms) Y SU ASOCIACIÓN CON PPAR- β/δ EN PIEL SANA Y MELANOMA DE EQUINO.

Comité de tesis



Director

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



Director externo

Dr. Pablo Zapata Benavides



Co-Asesor

Dr. Adolfo Soto Domínguez



Co-Asesor

M.C. Armando Trejo Chávez



Co-Asesor

Dr. Juan José Zarate Ramos

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue realizado en los siguientes departamentos: Genética, Patología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, trabajando en conjunto con en el departamento de Biología Molecular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas y el departamento de Histología de la Facultad de Medicina, todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila y el Dr. Pablo Zapata Benavides.

DEDICATORIA

Primeramente a DIOS, porque sin ÉL, este logró no hubiera sido posible, siempre está a mi lado en los buenos y malos momentos, es mi fortaleza y mi guía en mí caminar, me enseñó que tolo lo puedo en ÉL y que para ÉL no hay nada imposible Lucas 8:27. Gracias Dios por tu gran bondad y misericordia. Esta Victoria es tuya. Por fin Terminé mi Tesis y soy Maestra en Ciencias. Amén.

A mí amado y guapo esposo Oscar Garza Rodríguez que me mando Dios para ser mi apoyo incondicional en todo momento. Sí, a ti mí amor que eres un hombre de Dios, maravilloso y perfecto para mi vida, un claro ejemplo de nobleza y humildad, tienes un corazón maravilloso en el que demuestras que Dios está contigo, nunca me has dejado de decirme tu puedes y sin importar que esté pasando siempre me sacas una sonrisa y me das ánimos cuando me ves triste, gracias porque fuiste parte de este gran proceso y estoy muy feliz porque en esta tesis va todo tu apoyo para que lograra terminarla, disfrutar este nuevo triunfo de mi vida a tu lado es algo que agradezco a mi señor Jesucristo. Dios no se equivoca con la persona que pone a tu lado para que sea tu compañero para toda la vida. Gracias mi Güerito Oji Azul.

A mis maravillosos padres Patricia Sánchez Rodríguez y Sergio Antonio Rangel, dos grandes siervos de Dios que desde pequeña me dieron su amor incondicional y gracias a Dios me mostraron el verdadero significado de un padre, gracias por sus regaños que fueron dados en los momentos precisos para ser guiada por un buen camino, ver su esfuerzo para darnos siempre lo mejor a mí y a mi hermana, me hicieron valorar todo lo que se presenta a mi vida, me enseñaron a lograr todo lo que me propongo y con la ayuda de Dios me convirtieron en una mujer humilde de corazón, comprometida, responsable, inteligente, con valores y muchas cualidades más, me siento llena de felicidad porque gracias a Dios ustedes supieron ser la guía perfecta a mi vida, les agradezco con todo mi corazón que a pesar de la distancia por venirme a estudiar tan lejos, siempre estuvieron en todo momento y nunca me sentí sola, su apoyo ha sido incondicional, podría seguir diciendo tanto de ustedes dos papis pero nunca acabaría, solo quiero agregar una cosa más, los amo y lo que soy ahora es por ustedes dos, porque Dios los uso, para formar esta gran mujer. Gracias papas.

A mi hermosa hermana que Dios me dio Sujey Sarai Rangel Sánchez, ha esta maravillosa mujer que ha sido mi compañera en las buenas y en las malas, me ha enseñado que la persistencia logra alcanzar muchas cosas, su amor hacia mí siempre ha sido incondicional, siempre es un claro ejemplo de una gran mujer y verdadera hermana, estoy muy agradecida con Dios porque la puso a mi lado y juntas hemos compartido inmensidad de cosas maravillosas que no alcanzaría a describir, Dios puso sabiduría en ella para aconsejarme, siempre has sido parte de todos mis logros y tus palabras manita siempre son aliento para seguir luchando por todo aquello que se presenta en mi vida, gracias por estar siempre conmigo, te amo manita.

AGRADECIMIENTOS

*A DIOS, nunca voy a dejar de agradecerle, pues Él es lo primero en mi vida y el que hace posible todo en mí.

*A mi esposo nuevamente, puedo decir con toda seguridad que es el compañero que yo le pedí a Dios.

*A mis padres y hermana, una vez más gracias por estar conmigo y agradezco a DIOS porque son los mejores, Dios no se equivocó en ponerme con ustedes como hija y hermana.

* A mi directora de tesis la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila de la FMVZ, porque desde que la conocí por primera vez en esa aula de clases como mi profesora de Bioquímica en licenciatura, pude darme cuenta de que es una mujer maravillosa, con valores admirables, comprometida en todo lo que desempeñaba, responsable, carismática, siempre preocupada porque aprendiéramos todo lo que ella nos podía aportar, realmente una profesora inigualable, que le gusta lo que hace. Doy gracias a Dios porque la puso en mi camino, pues haberla conocido me inspiró a buscar una formación más para mi vida profesional, me enseñó que con Fe, esfuerzo, responsabilidad, empeño y dedicación, todo lo que te propongas lo puedes lograr, convivir con ella durante todo este proceso fue un honor, porque no solo fue mi asesora de tesis, si no mi consejera para animarme cuando parecía que las cosas no iban bien, siempre estuvo cuando la necesitaba, fue un apoyo incondicional, sus palabras siempre fueron de aliento, nunca me dejó desistir, siempre encontró una solución ante cualquier problema que se presentaba, en fin, admiro todo lo que sabe y ese corazón tan maravilloso que solo Dios pudo poner, son tantas cualidades las que la describen que la hacen ser única, pero como dije antes no se puede decir todo porque no se acaba, pero sí puedo decirle que Dios siempre pone a las personas más maravillosas en mi camino y le agradezco a Dios que usted Dra. Diana sea parte de mi vida no solo profesional si no también que puedo verla como una amiga.

*A mi co-asesor Dr. Adolfo Soto Domínguez de la Facultad de Medicina, que estoy segura que Dios me lo mandó en el momento preciso, es una persona que tiene un corazón enorme, admiro su capacidad para enseñar y transmitir sus conocimientos a cada persona que Dios pone frente a él, es objetivo en todo lo que emprende y realmente la Fe en Dios,

su esfuerzo, empeño, dedicación y responsabilidad lo llevan siempre a alcanzar lo que se propone, está lleno de valores y cualidades admirables, una trayectoria profesional increíble, siempre busca soluciones cuando parece que no las hay y con paciencia logra dar excelentes resultados, yo soy un claro ejemplo de su dedicación y compromiso, pues he aquí los resultados y el cumplimiento de este proyecto en mí vida, estoy muy agradecida con él porque me ayudo incondicionalmente y a pesar de que su trabajo era mucho nunca descuido mi avanzar y siempre aporto todo lo que en él estaba disponible para que yo mejorara, aprendí mucho de él y le doy muchas gracias a Dios porque lo conocí, realmente es una persona excepcional, con él pude ver que todo es posible cuando se confía en Dios.

*A mi director externo Pablo Zapata Benavides de la FCB, una persona con trayectoria excepcional, comprometido, responsable y realmente le gusta lo que hace, siempre tuvo la disponibilidad de apoyarme, nunca me negó de sus grandes conocimientos, le doy gracias a Dios porque pude conocerlo y valoro mucho cada aportación y consejo que me dio para que este proyecto fuera enriquecido y resultara en lo mejor, admiro de él su forma de trabajar y orientar, pues te hacen ser una persona independiente durante todo el proceso de trabajo, es una calidad de persona con toda la extensión de la palabra.

*A mi co-asesor MC. Armando Trejo Chávez de la FMVZ porque es una persona que tiene grandes valores, admiro su esfuerzo, entrega y dedicación en todo lo que desempeña, siempre está busca ser mejor cada día que pasa, una persona más que Dios puso en mi camino.

*A mi co-asesor Juan José Zarate Ramos de la FMVZ, una persona realmente integra, la cual busca que sus logros no solo lo beneficien a él sino a todo su entorno, admiro todo lo que hace para generar productividad y crecimiento en cada lugar donde ha estado, es una persona con valores admirables, siempre demuestran su gran corazón, ayuda incondicionalmente y su entrega y dedicación lo han llevado a ser una fuente de inspiración para crecer profesionalmente, nunca desiste, una persona más que le agradezco a Dios porque su apoyo para beneficiar mi proyecto siempre fue un sí.

*A Claudia Barrera Secretaria de Subdirección Académica de la FMVZ, porque siempre estuvo dándome palabras de aliento y me apoyo de manera incondicional, aprendí con ella que apoyar y ayudar no son obligaciones si una forma de decirle a la otra persona, que no está sola, que puedes contar con ella, es una gran mujer y amiga, realmente

admirable como persona y como profesionalista, Dios me dio el honor de conocerla y ver el gran corazón que tiene, valores y cualidades inigualables y lo aseguro, es una mujer excepcional.

*A Norita del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, una persona noble y con un corazón humilde siempre dispuesta a apoyar y aportar de sus conocimientos en todo momento.

*Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna Jefe del departamento de Histología de la Facultad de Medicina, porque es una persona cordial y me brindó la oportunidad de trabajar con ellos.

*A la MC. Aimé Garza de la FMVZ, una gran mujer de Dios con un corazón enorme y una integridad excepcional, grandes valores y muchas cualidades más las cuales son innumerables, le doy gracias a Dios porque la conocí y porque sus palabras de aliento fueron precisas para no desistir, siempre tuve su apoyo incondicional y en todo momento me enseñó que el esfuerzo, la entrega y dedicación con Fe son productoras de grandes resultados, ahora sé que Gracias a Dios puede llamarla amiga.

*Al IME Luis Gerardo Mendoza Dávila, el cual en todo momento estuvo siempre dispuesto para ayudarme y apoyarme, a pesar de sus múltiples ocupaciones en su trabajo, nunca me negó brindarme sus grandes conocimientos, es una persona maravillosa con un gran corazón y excelentes valores que los describen como una persona grandiosa, otra gran persona que Dios puso en mi caminar durante este proceso.

*Al Dr. Jaime Hernández Escareño del Departamento de Microbiología de la FMVZ, porque es un ejemplo de un hombre dedicado, que va en busca de sus metas con esfuerzo y empeño, responsable y con grandes valores que refleja con tan solo escucharlo hablar, no se rinde ante las adversidades y busca con Fe los resultados de lo que se propone, siempre fue positivo para alentarme en todo momento, si ocupaba algo era el primero en decir yo tengo, yo te lo doy, siempre aportó de sus conocimientos y nunca dudo en ayudarme, es un gran Dr. y sé que tengo el honor de llamarlo amigo.

*Al MC. César Dávila Martínez del departamento de Inmunología de la FMVZ, el cual me enseñó que cuando se ayuda a alguien se hace con el corazón, su forma de aportar sus conocimientos es admirable, pues nunca hubo un día tedioso con él a pesar de que los momentos de trabajo eran largos, siempre tuvo la disposición de enseñarme y orientarme

con paciencia y esmero, es un claro ejemplo de una persona sincera, honesta responsable, carismática y con muchos valores más que vale mucho la pena conocer. Estoy agradecida con Dios porque fue parte importante de este proceso y porque más que tenerlo como compañero ahora puedo decirle amigo.

*A la TSU. Cynthia Marisol Padrón Carrillo del Departamento de Genética de la FMVZ, una hermosa chica que me brindó su apoyo incondicional y siempre tuvo palabras de aliento para decirme tú puedes, ya todo va a salir, échale ganas nena. Es una persona con un gran corazón, le doy gracias a Dios porque más que una compañera ahora es una gran amiga.

*A la TLC. Leslee Nayelly de la Rosa Contreras del Departamento de Virología de la FMVZ, porque me enseñó que las cosas son difíciles hasta que nosotros cambiemos esa perspectiva, siempre me decía no te preocupes Itzel ya vete a descansar mañana será un día mejor, Dios no se equivoca con las personas que pone a mi alrededor y sé que también puedo llamarla amiga.

*A la TSU Elda Paola Garza Alemán del Departamento de Patología de la FMVZ, porque es una persona que a pesar de todo el trabajo que tenía, cuando le pedía apoyo siempre me daba un espacio especial, se convirtió en una amiga más que en mi instructora es una persona admirable porque es demasiado el trabajo que realiza y a pesar de eso nunca deja de ayudar a quien se lo pide. Le doy gracias a Dios porque me permito conocerla y trabajar con ella.

*A la MC. Brisa Carranza de la FMVZ, porque gracia a Dios nunca dejo de alentarme y enseñarme los detalles que en ocasiones yo no veía, dándoles soluciones y buscando salidas perfectas, una gran mujer y amiga, con un corazón maravilloso.

*A la MC. Andrea González Báez, la cual considero una persona con valores admirables, un corazón excepcional, me brindo palabras de aliento y me enseñó que cuando algo se empieza hay que terminarlo de la mejor manera, le doy gracias a Dios siempre me dijo tu puedes, eso pasa pero veras que todo se logra, realmente es una gran persona y una gran amiga.

*A la QCB. Anahis Marlene Olvera Rivera del departamento de Inmunología de la FMVZ, una chica que contagia con su alegría y que siempre estuvo dispuesta a ayudarme

en todo lo que le pedía, es admirable su entrega y dedicación en lo que hace, una persona más que me alegra haber conocido con la ayuda de Dios.

*Al Dr. Uziel Castillo de la FMVZ, una gran persona, siempre dispuesto a enseñar y aportar de lo mucho que ha aprendido, lo admiro por su entrega incondicional a su profesión.

*Al Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar y la Dra. Alicia Magdalena Nevarez Garza de la FMVZ, que cada vez que me veían siempre se preocupaban por preguntarme cómo iba y recibía palabras de aliento que eran precisas para seguir esforzándome. Dos grandes y excelentes Doctores que Dios me permitió tratar y conocer.

*A la Dra. Heidi Rodríguez Ramírez de la FMVZ, por brindarme estancia en su laboratorio a cargo, con una excelente disposición. Y siempre estar al pendiente de lo que me hacía falta.

*A MC. Felipe Torres del Muro de la FCB, porque siempre estuvo dispuesto a apoyarme y nunca dejó de aportar de lo mucho que ha aprendido para enriquecer este proyecto, un gran amigo y una gran persona.

*A la MC. Mariela Arellano de la FCB, por ser una persona que cada vez que la veía sus palabras eran de aliento y si necesitaba algo siempre estuvo dispuesta a ayudarme. Es una persona con un gran corazón y dedicada en su profesión.

*Al Dr. Chago y la Dra. Karina del Departamento de Inmunobiología de la FCB, porque fueron personas siempre dispuestas para resolver cualquier duda que tenía y cada vez que los visitaba mi estancia era amena. Son personas admirables.

*A todos mis compañeros de maestría y demás personas que cada uno con sus experiencias aportaban conocimientos para mejorar este proyecto.

*Al posgrado en conjunto Agronomía-Veterinaria y a todos mis profesores de posgrado porque fueron parte importante de mi crecimiento profesional.

*A mi Familia en general que amo, porque siempre han estado conmigo y nunca han dejado de apoyarme, han confiado en mí creyendo en todo momento que yo lo lograría.

*A mis hermanos de corazón que Dios puso en mi vida para quedarse, porque sus oraciones fueron efectivas y Dios hizo su obra en mí y sobre este proyecto.

* Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo recibido durante mis estudios de Postgrado, y hacer posible mi desarrollo profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

LUGAR DE TRABAJO	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iiiv
ÍNDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xvi
ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. OBJETIVO GENERAL	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Generalidades del cáncer	6
4.2. Cáncer en animales	8
4.2.1. Cáncer en equinos	9
4.2.2. Melanoma en equinos	11
4.3. Melanoma en humanos	14
4.4. El Gen WT1 (Tumor de Wilms)	18
4.4.1. Origen de WT1 en humanos	18
4.4.2. Origen, Localización y Estructura del Gen WT1 en Equinos	23
4.5. El Gen PPAR- β/δ (receptor activado por el proliferador de peroxisoma PPAR Beta/Delta)	23
4.5.1. Origen del gen PPAR- β/δ en humano	23
4.5.2. Localización y Estructura de PPAR- β/δ en equinos	26
4.6. Estudios de Inmunohistoquímica (IHQ) para WT1 y PPAR- β/δ en Humanos	27
4.7. Estudios de Inmunohistoquímica en melanoma de Equinos	30

5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Diseño experimental	31
5.2. Recolección de muestras	32
5.3. Análisis histológico de las muestras de piel sana y riñón de equino e histopatológico de las muestras de Melanoma de equino, mediante la tinción convencional de H&E	33
5.3.1. Técnica Histológica	33
5.3.2. Tinción Convencional con Hematoxilina y Eosina (H&E)	35
5.4. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en muestras de piel sana, melanoma y riñón de equino	37
5.4.1. Procedimiento de fijación de los tejidos	37
5.4.2. Técnica de Inmunohistoquímica	38
5.5. Interpretación	40
5.6. Métodos de Cuantificación	40
5.7. Análisis estadístico	40
6. RESULTADOS	41
6.1. Análisis histológico de los tejidos de piel sana y riñón, e histopatológico de las muestras de melanoma, mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E)	41
6.1.1. Piel sana	41
6.1.2. Melanoma	42
6.1.3. Riñón	43
6.2. Análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ), utilizando el revelado con Diaminobencidina (DAB)	44
6.2.1. Resultados de la proteína de WT1 en Piel Sana	44
6.2.2. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Piel	45
6.2.3. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Ganglio	46
6.2.4. Resultados de la proteína de WT1 en Riñón	47
6.2.5. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Piel Sana	48
6.2.6. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Piel	49
6.2.7. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Ganglio	50
6.2.8. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Riñón	51
6.3. Análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ), utilizando el revelado con Carbazol (EAC)	52

6.3.1. Resultados de la proteína de WT1 en Piel Sana	52
6.3.2. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Piel	53
6.3.3. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Ganglio	54
6.3.4. Resultados de la proteína de WT1 en Riñón	55
6.3.5. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Piel Sana	56
6.3.6. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Piel	57
6.3.7. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Ganglio	58
6.3.8. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Riñón	59
6.4. Análisis comparativo de los dos reveladores, Diaminobencidina (DAB) y Carbazol (EAC), para mostrar la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ)	60
6.4.1. Comparativa de Piel Sana para la expresión de la proteína de WT1	60
6.4.2. Comparativa de Melanoma en Piel para la expresión de la proteína de WT1	61
6.4.3. Comparativa de Melanoma en Ganglio para la expresión de la proteína de WT1	62
6.4.4. Comparativa de Riñón para la expresión de la proteína de WT1	62
6.4.5. Comparativa de Piel Sana para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	63
6.4.6. Comparativa de Melanoma en Piel para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	64
6.4.7. Comparativa de Melanoma en Ganglio para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	65
6.4.8. Comparativa de Riñón para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	65
6.5. Evaluación inmunohistoquímica a través de los Análisis: Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de riñón, piel sana y melanoma.....	66
6.5.1. Análisis Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el Riñón	66
6.5.2. Análisis Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma	70
7. DISCUSIÓN	75
8. CONCLUSIONES	78
9. BIBLIOGRAFÍA	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores moleculares	7
Tabla 2. Genes supresores de tumores	8
Tabla 3. Deshidratadores de los Tejidos	34
Tabla 4. Aclaradores de los Tejidos	34
Tabla 5. Líquidos de preinclusión de los tejidos	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inmunopatogenesis del melanoma en humanos	15
Figura 2. Localización del gen WT1	20
Figura 3. Isoformas de WT1 17AA (E5+/-) y 3AA (KTS+/-)	21
Figura 4. Sitios de iniciación alternativos de la traducción	21
Figura 5. Representación esquemática de la proteína PPAR beta/delta, (PPAR- β/δ)	24
Figura 6. Representación esquemática de la estructura molecular del gen PPAR- β/δ	25
Figura 7. Fotomicrografías de la histología de piel sana de equino	41
Figura 8. Fotomicrografías de la histología de melanoma en piel de equino	42
Figura 9. Fotomicrografías de la histología de melanoma en ganglio de equino	43
Figura 10. Fotomicrografías de la histología normal de riñón de equino	43
Figura 11. Fotomicrografías de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	44
Figura 12. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	45
Figura 13. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	46
Figura 14. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	47
Figura 15. Fotomicrografías de piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	48
Figura 16. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	49
Figura 17. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	50
Figura 18. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	51
Figura 19. Fotomicrografías de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	52

Figura 20. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	53
Figura 21. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	54
Figura 22. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	55
Figura 23. Fotomicrografías de piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	56
Figura 24. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la expresión de la localización de la proteína de PPAR- β/δ	57
Figura 25. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	58
Figura 26. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	59
Figura 27. Fotomicrografías comparativas de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador	60
Figura 28. Fotomicrografías comparativas de las distintas estructuras de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador	61
Figura 29. Fotomicrografías comparativas de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	61
Figura 30. Fotomicrografías comparativas de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1	62
Figura 31. Fotomicrografías comparativas de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador	62
Figura 32. Fotomicrografías comparativas de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador	63
Figura 33. Fotomicrografías comparativas de las distintas estructuras de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador	64
Figura 34. Fotomicrografías comparativas de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	64

Figura 35. Fotomicrografías comparativas de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ	65
Figura 36. Fotomicrografías comparativas de riñón de equino para el análisis de la expresión de la localización de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador	65
Figura 37. Fotomicrografías de riñón, para su estudio Densitométrico	67
Figura 38. Fotomicrografías de riñón, para su estudio Morfométrico	69
Figura 39. Fotomicrografías de los Tejidos de inmunohistoquímica revelados con AEC, para su estudio Densitométrico	72
Figura 40. Fotomicrografías de los Tejidos de inmunohistoquímica revelados con AEC, para su estudio Morfométrico	74

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Método Densitométrico para el análisis de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el riñón, utilizando ambos reveladores, DAB y AEC	67
Gráfica 2. Método Densitométrico para el análisis de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el riñón, utilizando ambos reveladores, DAB y AEC	69
Gráfica 3. Método Densitométrico para el análisis de la expresión y la asociación de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equinos	72
Gráfica 4. Método Morfométrico para el análisis de la expresión y la asociación de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equinos	74

ABREVIATURAS

WT1: Tumor de Wilms

PPARs: Receptores Activados por el Proliferador de Peroxisomas

PPAR- β/δ : Receptor Activados por el Proliferador de Peroxisoma PPAR- β/δ

PPAR- α : Receptor Activados por el Proliferador de Peroxisoma PPAR- α

PPAR- γ : Receptor Activados por el Proliferador de Peroxisoma PPAR- γ

IHQ: Inmunohistoquímica

H&E: Hematoxilina y Eosina

μm : Micras

μl : Microlitros

Mm: Mili molar

mm: milímetros

cm: centímetros

ml: mililitros

g: gramos

mg: miligramos

$^{\circ}\text{C}$: Grados Centígrados

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ABC: Complejo Avidina-Biotina

Ac: Anticuerpo

Ag: Antígeno

Ig: Inmunoglobulina

DAB: Diaminobencidina

AEC: Carbazol

MET: Microscopio electrónico de transmisión

TA: Temperatura ambiente

pH: Potencial de Hidrógeno

Ac: Ácido

PBS: Buffer Fosfato Salino

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

CH₄O: Metanol

Seg.: Segundos

Min.: Minutos

Hrs.: Horas

RESUMEN

En la actualidad los tumores en equinos tienen un campo estrecho de investigación, debido a que se desconoce el daño que esté tipo de patologías puede causar en estos animales. Se ha descrito que la prevalencia de tumores en equinos va del 1 al 3% en comparación con todas las patologías que se pueden llegar a presentar en esta especie.

Dentro de la gama de tumores que pueden estar presentes en los equinos, encontramos dentro de los tres principales, al melanoma cutáneo, el cual se considera que tiene una prevalencia del 80%, describiéndose principalmente en equinos de color tordillo mayores de 15 años; este tipo de patología se asienta en piel y tejidos blandos y puede llegar a adquirir capacidad metastásica, convirtiéndose en un cáncer letal para el animal. Se ha demostrado que el uso de terapias convencionales contra esta patología no ha tenido éxito y los resultados que se continúan describiendo en relación con este tipo de terapias son poco alentadores, lo que ha generado un interés en la búsqueda de otros métodos de terapia para esta patología, como lo es la terapia génica.

El gen WT1 (Tumor de Wilms) ha sido previamente descrito como un oncogén en diversas neoplasias en humanos, incluyendo melanoma, en donde su expresión favorece la proliferación de células cancerosas. Se ha reportado una asociación entre la expresión del Gen PPAR- β/δ (Receptores activados por el proliferador de peroxisomas beta/delta) y la modulación negativa de la expresión de WT1 en líneas celulares de melanoma humano y melanoma murino. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de la proteína del gen WT1 y su asociación con PPAR β/δ en piel sana y melanoma de equino. Se recolectaron 37 muestras de piel sana, 15 muestras de melanoma y 1 muestra de riñón de equinos que iban a ser sacrificados en el rastro del municipio de Escobedo, Nuevo León, se realizó el análisis histológico de cada uno de los tejidos y se analizó la expresión de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ a través de la técnica Inmunohistoquímica. Se detectó expresión de la proteína WT1 en piel sana, principalmente en epidermis y dermis, folículo piloso, glándula sebácea y glándula sudorípara, sin embargo no se detectó expresión en las muestras de melanoma equino. Por otro lado se observó que la proteína del gen PPAR- β/δ se encuentra mayormente expresada que la proteína de WT1 en la piel sana, principalmente en epidermis y dermis, folículo piloso, glándula sebácea y glándula sudorípara, estos datos revelan que la proteína de PPAR- β/δ se encuentra sobreexpresada en las muestras de

melanoma equino, sugiriendo que el Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas (PPAR β/δ) modula negativamente la expresión del gen WT1 en melanoma de equinos, concordando con lo reportado en algunas líneas celulares de melanoma humano y murinas.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se describe como un conjunto de enfermedades cuya característica es el crecimiento descontrolado y la diseminación de células anormales (llamadas también células tumorales o cancerosas) en un organismo. Este es causado tanto por factores externos (la inhalación de humo, organismos infecciosos, nutrición deficiente, agentes químicos, radiación, etc.), como factores internos (mutaciones heredables, factores hormonales, condiciones inmunológicas y cambios que ocurren en el metabolismo).

En la especie equina los tumores tienen una incidencia relativamente baja que va del 1 al 3%, encontrándose muy por debajo de la incidencia en humanos y otras especies de animales domésticos, aún se desconoce la razón del porque el equino presente una aparente resistencia a desarrollar procesos neoplásicos, sin embargo el interés por descubrir la causa ha permitido que se estén estudiando múltiples teorías genéticas, lo cual ha favorecido el diagnóstico de un mayor número de equinos con cáncer, lo cual se ha atribuido a que los equinos están alcanzando un mayor tiempo de vida que les permite desarrollar procesos oncológicos con mayor frecuencia, o bien, a los cambios sociológicos de considerar a los equinos como algo más que solo un animal de trabajo. Por otro lado tampoco se descarta que este aumento se deba a una mayor capacidad de implementar la aplicación de técnicas diagnósticas dentro de la medicina equina, (estudios citológicos, diagnóstico avanzado por imagen, etc.).

En los equinos la incidencia de tumores en la piel y tejidos blandos es del 80%, del cual tres son los más frecuentes (sarcooides, carcinomas de células escamosas y melanomas). El cáncer de melanoma cutáneo o mucocutáneo es el tercer tumor más frecuente en la piel principalmente de equinos de color tordillo mayores de 15 años y se ha vuelto una problemática que va más allá del simple aspecto cosmético, se describe que su presencia está asociado a la disminución de la calidad de vida del equino o con su muerte. También se ha descrito que otros tipos de colores pueden llegar a presentarlo aunque de forma muy esporádica. El melanoma es un tipo de cáncer que inicia su desarrollo a partir de las células productoras de melanina de la piel, los melanocitos y suele causar metástasis a todos los tejidos del organismo, lo que pone en riesgo el bienestar y por consiguiente la salud del animal llevándolo a la muerte. Este tipo de patología solo se diferencia en benigna o maligna

El interés por tratar este tipo de patologías equinas dermatológicas ha llevado al uso común de aplicar crioterapia, radiofrecuencia, quimioterapia y cirugía, sin embargo el resultado es desalentador ya que con el paso del tiempo el tumor vuelve a reincidir en el equino, motivo por el cual se han buscado nuevas estrategias terapéuticas como lo es la terapia génica., en esta especie se ha reportado la estimulación inmunológica con IL-12 intratumoral, la cual ha tenido un efecto favorable dando como resultado un 41% de reducción del melanoma.

En la búsqueda de nuevos genes candidatos a ser biomarcadores para melanoma en equinos, se han realizado comparaciones con aquellos reportados para esta patología en humanos.

En diferentes tipos de cáncer, que pueden ir desde una leucemia y linfoma hasta tumores sólidos de glándula mamaria, pulmón y melanoma, entre otros, se ha reportado una sobreexpresión del Gen WT1 (Tumor de Wilms), el cual es un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc”, involucrado en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular, por lo que se ha considerado que en humanos, WT1 juega un papel oncogénico relevante. El silenciamiento de WT1 con RNAi in vitro en la línea de melanoma murino B16F10 resulta en una disminución de la proliferación celular e inducción de apoptosis e in vivo en un modelo de metástasis a pulmón, resulta en una disminución en la masa tumoral y un aumento de la sobrevivencia. Sin embargo, el rol biológico de este gen en equinos no ha sido reportado.

Uno de los genes implicado de forma muy importante en la formación, la reparación y la carcinogénesis de la piel en humanos es el Gen PPAR- β/δ (Receptores Activados por el Proliferador de Peroxisomas PPAR- β/δ), el cual juega un papel muy importante en la oxidación de los ácidos grasos en el hígado, riñón y músculo esquelético, también participa en el metabolismo de los ácidos grasos y lípidos del corazón y está vinculado en la participación para la diferenciación de adipocitos, por tanto es considerado un factor de transcripción el cual es activado por un ligando que utilizan de forma estricta la maquinaria basal transcripcional con la finalidad de regular la expresión de genes que influyen fuertemente en la señalización de células normales y cancerosas de la piel.

Existe un reporte donde se asocia la expresión del Gen PPAR- β/δ en líneas celulares de melanoma humano y murino con una regulación negativa de la expresión del gen WT1, lo cual conlleva a una disminución en la viabilidad de células cancerosas.

En estudios previos realizados en nuestro Laboratorio, se detectó la expresión del gen WT1 en muestras de piel, riñón y sangre de equinos sanos, sin embargo, no se encontró la expresión en melanoma, sugiriéndose que WT1 en equinos podría estar actuando como un gen supresor de tumor.

Debido a los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo de trabajo y a los hallazgos encontrados en humanos en relación a la interacción que tiene PPAR- β/δ con la represión de WT1, en el presente trabajo se analizó el posible rol biológico de WT1 y su modulación a través de la asociación con la expresión de PPAR β/δ en piel sana y melanoma de equino.

2. HIPOTESIS

El PPAR β/δ modula la expresión del gen WT1 en piel sana y melanoma de equinos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión del gen WT1 y su asociación con PPAR β/δ en piel sana y melanoma de equino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Realizar el análisis histológico de las muestras de piel sana, riñón y melanoma de equinos mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina.
- 2.-Analizar la localización de la expresión de la proteína WT1 y PPAR- β/δ , en piel sana y melanoma de equinos por inmunohistoquímica.
- 3.- Determinar el nivel de expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ , mediante el análisis cuantitativo a partir de las inmunohistoquímica en muestras de piel sana y melanoma de equino.
- 4.- Determinar la asociación de WT1 y PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equinos.

4. ANTECEDENTES

4.1. Generalidades del cáncer:

El cáncer es el resultado de la alteración de la homeostasis celular, debido a factores fisiológicos, inmunológicos, bioquímicos y anatómicos (Arif Khan Abdul, et al., 2012). Se describe como un conjunto de patologías que tienen en común un crecimiento descontrolado de células anormales, lo cual resulta en la formación de células cancerosas dentro de un organismo (Alberts B., et al., 2002), (Encina S. Gonzalo, 2013),

El cáncer es resultado de una ruptura dentro de la cooperación multicelular de cualquier tejido (Aktipis C. Athena, et al., 2015), lo que trae como consecuencia cambios en la secuencia de ADN y modificaciones epigenéticas, así como en los patrones de expresión génica, resultando en un crecimiento descontrolado de células anormales, (Somarelli Jason A., et al, 2016). Dichos cambios a nivel molecular inducen ciertos fenotipos que logran aumentar la capacidad de la célula para sobrevivir, competir y reproducirse para finalmente multiplicarse de forma exacerbada lo cual conducirá al desarrollo de cáncer (Somarelli Jason A., et al, 2016).

Las ventajas de los fenotipos incluyen: 1) Autosuficiencia en las señales de crecimiento, 2) Insensibilidad para las señales que producen como respuesta anti-crecimiento, 3) Capacidad para evadir la apoptosis, 4) Un alto potencial para replicarse ilimitadamente, 5) Pueden sostener el proceso de angiogénesis, 6) Alta capacidad de invadir cualquier tejido cercano o distante y con ello causar metástasis, 7) Pueden producir desregularización energética en la célula y 8) Logran evitar que el sistema inmune los destruya, (Somarelli Jason A., et al, 2016), (Hanahan Douglas, et al., 2011), (Hanahan Douglas, et al., 2000).

Estas características fenotípicas son consecuencias que se deben a las mutaciones que se dan en las células en comparación con sus homólogas que siguieron estando sanas, (Somarelli Jason A., et al, 2016). Pueden identificarse como neoplasmas benignos aquellos que no tienen un crecimiento agresivo, de tal forma que no invaden los tejidos del cuerpo ni causan diseminación en el mismo, por otro lado los neoplasmas malignos crecen rápidamente, causan una invasión en los tejidos del cuerpo y finalmente se diseminan en todos los tejidos corporales del animal, a este hecho se le conoce como metástasis y es así

que se determina al neoplasma maligno como cáncer, (American Cancer Society, et al., 2017).

El cáncer en la actualidad se ha convertido en una de las principales prioridades para la salud pública, debido a su alta incidencia y mortalidad, así como la morbilidad que existe en los distintos tratamientos que se utilizan y el costo elevado que estos generan, (Contreras Martínez J., 2005). Esta alta prevalencia del cáncer es una alerta a nivel mundial y su gravedad lo deja como una de las patologías de mayor interés para su estudio en humanos (Encina S. Gonzalo, 2013).

Existen genes que son denominados oncogenes ya que su función es la transformación de células normales a células malignas tumorales, dando como resultado la formación del cáncer (Catellanos Julio, et al., 2014) (Huff Vicki, 2011). Se ha encontrado que un solo oncogén puede estar involucrado en la formación de diferentes tipos de neoplasias (Rosenfeld C., et al., 2003), y se ha reportado que existe un grupo limitado de ellos (Tabla 1) (Díaz Chico N., et al., 2010). Estos se han utilizado como marcadores diagnósticos para evaluar la presencia de diferentes tipos de cáncer (Ramos Zerpa Hilda V., et al., 2010).

1. Proteínas específicas	HMB-45 Proteína S-100 Melan-A
2. Ciclo celular	Ciclina D1 CDK-4 p16 p21 p53 Rb
3. Apoptosis	survivina
4. Inestabilidad del DNA	MLH-1 MSH-2
5. Receptores de membrana	caveolina c-Kit
6. Proliferación	Ki-67
7. Transición epitelio-mesénquima	Cadherina N Cadherina E Osteonectina Osteopontina PKC α WT1
8. Otras proteínas	Topoisomerasa HLA

Tabla 1. Marcadores moleculares (Garrido Ruiz María Concepción, et al., 2010), (Fuertes L., et al., 2013).

Por otro lado se han identificado grupos de genes que actúan como supresores tumorales (Tabla 2) (Catellanos Julio, et al., 2014), cuyas proteínas a través del envío de señales intracelulares actúan en la regulación normal de la proliferación celular, ya sea para inhibir o detener la división celular o para estimular la muerte celular programada (apoptosis) (Yang L., et al., 2007).

Gen	Locus	Neoplasia
Rb1	13q14	Retinoblastoma Osteosarcoma Mama Pulmón
P53	17q12-13.3	Astrocitoma Mama Colón Osteosarcoma
WT1	11p13	Tumor de Wilms
DCC	18q21	Carcinoma de colon
NF-1	17q11.2	Neurofibromatosis tipo I
APC y MCC	5q21-22	Carcinoma de colon
MEN-1	11q13	Paratiroides Páncreas Hipófisis Corteza adrenal
MEN-2	10q11	Carcinoma papilar de tiroides
BRCA-1	17q21	Cáncer de mama Cáncer de ovario

Tabla 2. Genes supresores de tumores (Catellanos Julio, et al., 2014).

4.2. Cáncer en animales:

Actualmente, la oncología veterinaria, es un área con mayor desarrollo en la práctica clínica, debido al incremento en las herramientas diagnósticas en animales domésticos y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Aunado a esto, los modelos animales, son considerados de gran importancia en estudios de investigación oncológica ya que éstos, nos permiten realizar estudios de oncología comparativa, los cuales desempeñarán un fuerte papel primordial dentro de la medicina transnacional, logrando con ello un rápido flujo en la aportación de datos de laboratorio para la aplicación clínica de forma muy relevante en los seres humanos (Porrello A., et al., 2006), (Zachary James F., et al., 2011).

No hay muchos estudios con relación al cáncer en animales domésticos, pero se ha descrito que las neoplasias son muy comunes en las mascotas y que la incidencia va en aumento con respecto a la edad, lo que resulta que más del 50% de las muertes está dada en las mascotas con edades mayores a los 10 años, se ha demostrado que el cáncer en los perros tiene una incidencia igual que en los humanos, por otro lado se describe que en los gatos la incidencia de presentar cáncer es menor, con un promedio del 20%, con respecto a otras patologías, y comparados con los humanos, (American Veterinary Medical Association, et al., 2017).

Por otro lado se describe que en los animales utilizados para producción, la mayor incidencia de los casos de cáncer está relacionada con agentes infecciosos y con los factores ambientales a los que están expuestos (Zachary James F., et al., 2011).

4.2.1. Cáncer en equinos:

La prevalencia de tumores dentro de la especie equina se considera relativamente baja, esto es debido a que se estima que su incidencia va del 1 al 3% con respecto a todas las patologías reportadas en esta especie, por otro lado la incidencia de cáncer en esta especie también se encuentra muy por debajo de la reportada para los humanos y de igual forma con otras especies de animales domésticos, (Pielberg Rosengren Gerli, et al., 2008). Se desconoce la razón de que la especie equina tenga esta aparente resistencia para el desarrollo procesos neoplásicos, sin embargo se han comenzado a estudiar múltiples teorías genéticas (Davis E. G., et al., 2013).

Por otro lado, se describe que en la actualidad ya se están diagnosticando con mayor frecuencia un alto número de equinos con cáncer, esto probablemente se deba a que los equinos están alcanzando un mayor tiempo de vida, lo que provoca que tengan más oportunidad para desarrollar procesos oncológicos, aumentando de esta forma la incidencia de esta patología; otros factores atribuidos al aumento de la incidencia de cáncer en esta especie, son los cambios sociológicos que han ido modificando el pensamiento de los humanos a considerar a la especie equina, ya no solo como un animal de trabajo, si no como una animal doméstico familiar (Davis E. G., et al., 2013) así como un mayor desarrollo en las técnicas diagnósticas tales como: diagnóstico avanzado por imagen,

estudios citológicos, rayos X, etc., las cuales parecían muy limitadas solamente a los pequeños animales o inclusive solo a los seres humanos (Davis E. G., et al., 2013).

Se ha reportado que el 80% de los tumores que se presentan en equinos asientan en la piel y en los tejidos subcutáneos, (Martínez de Merlo Elena M., et al., 2012), encontrándose una alta incidencia de tumores malignos y su agresividad normalmente se observa a nivel local, por otro lado se menciona que el porcentaje de los tumores que tienen gran capacidad metastásica suelen ser muy limitados, siendo inferior al 25%. Se han descrito un gran número de diversos tipos de cáncer a nivel histológico, tales como: el carcinoma de las glándulas sudoríparas, los carcinomas de las células basales, distintos tipos de sarcomas de los tejidos blandos, etc. (Martínez de Merlo Elena M., et al., 2012), (Schaffer PA., et al., 2013).

Los tres tumores que se presentan con más frecuencia en la piel de los equinos son: en primer lugar los sarcoides, seguido del carcinoma de células escamosas y el melanoma equino como el tercer tumor más frecuentemente descrito, dichos tumores presentan una incidencia muy significativa, comparada con otros tipos de tumores menos comunes presentes en los equinos como: el linfoma cutáneo, el mastocitoma y el hemangiosarcoma, (Martínez de Merlo Elena M., et al., 2012), (Schaffer PA., et al., 2013).

En un estudio sobre neoplasias cutáneas y mucocutáneas en equinos realizado en el laboratorio de diagnóstico clínico Veterinario en la universidad del Estado de Oregon, de un total de 536 neoplasias analizadas, se encontró que las neoplasias más comunes fueron:

- Sarcoides: Se presentó en el 51.4% de los casos, más frecuentemente en un promedio de 9 años de edad y en las razas: Cuarto de Milla, Paints y Árabe, fue el único tumor que se encontró en los burros y las mulas (Valentine Beth A., 2006).

- Carcinoma de células escamosas: con una incidencia del 18.3% con respecto al total de las neoplasias, encontrándose en zonas oculares más frecuentemente en las razas Cuarto de Milla y Paints, con un promedio de edad de 13 años y en la zona prepucial o peneana, se encontró más comúnmente en las razas Cuarto de Milla y Appaloosa, con un promedio de edad de 21 años y para el carcinoma celular en la región de la vulva y perianal de 19 años (Valentine Beth A., 2006).

- Tumores melanocíticos (melanoma), los papilomas y los tumores de los mastocitos o células cebadas: con un 87.5% de incidencia en relación a todas las neoplasias cutáneas (Valentine Beth A., 2006).

4.2.2. Melanoma en equinos:

El melanoma es un tipo de cáncer que se desarrolla en las células productoras de melanina o melanocitos que son encontradas en la piel (Burden Katherine, 2011).

En equinos es el tercer tumor descrito con mayor frecuencia (18%) en comparación a todas las neoplasias cutáneas (Fleury Catherine et al., 2000), (Valentine Beth A., 2006).

Es el tipo de cáncer más reportado en los equinos de color tordillo, teniendo mayor prevalencia de un 70% a un 80% en los equinos mayores de 15 años; puede llegar a encontrarse en caballos de otros colores en una muy baja proporción (Bellone R. R., et al., 2010), (Sutton R. H., et al., 1997), (Fleury Catherine et al., 2000), (Heidemarie Seltenhammer Monika, et al., 2003). En la especie equina, el melanoma tiene una consistencia que puede ser dura o suave y puede llegar a encontrarse de forma solitaria o bien en múltiples grupos de masas tumorales en ciertas áreas del cuerpo, frecuentemente en las regiones subcutáneas lo cual impide que sean visibles debido a que pueden estar recubiertos por piel sana con pelo; por otro lado cuando son expuestos su identificación es rápida, esto debido a su coloración típica gris oscuro a negro, aunque también en algunos casos pueden no tener color, éstos son considerados amelanocíticos y requieren de un diagnóstico a partir del análisis de biopsias. Dependiendo de su ubicación, los tumores de melanoma pueden llegar a ulcerarse e infectarse (Burden Katherine, 2011).

En equinos, los melanomas se diferencian como benignos o malignos, sin dar otras categorías; a diferencia de lo descrito para humanos, éstos no se clasifican en estadios, la mayoría de la veces el melanoma invade solo de forma localizada y suele ser de crecimiento lento, sin embargo cuando ya causan metástasis comúnmente se encuentran debajo de la cola y al mismo tiempo sobre la región perianal, la región yugular y alrededor de los ojos en un parpado o en ambos, aquí se pueden identificar fácilmente ya que se presentan como una especie de nódulos negros (Burden Katherine, 2011).

Aunque la mayoría de los melanomas son generalmente suaves y no causan ningún dolor, cuando se presenta metástasis, podría resultar en consecuencias devastadoras para

esta especie, un ejemplo que se describe es cuando el melanoma presenta metástasis con nódulos cancerosos que se comienzan a desarrollar en todo el sistema interno del cuerpo del equino, ocasionando un fallo del funcionamiento de los órganos dañados o bien cuando se presenta de forma interna a nivel del abdomen o del pecho, su crecimiento podría ocasionar una fuerte presión y como consecuencia inhibir la función de los órganos vitales (Burden Katherine, 2011), tal como lo reportado en el caso de un equino semental de raza Warmblood, de 12 años de edad, con presencia de melanoma metastásico intramedular diseminado (Patterson-Kane J. C., et al., 2001).

Los tratamientos convencionales para el melanoma en equinos abarcan las cirugías (Scotty Nicole C., et al., 2008), la quimioterapia y la radiofrecuencia, (Barabas K., et al., 2008), (Hunter Robert P., et al., 2007), (Laus F., et al., 2010), la electro/quimioterapia, (Scacco Licia et al., 2013), (Theon AP., et al., 1993), (McCauley Charles T., et al., 2002) y la crioterapia (Hewes Christina A., et al., 2006).

Se ha logrado obtener buenos resultados con la aplicación de estas técnicas, sin embargo se ha visto que los tumores con el paso del tiempo vuelven reincidir, motivo por el cual se ha promovido el desarrollo de mejores tratamientos que no sean dolorosos y con un mínimo grado de invasión hacia el animal, como es el caso de diferentes estrategias de terapia génica, para lo cual se tiene que identificar y caracterizar genes que se encuentren en el melanoma equino benigno y maligno, que puedan ser utilizados como posibles biomarcadores para este tipo de cáncer y marcar un parte aguas como futuros blancos terapéuticos (Lembcke Luis M., et al., 2012), (Bei Li , et al., 2014).

Una de las estrategias que se ha aplicado en equinos con melanoma, es la estimulación del sistema inmune a base de la Interleucina-12 (IL-12), la cual se aplica como una vacuna intratumoral en los tumores, lográndose un 40% de la reducción de la masa de melanoma y la desaparición completa en una lesión tratada, confirmándose que no se presentó recurrencia después de los 6 meses de haber sido tratados (Heinzerling Lucie M., et al., 2001), (Pavlin Darja et al., 2012), (Finocchiaro L. M., et al., 2009).

De igual forma, se ha analizado como tratamiento para el melanoma metastásico en equinos, el uso de una vacuna generada a partir del ADN del plásmido que codifica una proteína de *Streptococcus Pyogenes* (PAC/EMM55), donde después de 8 meses de tratamiento en un caballo tordillo, se obtuvo una reducción del 40.3% del tamaño de las

lesiones, lo cual podría asociarse al aumento de los anticuerpos denominados antimelanomas IgG (Brown Elizabeth L., 2014).

4.2.2.1. Genética molecular del melanoma en equinos:

Se ha reportado una mutación en el gen syntaxin 17 (STX17) o también denominado Gen Gris, la cual consiste en una duplicación intrónica de 4.6kb y se encuentra dentro de la región del haplotipo gris de 352kb, la cual se ha identificado como la causante de la aparición del fenotipo de color gris en los equinos y se ha visto que este cambio de coloración se relaciona con la edad (Pielberg Rosengren Gerli et al., 2008).

Esta duplicación contiene elementos reguladores con efectos específicos en los melanocitos, provocando que se transformen de promotores débiles a fuertes potenciadores de producción de melanina, dicho mecanismo se ha visto que predispone al melanoma (Sundstrom Elisabeth et al., 2012). En un estudio en el cual se analizaron biopsias de melanoma y muestras de sangre en 8 razas de equinos color Tordillo se encontró poca evidencia para la expansión del número de copias de la secuencia duplicada a partir del DNA extraído de sangre, por el contrario en las muestras de melanoma se encontró una tendencia mayor de la expansión del número de copias para la mutación del gen Gris (Pielberg Rosengren Gerli et al., 2008), (Sundstrom Elisabeth et al., 2012), (Bellone R. R., et al., 2010), (Kavar Tatjana et al., 2012), lo que les sugirió que la secuencia duplicada puede constituir un elemento de accionamiento para desencadenar el melanoma (Jiang Lin et al., 2014).

En un estudio sobre el análisis de la herencia para el grado de melanoma, el nivel de color gris, el grado de vitíligo y el grado moteado realizado en una población de 1,119 equinos de color tordillo durante 9 años, se tomaron en cuenta tres parámetros de heredabilidad: uno en heredabilidad poligénica, el dos en heredabilidad debido a la mutación STX17 y el tres en heredabilidad del color gris debido al locus agouti (ASIP), los resultados presentaron para el encanecimiento, el vitíligo y el moteado una alta heredabilidad, mientras que para el melanoma se encontró una heredabilidad moderada, sugiriendo con estos datos que el gen STX17 tiene la función de controlar una gran proporción de la varianza fenotípica y la heredabilidad para todos los rasgos (Curik Ino et al., 2013). Se ha visto que este gen es el único que se ha caracterizado y encontrado su

funcionamiento, pero la importancia para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas ha generado que se analice la expresión de otros genes en líneas celulares de melanoma en equinos, lo que ha dado como resultado la detección de la expresión de algunos genes tales como: el gen S-100, los antígenos nucleares de las células en proliferación (PCNA), así como el HMB-45, el Ki-67, el T-311 y el CD44 (Heidemarie Seltenhammer Monika et al., 2004), Melan-A, MAGE-1, MAGE-3 (Kamau Chapman Sarah W., et al., 2009), TYR, TRP1, MITF, PMEL, ASIP, MC1R, POMC, y KIT, el p16, PTEN y el gen supresor tumoral p53 (Heidemarie Seltenhammer Monika et al., 2014). Se ha sugerido que pueden servir como marcadores confiables para los melanomas equinos (Heidemarie Seltenhammer Monika et al., 2004). Sin embargo aún no ha sido estudiado su rol biológico de estos marcadores en el melanoma equino (Heidemarie Seltenhammer Monika et al., 2004), (Kamau Chapman Sarah W., et al., 2009), (Heidemarie Seltenhammer Monika et al., 2014).

4.3. Melanoma en humanos:

El melanoma en humanos es la patología que representa el 4% de todos los tumores malignos que se presentan en la piel de color clara (Grossmann Kenneth F., et al., 2013), este se origina cuando los rayos ultravioleta causan un daño potencial al DNA (Aris Mariana, 2009) de los melanocitos responsables de la producción de la melanina, (Ombra Maria N., et al., 2016), que se encuentran como barrera protectora de la piel (Arozarena Imanol, et al., 2011), (Aris Mariana, 2009), provocando que estas células sufran una transformación maligna, dicha transformación resulta en la acumulación de múltiples mutaciones en el genoma del melanocito causando alteraciones en el ciclo celular que desencadenan una proliferación celular desmedida provocando que se inicie la formación del tumor, su crecimiento logra la evasión de la respuesta inmunitaria y de esta forma el tumor invade el organismo causando metástasis (Restrepo Catalina, et al., 2012). Se han identificado otros dos factores de riesgo que predisponen al melanoma maligno los cuales están dados por cuestiones fenotípicas (del propio individuo) y por medio de factores genéticos (Piug Susana, et al., 2015). La agresividad de esta patología es responsable de que exista desde un 75 a un 80% de muertes por cáncer de piel principalmente en personas caucásicas y pacientes menores de 30 años (Acosta Álvaro Enrique, et al., 2009), (Grossmann Kenneth F., et al., 2013), (Piug Susana, et al., 2015), (Potrony Miriam, et al.,

2015), siendo el desarrollo de esta patología muy raro en la infancia (Potrony Miriam, et al., 2015).

Se ha creado un modelo que describe la progresión del melanoma, el cual ha sido elaborado por Clark, en este modelo se explica que el primer cambio que sufren los melanocitos es para el desarrollo del nevi benigno (Fig. 1), el cual está compuesto de melanocitos nevales, estos al sufrir mutaciones adicionales dan lugar a la formación de nevi displásicos (Fig. 1), los cuales tienen un crecimiento muy aberrante y su citología es atípica al azar, cuando esto sucede, las mutaciones que son transformadas a malignas dan lugar a las células que desarrollan el melanoma, una vez que este se presenta comienza a proliferar a través de la epidermis (a este proceso se le denomina como fase de crecimiento radial), y debido a su crecimiento acelerado de invasión llega a la dermis (la cual es la fase de crecimiento vertical) y finalmente desde ahí se va a otros órganos (metástasis), (Fig. 1) (Aris Mariana, 2009).

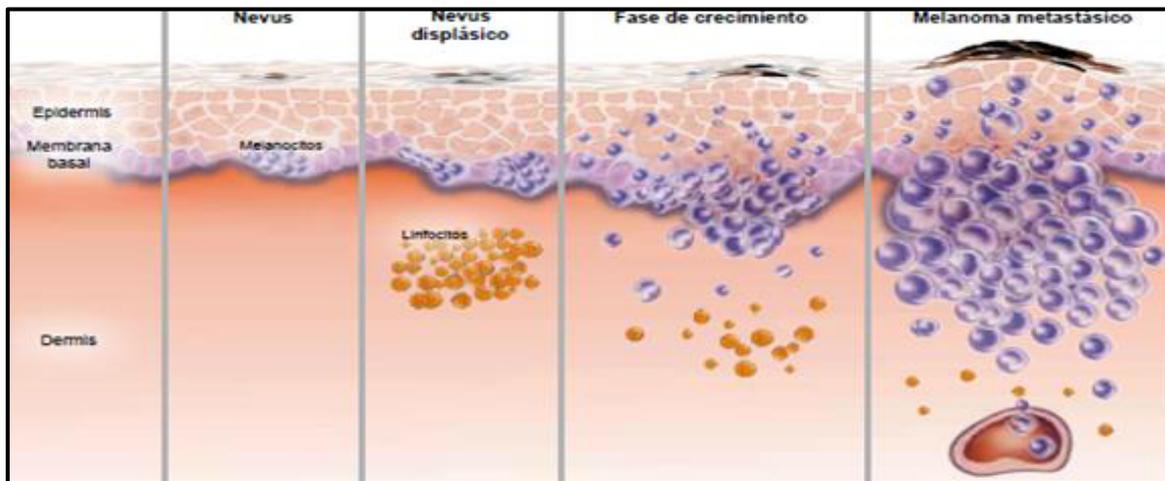


Figura 1. Inmunopatogenesis del melanoma en humanos, (Restrepo Catalina, et al., 2012).

4.3.1. Genética molecular del melanoma en humanos:

Se ha encontrado que las mutaciones suelen presentarse entre el 10 al 20% de los melanomas, pues estas tienden a producirse al principio de la tumorigénesis y se ha visto que son más comunes en los sitios que han estado con exposición crónica al sol (Singh Meena K., et al., 2008), (Shitara D., et al., 2015). Las mutaciones van a ser variables en los distintos genes que presentan características de vulnerabilidad ante el cáncer, se ha

reportado que el gen CDKN2A (Inhibidor de las Kinasa Dependiente de Ciclina A2) ha sido el más caracterizado y se encuentra en el cromosoma 9p21, su función es codificar a las proteínas p16INK4a y la p14ARF, las cuales son las que predisponen al melanoma (Restrepo Catalina, et al., 2012), el gen CDK4 (Kinasa Dependiente de la Ciclina 4) al presentar mutaciones activa el paso sin control de fase G1/S del ciclo celular, lo que conduce a la proliferación celular incontrolada y por consecuencia al crecimiento del melanoma (Ibrahim Nageatte, et al., 2009), el gen CDKN2A inactivo, ubicado en el cromosoma 12q14, presenta mutaciones del 25 al 40 % de los casos de melanoma de tipo familiar (Restrepo Catalina, et al., 2012), la interacción del gen CDKN2A con el gen CDK4, genera un potencial negativo en el control de la regulación en la proliferación celular (Ibrahim Nageatte, et al., 2009).

Existen vías de señalización que se ven alteradas y dan paso a la formación de los melanomas (Ibrahim Nageatte, et al., 2009), se ha reportado la vía MAPK (Proteínas Kinasa Activadas por Mitógenos), (cinastas de proteínas activadas por mitógenos) la cual se encuentra en un gran número de tipos de células y funciona como regulador para el crecimiento y la supervivencia celular, las mutaciones que resultan por la activación de esta vía han sido encontradas en el 90% de los melanomas y con mayor frecuencia están presentes en los oncogenes NRAS y BRAF los cuales permanecen activados para estimular constantemente la proliferación y la senescencia celular, (Hocker Thomas L., et al., 2008), por lo tanto todas las alteraciones que se dan en la señalización a través de la vía MAPK, se encuentran implicadas para el desarrollo y la progresión del melanoma, (Hocker Thomas L., et al., 2008), el oncogén NRAS puede activar la vía PI3K (Fosfoinositol 3-Kinasa), la cuales es necesaria para que se den las señales de la supervivencia celular y se ha observado que al parecer estimula la proliferación de los melanocitos (Ibrahim Nageatte, et al., 2009). En la secuencia del oncogén BRAF se ha identificado una mutación somática, la cual está presente en un 66 % en los melanomas malignos (Davies Helen, et al., 2002), esta mutación también ha sido encontrada en la mayoría de las lesiones benignas (Pollock Pamela M., et al., 2003), sugiriendo que la activación del oncogén BRAF, es necesaria para que se dé la proliferación de melanocitos, sin embargo esta activación no es suficiente para que por sí misma desencadene la formación de tumores (Patton E. Elizabeth, et al., 2005), (Hocker Thomas L., et al., 2008), juega un papel muy importante dentro de las vías de señalización

para activar factores de transcripción como MEK (Proteína Kinasa), el cual activa a BCL (Linfoma de Células B), ERK (Factor de Transcripción Nuclear), y al gen MITF (Factor de Transcripción Asociado con Microftalmia) para estimular la proliferación celular (Thompson John F., et al., 2009).

Se reportó que el gen MITF está involucrado en el desarrollo y la supervivencia de los melanocitos a través del aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 (Linfoma 2 de Células B), también regula la expresión de la proteína melanogénica TYR (Tirosinasa) y regula la transcripción de genes como SLIV (Genes específicos de melanocitos Homólogos Plata) y MLANA (Melan-A), los cuales cuando tienen baja expresión o están ausente, dan como resultado una progresión de nevos a la formación de melanoma (Thompson John F., et al., 2009).

Cuando hay baja expresión del gen MITF se relaciona con un mal pronóstico en melanoma, debido a que permite la diferenciación de sus células, por el contrario cuando existe una mayor expresión del gen MITF las células exhiben menor agresividad (Thompson John F., et al., 2009), debido a esto se encontró que solo del 10 al 20% de los melanomas presentan la expresión del gen MITF, teniendo mayor expresión las lesiones de origen metastásico (Thompson John F., et al., 2009), (Ibrahim Nageatte, et al., 2009).

Existe un protooncogén denominado c-kit el cual utiliza la vía MAPK para la transcripción del gen MITF, este protooncogén codifica al receptor de membrana llamado factor de Tirosina Kinasa, al cual se le unen factores de crecimiento que se encuentran en muchos tipos de células, incluyendo a los melanocitos (Wu Min, et al., 2000).

Se han reportado mutaciones oncogénicas y un aumento en la expresión de las copias del protooncogén c-kit en un 39% de los melanomas que se presentan en las mucosas, un 36% en melanoma lentiginoso o “acral” y un 28% en los que están ubicados en la piel dañada debido a su exposición crónica al sol (Curtin John A., et al., 2006), sugiriendo que el c-kit está implicado principalmente en la formación de los melanomas de las mucosas y en el melanoma lentiginoso o “acral” (Curtin John A., et al., 2006).

En melanoma se ha observado un gran desequilibrio entre los genes que pertenecen a la familia BCL-2/Bax, encontrándose un aumento de la expresión de la proteína BCL-2 en el melanoma maligno en relación con los melanocitos y los nevos, por el contrario las proteínas proapoptóticas Bax y Bim presentan una baja expresión en los melanomas con

respecto a los nevos (Ibrahim Nageatte, et al., 2009). Se ha visto que la proteína antiapoptótica Bcl-XL (Linfoma Extra Largo de Células B) presenta un expresión considerada como prematura en los melanomas debido a que se encuentra desde sus estadios iniciales, por lo cual se asocia con la transformación maligna de los melanocitos a melanoma, una alta capacidad invasiva y metástasis (Tang Liren, et al., 1998).

Actualmente se reportó la sobreexpresión de un gen denominado WT1 en más del 80% de los casos de melanoma analizados, el cual no se han encontrado en piel sana, ni en nevos melanocíticos benignos, sugiriendo que este gen podría significar un marcador más para este tipo de cáncer (Nicole Wagner, et al., 2008).

Recientemente se ha encontrado que los Receptores Activados por el Proliferador de Peroxisomas (PPARs) actúan como supresores tumorales e influyen fuertemente en la señalización molecular de las células normales y cancerosas, reportándose que tienen efectos anti-proliferativos en los melanocitos (Sertznig Pit, et al., 2011), se dice que esta inhibición de la proliferación celular pueda estar dada por apoptosis o a través de las vías dependientes específicamente de los PPARs (Sertznig Pit, et al., 2011), las evidencias describen que existen tres miembros de la familia de los PPARs (PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ) y se ha encontrado que la activación de PPAR- α inhibe el potencial metastásico de las células del melanoma, que PPARB- β/δ solo se expresa en muestras de melanoma humano y que la expresión de PPAR- γ al ser estimulado disminuye la proliferación de células neoplásicas en esta patología (Michiels Jean F., et al., 2010).

Gracias al funcionamiento de los diversos genes que se involucran en el melanoma, hoy en día se están creando alternativas de terapias génicas con modelos animales los cuales proporcionan pistas importantes sobre la causa y el tratamiento del melanoma en humanos (Mrowka Christian, et al., 2000).

4.4. El Gen WT1 (Tumor de Wilms):

4.4.1. Origen de WT1 en humanos:

El nombre del Gen WT1 fue dado por el cirujano alemán Maximus Wilms (1867-1918), quien lo descubrió durante el estudio de las bases genéticas del nefroblastoma o Tumor de Wilms (Leo, et al., 2017). El Tumor de Wilms o nefroblastoma es un cáncer renal que se presenta con mayor frecuencia en pediatría y afecta a 1 de cada 10, 000 niños,

su origen es atribuido a los trastornos en la histogénesis renal, ya que al parecer se desarrolla cuando los tejidos blastemales metanefricos fallan en su proceso de maduración. Se ha encontrado que el Tumor de Wilms ocurre con una frecuencia elevada en pacientes con aniridia, criptorquidia, hipospadias del meato urinario y otros trastornos congénitos genitourinarios y se ha observado que existe un alto riesgo de desarrollar este tumor en niños con el síndrome de Beckwith Wiedemann, el síndrome de Denys-Drash, el síndrome de Bloom y el síndrome WAGR, (Mrowka Christian, et al., 2000).

4.4.1.1. Localización y Estructura del Gen WT1 en humanos:

El gen WT1 está localizado en el cromosoma 11p13 (Fig. 2) (Medicine® A. S., et al., 2017) y abarca aproximadamente 50kb, está conformado por 10 exones y presenta dos sitios de splicing alternativos, genera un ARNm de 3kb que da lugar a la presencia o ausencia de distintas isoformas debido al corte y empalme de los exones, generando la traducción de la proteína la cual presenta un dominio N-terminal que está compuesto de secuencias ricas en prolina-glutamina, el cual está involucrado en interacciones con el RNA y otras proteínas, este dominio es crítico para la regulación transcripcional debido a que contiene dominios de represión y activación para otros genes, también está compuesta por un dominio Carboxilo-Terminal (C-Terminal) que está formado por 4 dedos de zinc del tipo Kruppel Cisteina²-Histidina², los cuales representan su dominio de unión al ADN y también está involucrado en interacciones con el ARN y otras proteínas, este dominio comparte homología con la familia del gen EGR (Early Growth Response) el cual es responsable del crecimiento temprano, lo que sugiere que la proteína WT1 está actuando como un factor de transcripción (Yang L., et al., 2007), (Zamora Avila D. E., et al., 2009).

Se ha reportado que las múltiples funciones de la proteína están dadas por los dos splicing alternativos que generan a las distintas isoformas, el splicing I esta dado en el exón 5 el cual genera una región de 51pb que codifica para 17AA, el splicing II se da entre los exones 9 y 10, codificando una pequeña secuencia de 3AA denominados KTS (Lisina-Treonina-Serina), es la isoforma más importante para la proteína debido a que se encuentra entre los dedos de zinc 3 y 4. La combinación de la presencia (+) o ausencia (-) de ambas

genera 4 isoformas distintas (Fig. 3) (Hernández Fernández Rolando A., 2011), (Zamora Avila D. E., et al., 2009).

También existen otras modificaciones menores, las cuales son originadas por la edición del ARNm y por la presencia de los 3 sitios alternativos de iniciación de la traducción, el primero se forma con el triplete de nucleótidos CTG en la posición -68 el cual genera una isoforma de 60-62kD, el segundo está dado por ATG en la posición 0 que genera una isoforma de 52-54kD y el tercero también es ATG el cual se localiza en la posición 127, generando una isoforma de 36-38kD, todas estas modificaciones de splicing que sufre el gen dan lugar a la formación de 24 isoformas distintas, (Fig. 4), (Yang L., et al., 2007), (Zamora Avila D. E., et al., 2009).

Entre todas las isoformas que se originan, se considera como la variable fundamental a la presencia (+) o ausencia (-) de la secuencia de KTS, esto es debido, a que se ha reportado mediante microscopia confocal, que la localización a nivel celular de la proteína del gen WT1 es distinta, según se trate de la isoforma +KTS o -KTS. La isoforma WT1 (+KTS) se encuentra situada alrededor y en el interior del núcleo, por lo que interviene en la maquinaria de corte y empalme de exones (splicing) o también llamado procesamiento del ARNm, se ha confirmado que está asociada con procesos de maduración del ARNm. La isoforma WT1 (-KTS) está localizada principalmente en el núcleo y puede encontrarse de forma difusa o bien ocupando amplios dominios, está, se asocia al proceso de transcripción (Zamora-Avila D. E., et al., 2007).

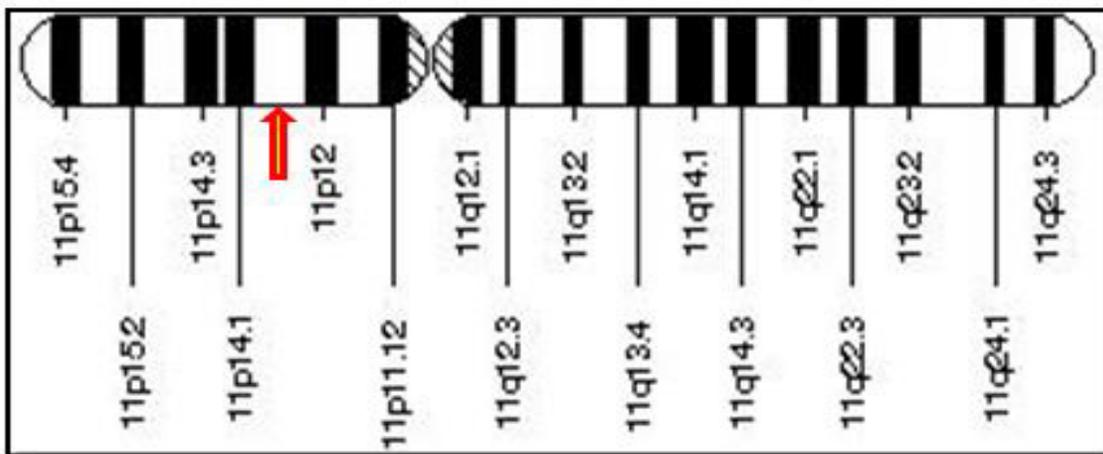


Figura 2. Localización del gen WT1. El gen WT1 está localizado en el brazo corto del cromosoma 11(p) en la posición 13 (flecha) (Medicine® A. S., et al., 2017).

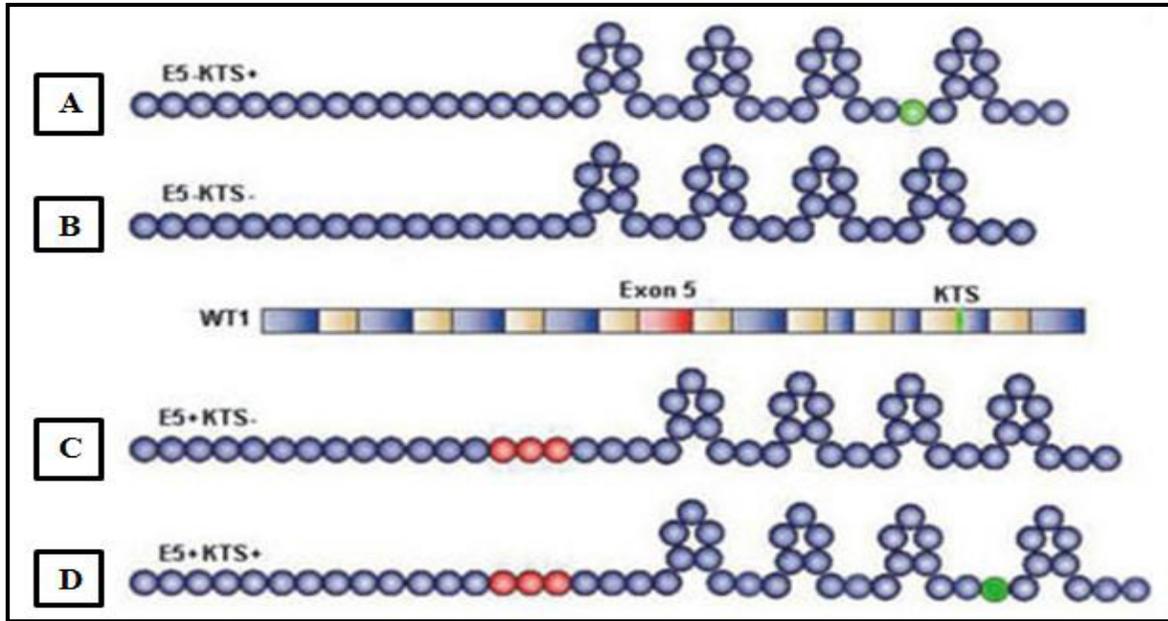


Figura 3. Isoformas de WT1 17AA (E5+/-) y 3AA (KTS+/-). Al centro se muestra el esquema del gen WT1, el cual está conformado por sus 10 exones (en color azul), Intrones (color beige), Exón 5 (color rojo) y la secuencia KTS, (en color verde). A) E5- y KTS+. B) E5- y KTS-. C) E5+ y KTS-. D) E5+ y KTS+, (Hernández Fernández Rolando A., 2011).

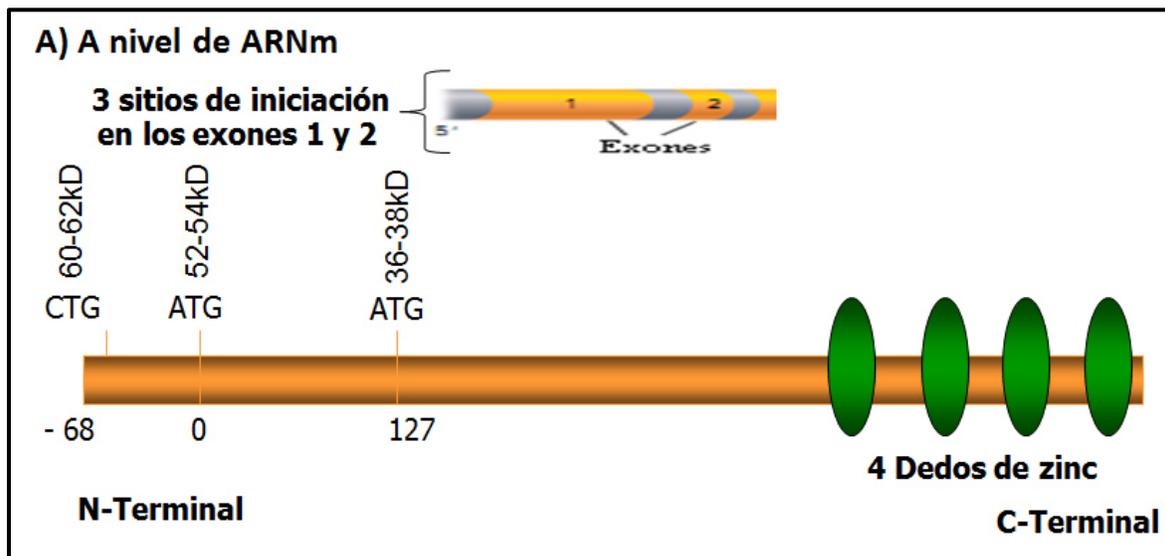


Figura 4. Sitios de iniciación alternativos de la traducción (Mrowka Christian, et al., 2000), (Zamora Avila D. E., et al., 2009).

4.4.1.2. Los distintos Roles Biológicos del gen WT1 en Humanos:

Se reporta que el gen WT1 fue descrito por primera vez como un gen supresor tumoral debido a que se encontraba mutado en el 10 al 15% de los tumores de Wilms o nefroblastomas (Mrowka Christian, et al., 2000), (Muñoz Chápuli Ramón, et al., 2003), (Nakatsuka Shin-ichi, et al., 2006), posteriormente se reportó que el gen WT1 estaba involucrado durante la etapa embrionaria desempeñando un papel esencial para la formación y el desarrollo de diversos órganos, como: el sistema genitourinario, el bazo, los órganos mesoteliales, la espina dorsal, el epitelio coleómico, el diafragma, diversas áreas del cerebro, las extremidades y el mesénquima del epicardio y subepicardio, (Scharnhorst Volkher, et al., 2001), también se observó su expresión en la etapa adulta en tejidos sanos, como el mesotelio, en las células de los podocitos glomerulares y las mesangiales del riñón, en las células madre hematopoyéticas CD34-positivas, en las células de Sertoli de los testículos, en las células que se encuentran en la superficie del epitelio y de la granulosa del ovario, en las células del miometrio y en el estroma endometrial del útero y en el músculo liso y células endoteliales del corazón cuando se presenta hipoxia, isquemia e infarto al miocardio, de igual forma su expresión se ha asociado a procesos de tumorigénesis (Nakatsuka Shin-ichi, et al., 2006), (Muñoz Chápuli Ramón, et al., 2003), esto podría deberse a que el gen WT1 codifica para un factor de transcripción involucrado en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular mediante la supresión o activación génica y dependiendo del tipo de tumor, la proteína de WT1 puede funcionar como supresora de proteínas tumorales o factor de sobrevivencia tumoral (oncogén), otras funciones que este gen puede desarrollar son la regulación de la transcripción de una variedad de genes blanco y se ha visto que puede estar involucrado en los procesamientos post transcripcionales del ARNm (Nakatsuka Shin-ichi, et al., 2006), puede sufrir distintas mutaciones o deleciones en su genoma, dando como resultado ciertas modificaciones que dan paso a la proliferación celular, es por ello que en la actualidad el gen WT1 se ha identificado más como un oncogén que como un gen supresor tumoral (Mrowka Christian, et al., 2000), (Wagner N., et al., 2008).

Se ha reportado que de toda la gama de genes que se encuentran expresados de manera diferencial en células cancerosas, resalta la incidencia del gen supresor del tumor de Wilms debido a que se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de neoplasias,

dentro de las cuales se encuentran leucemias y linfomas así como tumores sólidos de pulmón, melanoma, tiroides, mama, ovario, útero, entre otros, lo cual hace suponer que este gen desempeña un papel oncogénico relevante (Young Guy, et al., 2000).

4.4.2. Origen, Localización y Estructura del Gen WT1 en Equinos:

Existe el reporte de la localización cromosómica de WT1 en equinos en el GeneBank bajo el número de acceso Gene ID: 100072704 donde se reporta su ubicación en el cromosoma 7 (NCBI Gene 2017).

Actualmente existe una secuencia de predicción para el gen de WT1 en equinos de 2915pb reportada en el GenBank, bajo el número de acceso XM_005612334.1, (NCBI, GenBank, 2013), también existe una secuencia para la proteína de WT1 en equinos reportada en el GenBank con número de acceso AH008865.2., la cual se encuentra en el locus SEG-AF201736S, constituida por 524pb, sin embargo no se ha descrito con exactitud su origen y no se sabe el rol biológico que desempeña en esta especie (NCBI, GenBank, 2016), (Brouillette James. A., et al., 2000).

En un estudio previo de laboratorio realizado por nuestro equipo de trabajo, se encontró expresión de WT1 en la piel sana, riñón y sangre, pero no en melanoma de equinos, sugiriéndose que este gen, posiblemente podría estar desempeñando un rol como gen supresor tumoral (Garza Rodríguez O. I, et al., 2015).

4.5. El Gen PPAR- β/δ :

4.5.1. Origen del gen PPAR- β/δ en humanos:

Se ha reportado que este miembro de la familia de factores de transcripción fue identificado por primera vez en un análisis sobre los efectos reductores del colesterol a partir de fibratos, se encontró que esta sustancia química derivada del ácido fólico tiene el efecto de estimular a los PPARs aumentando la oxidación de los ácidos grasos hepáticos generando de esta forma una reducción del colesterol, debido a esto se determinó que existe una alta densidad de proliferación de peroxisomas en los hepatocitos que contribuyen al aumento de la oxidación de todos los ácidos grasos, por lo tanto se ha visto que este gen está implicado en la promoción de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, en el consumo de energía y en la termogénesis de los tejidos (King W. Michael, 2015)

4.5.1.1. Localización y Estructura de PPAR- β/δ en humanos:

Es importante mencionar que se han sido identificado tres tipos de PPARs entre los cuales destaca el Gen PPAR- β/δ (Tyagi Sandeep, et al., 2011), reportándose que probablemente es el más estudiado como factor de transcripción (Lemay Danielle G., et al., 2006).

El gen PPAR- β/δ se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.2-p21.2 y tiene un tamaño de 10.7kb, está conformado por 8 exones los cuales codifican para una proteína de 441 AA (Fig. 5) (King Michael W., 2015) (Fig. 6), presenta un inicio en donde se encuentra el sitio A/B o dominio N-terminal A/B, éste desempeña la función de activación independiente de ligando (AF-1); un dominio C denominado dominio de unión al DNA (DBD) el cual está conformado de 72 a 137 AA; un dominio D que se le conoce como la región bisagra; y al final de este gen tenemos un dominio E/F o C-terminal que se le conoce como dominio de unión a ligando (LBD), el cual desempeña la función de activación dependiente de ligando (AF-2) y está conformado de 215 a 441 AA. El DBD está compuesto por dos dedos de zinc, los cuales se unen a secuencias muy específicas del ADN, que actúan como elementos de respuesta hormonal y se presentan cuando el receptor se activa, por otro lado el LBD está conformado por una estructura secundaria muy extensa la cual está compuesta por 13 hélices alfa y por solo una hoja beta, se ha visto que los ligandos que son considerados como naturales y los sintéticos tienen afinidad de unión por el sitio LBD, lo que resulta en una activación o represión del receptor (Guan Youfei, et al., 2001), (Zoete Vincent, et al., 2007).

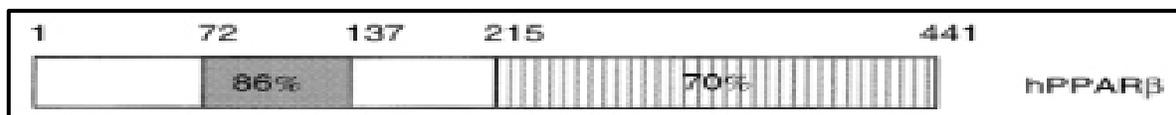


Figura 5. Representación esquemática de la proteína PPAR beta/delta, (PPAR- β/δ) (Guan Youfei, et al., 2001).

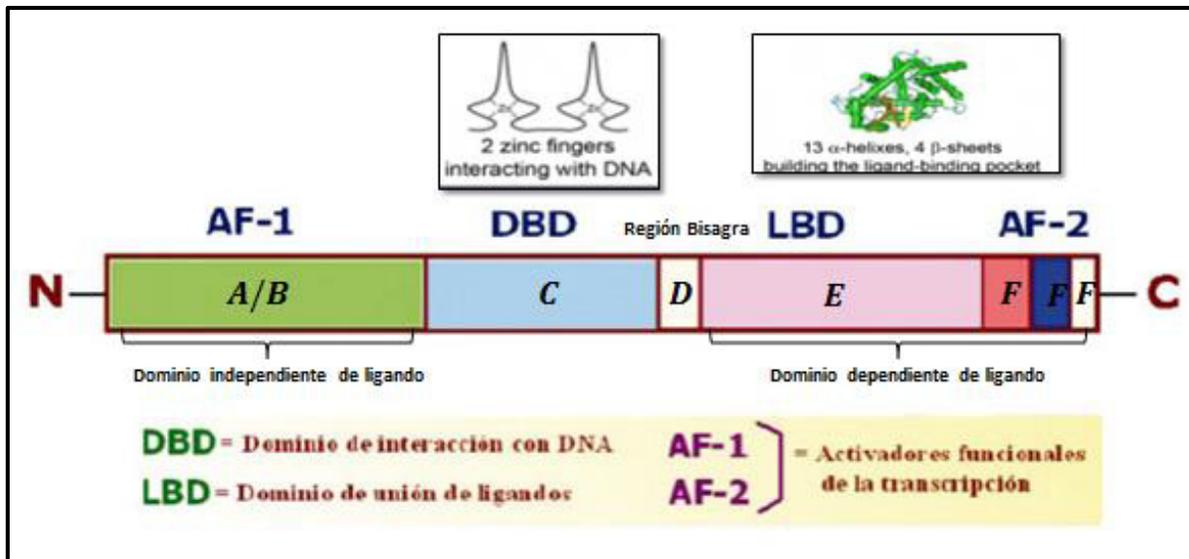


Figura 6. Representación esquemática de la estructura molecular del gen *PPAR-β/δ* (Lemay Danielle G., et al., 2006), (Han Shou Wei, et al., 2010) (Heligon Christophe, 2012).

4.5.1.2. Los distintos Roles Biológicos del gen *PPAR-β/δ* en Humanos:

El gen *PPAR-β/δ* es un factor de transcripción activado por ligandos que se expresan durante el desarrollo normal de ciertas estructuras de la piel, como la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y se ha descrito que en la etapa adulta se encuentran expresados en muchos tejidos, principalmente en la epidermis, en el tejido adiposo y en el cerebro (Michalik Liliane, et al., 2004), (Michalik Liliane et al., 2007), (Michiels Jean F., et al., 2010), (Tyagi Sandeep, et al., 2011), en los roedores su expresión disminuye después del nacimiento (Michalik Liliane, et al., 2004), (Michalik Liliane, 2007), está implicado en la regulación genética del metabolismo de los lípidos (lipogénesis), carbohidratos y otras proteínas (Rodríguez-Martin M., 2008), (Sertznig Pit, et al., 2011), regula la diferenciación final de los adipocitos y está involucrado en la homeostasis energética (Rodríguez-Martin M., 2008), (Sertznig Pit, et al., 2011) (Dunning Kylie R., et al., 2014), se ha reportado que se activa transcripcionalmente a través de la vía de $TNF-\alpha$ lo que conduce a la supervivencia, migración y diferenciación de los queratinocitos, participando en la reparación de la piel (Michiels Jean F., et al., 2010), recientemente se ha visto que este gen también ha demostrado su actividad supresora tumoral en numerosos tipos de cánceres (Rodríguez-Martin M., 2008), ya que su activación regula la proliferación

y la diferenciación celular, lo que conlleva a la inducción del crecimiento y la apoptosis de las células tumorales (Sertznig Pit, et al., 2011), se ha reportado que participa interfiriendo con la carcinogénesis de la piel principalmente con los tumores malignos, entre los cuales se encuentra el melanoma (Michiels Jean F., et al., 2010), (Sertznig Pit, et al., 2011). Debido a sus diversas actividades biológicas el gen PPAR- β/δ representa un importante objeto de investigación como un gen diana para poder generar tratamientos de muchas patologías dermatológicas, como: enfermedades inflamatorias y principalmente en procesos de hiperproliferación epidérmica (tumores malignos, psoriasis, dermatitis atópica, acné y la esclerodermia de la piel) (Sertznig Pit, et al., 2011).

4.5.2. Localización y Estructura de PPAR- β/δ en equinos:

El gen PPAR- β/δ en los equinos se encuentra localizado en el cromosoma 20, reportándose en Gene con el número de acceso Gene ID: 100053404, denominado PPARD peroxisome proliferator activated receptor delta [*Equus caballus* (horse)] (NCBI, Gene, 2017), está conformado por ocho exones que presentan un total de 1644pb, su traducción inicia a partir del tercer exón y se detiene en el último exón, se ha reportado que para lograr caracterizar la proteína de PPAR β/δ del equino, se tuvieron que alinear y analizar varias secuencias de aminoácidos de los PPAR β/δ de distintas especies, tales como: la de los humanos, el chimpancé, los ratones, las ratas, las vacas, los cerdos, los pollos, los perros y los gatos, en donde se observó que las secuencias de aminoácidos de PPAR β/δ están altamente conservadas entre las distintas especies con excepción de la región N-terminal que se ubica en un extremo de la secuencia, se buscó si la proteína de PPAR β/δ de los equinos presentaba dominios en alguna parte de toda su secuencia usando el programa SMART y los resultados fueron que esta proteína presenta dos dominios que son altamente conservados, uno de unión a los ligandos (LBD) y otro de unión al ADN (DBD) el cual observaron que está conformado por dedos de zinc C4 que son los receptores de hormonas nucleares, con este análisis se ha demostrado que el gen PPAR β/δ del equinos, se encuentra bien conservado evolutivamente y presenta dominios funcionales que se han encontrado en otros animales (Hyun-Woo Cho et al., 2015).

4.5.2.1. Los distintos Roles Biológicos del gen PPAR- β/δ en equinos:

El PPAR β/δ desempeña un papel muy importante en el proceso del metabolismo de las grasas en el músculo de los equinos (Lee Chih-Hao et al., 2006), regulador de la proliferación de las células satelitales en el músculo por un mecanismo dependiente de ciclina E1, participa en la regeneración muscular (Angione Alison R., et al., 2011), (Hyun-Woo Cho et al., 2015), tiene relación con la beta oxidación, transformación de la fibra muscular y la resistencia a la velocidad (Hyun-Woo Cho et al., 2015) está involucrado en los procesos de diferenciación celular y la tumorigénesis (Berger Joel et al., 2002), se ha visto que es un regulador de alta capacidad en tumores de la tiroides (Cho H. W., et al 2014) debido a que tiene la capacidad para activarse y funcionar como cooperador con los receptores relacionados a la hormona tiroidea y los receptores del retinoide X, formando un complejo de heterodímeros que funcionan como reguladores transcripcionales de los genes blanco (Wahli W., et al., 1995). Se ha sugerido hasta el momento que este gen puede ser un biomarcador útil para medir la resistencia y la fatiga en los equinos (Hyun-Woo Cho et al., 2015).

4.6. Estudios de Inmunohistoquímica (IHQ) para WT1 y PPAR- β/δ en Humanos:

La inmunodetección de WT1 en células tumorales por medio de IHQ ha sido un paso esencial en los estudios del cáncer, encontrándose que la proteína de WT1 se expresa en el núcleo de células del tumor de Wilms y mesotelioma, por lo que se considera como un marcador diagnóstico de este tumor (Garrido Ruiz María Concepción et al., 2010).

La proteína de WT1 está involucrada en regulación transcripcional en el núcleo y en el metabolismo del ARN y la regulación de la traducción en el citoplasma, se ha detectado a través de IHQ en células tumorales de diversos tipos de neoplasias por lo que se ha identificado como una diana molecular para la inmunoterapia del cáncer siendo parte esencial de la práctica de rutina (Nakatsuka Shin-ichi et al., 2006).

Para el análisis de la expresión de WT1 se ha utilizado el anticuerpo policlonal (C-19) y el monoclonal (6F-H2), en un estudio con 494 casos de cáncer en humanos, se reportó que con el anticuerpo C-19 se detectó la proteína en el 35 al 100% de los casos y con el anticuerpo 6F-H2 del 5 al 88% de los casos, de todos los casos incluidos en este estudio se reportaron como positivos a WT1 con tinción citoplasmática el tumor del estómago,

próstata, biliar, urinario, los sarcomas de tejidos blandos, osteosarcomas y melanomas malignos; mientras que los tumores de ovario y tumor de células pequeñas redondas desmoplásicas mostraron poca positividad de WT1 expresada en el núcleo, por lo que la detección a partir de IHQ en secciones histológicas procesadas rutinariamente, podrían proporcionar información significativa sobre la expresión de WT1 en células de cáncer (Nakatsuka Shin-ichi et al., 2006).

Se ha visto que la expresión de WT1 esta incrementada en estados avanzados de melanoma, esto es un indicio de su asociación con un mal pronóstico (Garrido Ruiz María Concepción et al., 2010).

En un estudio comparativo del nivel de expresión de WT1 por IHQ entre los diferentes tipos de nevos melanocíticos y los estadios de la progresión del melanoma primario, de un total de 271 muestras con lesiones melanocíticas (163 melanomas primarios y 108 nevos), se reportó la expresión de la proteína de WT1 predominantemente en el citoplasma de las células neoplásicas en todos los tejidos, con una mayor tasa de tinción de nevos melanocíticos frente a los melanomas; la expresión de WT1 se incrementa significativamente en estadios avanzados de la progresión del melanoma y se asocia a una baja en la supervivencia (Garrido Ruiz María Concepción et al., 2010).

En un estudio similar, en donde se analizó la utilidad de WT1 como una herramienta diagnóstica en el pronóstico del melanoma, los naevi benignos fueron negativos para WT1, los Spitz naevi expresaron WT1 en un 83% de los casos, para el grupo de naevi displásico la expresión fue del 35%, la mayoría de los casos de los melanomas epitelioides primarios resultaron positivos a WT1 con una expresión del 88%, en todos los casos de melanoma desmoplásico se mostró expresión de WT1 y en el melanoma metastásico WT1 se expresó en un 90% de los casos, confirmándose así que WT1 es una herramienta útil para el diagnóstico auxiliar del melanoma (Whilsher M., et al., 2007).

Las lesiones pigmentadas son muy comunes, pero presentan grandes retos diagnósticos y terapéuticos, éstas abarcan desde los nevos, los cuales son clínicamente estables, hasta los melanomas, que son notorios debido a la metástasis y el elevado índice de mortandad, se ha observado que tanto los nevos como los melanomas surgen a partir de los melanocitos que se derivan de la cresta neural, migrando desde el área paraspinal hasta su eventual ubicación en la unión dermoepidérmica, por esta razón se ha considerado

clínicamente que los nevos típicos son precursores del melanoma y que la inactivación del gen supresor de tumores p16INK4a y las mutaciones en B-raf, sugieren que los nevos y los melanomas comparten un origen en común y ambos requieren eventos adicionales para la transformación al melanoma maligno (Perry Betsy N., et al., 2006).

En una matriz de proteínas denominadas Panomics en donde se comparó una línea celular de melanoma de crecimiento radial con una línea celular de melanoma de crecimiento vertical, se encontró que WT1 se expresa en altos niveles en la línea celular de crecimiento vertical en comparación con la de crecimiento radial, corroborándose mediante un microarreglo que WT1 se expresa en la mayoría de los melanomas, sin embargo está casi ausente en los nevos (Perry Betsy N., et al., 2006).

La expresión de WT1 se ha asociado con la angiogénesis tumoral, esto mediante la activación transcripcional de ETS-1 (Nestina) que permite la vascularización de los tumores a través de la regulación de la proliferación y de la migración de células endoteliales (Nicole Wagner, et al., 2008).

En la línea celular de melanoma murino B16F10 se reportó una alta expresión de WT1, en donde su silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi) induce muerte celular sugiriéndose así que la expresión de este gen es importante para inducir la proliferación de esta línea de melanoma (Zamora Avila D. E., et al., 2009). En un modelo murino de melanoma con metástasis a pulmón establecido con esta línea celular, el silenciamiento de WT1 mediante la administración de secuencias de ARNi vía aerosol resultó en una reducción del índice de masa tumoral y en un aumento de la sobrevivencia de los ratones, concluyéndose que WT1 puede ser considerado como un buen blanco terapéutico para este tipo de neoplasia (Zamora-Ávila D. E., et al., 2007).

Existe un solo reporte de la interacción del gen PPAR- β/δ y WT1 en líneas celulares de melanoma humano y murino, en donde la activación farmacológica de PPAR β/δ provoca una inhibición en la proliferación de células cancerosas sin inducción de apoptosis, asociada a la disminución de la expresión del gen WT1, esto mediante una interacción directa de PPAR β al promotor de WT1 (Michiels Jean F., et al., 2010).

4.7. Estudios de Inmunohistoquímica en melanoma de Equinos:

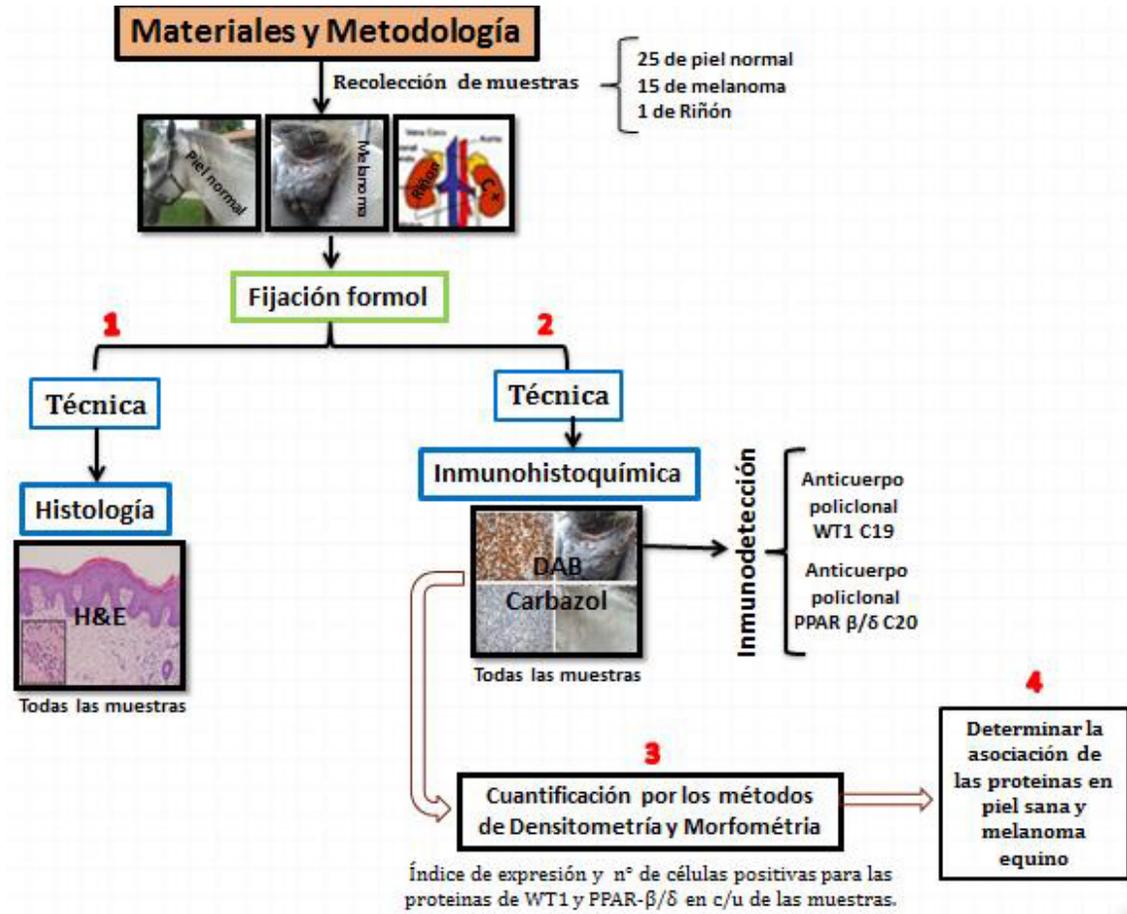
En melanoma de equinos no existe ningún reporte de la expresión de WT1 y PPAR- β/δ , solo existe un estudio en donde se evaluaron distintos marcadores encontrados en el melanoma humano, como el S-100, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), el HMB-45, la Ki-67, el T-311 y el CD44, ya que se reveló que los melanomas benignos de equinos tordillos comparten rasgos comunes con los nevus azules y con los melanomas desmoplásicos malignos en humanos, encontrándose homología en ambas especies sugiriéndose que pueden ser utilizados en equinos como marcadores confiables, (Heidemarie Seltenhammer Monika, et al., 2004).

De los marcadores anteriormente mencionados, existe un reporte adicional sobre el gen S-100, el cual se encontró expresado en la células de los folículos pilosos del pelo que se encuentran dentro de las lesiones tempranas del melanoma equino, localizadas alrededor de la base de la cola, también se reveló la presencia de este gen en una población de células localizadas dentro de la melanosis que se observaba visiblemente alrededor de otras estructuras anexas a la cola y al perineo (Sutton R. H., et al 1997).

Sin embargo los factores que inhiben o retrasan la metástasis del melanoma equino aún son desconocidos y se sugieren más investigaciones que contribuyan al desarrollo de nuevas estrategias de detección y tratamiento para el melanoma en equino (Heidemarie Seltenhammer Monika, et al., 2004).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental:



5.2. Recolección de muestras:

Se recolectaron 37 muestras de piel sana, 15 muestras de melanoma de las cuales, 5 se obtuvieron de la región inguinal y las 10 restantes se obtuvieron por debajo de la piel del maslo de la cola y la región perianal, también se recolectó 1 muestra de riñón, todas estas de provenientes de equinos que iban a ser sacrificados en el rastro del municipio de Escobedo, Nuevo León.

Se realizó la asepsia correspondiente para la obtención de las muestras de melanoma en la región del maslo de la cola y la región perianal, se desinfectó el área de punción con una torunda con alcohol, se sedó a los equinos con 1.1mg/kg de Xilacina al 10% (Procin® Equus-PiSA Farmacéutica Agropecuaria, DF, México) y 0.01mg/kg de Detomidine (Domosedan®-Pfizer AG, Zurich, Switzer Land) a través de la vena yugular, posteriormente se rasuró y preparó asépticamente el área de recolección de la muestra, se aplicaron 10ml del anestésico local subcutáneo Lidocaína al 2% (Pisacaina®-PiSA Farmacéutica Agropecuaria, DF, México) en el perímetro del tumor y posteriormente fueron extirpados quirúrgicamente por medio de la técnica estándar, inmediatamente después de la obtención de cada una de las biopsias, se dividieron en dos partes, una mitad fue colocada en un frasco rotulado con los datos del equino que contenía formalina bufferada neutra al 10%, la otra mitad se colocó en una bolsa plástica rotulada con los mismos datos y se colocó en una caja de material aislante térmico que mantenía la cadena en frío necesaria para conservar las muestras durante su transporte, posteriormente las muestras que fueron puestas en la formalina bufferada fueron transportadas al departamento de Patología y la muestras colocadas en la bolsa plástica se resguardaron a -20°C en el departamento de Genética, ambos departamentos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).

Para la recolección de las muestras de piel sana, melanoma en ganglio y riñón, se siguió el mismo procedimiento de asepsia, división de la muestra y resguardo de la misma.

5.3. Análisis histológico de las muestras de piel sana y riñón de equino e histopatológico de las muestras de Melanoma de equino, mediante la tinción convencional de H&E:

5.3.1. Técnica Histológica:

I. Toma de la muestra:

La muestra fijada de cada tejido (piel sana, melanoma y riñón), se lavó con agua directa de la llave y se cortó empleando una hoja de bisturí sin hacer tanta presión sobre el tejido, para evitar distorsionar su estructura microscópica, las pieles se cortaron entre 4 y 5mm de grosor, 5mm de ancho y 1 a 1.5cm de largo aproximadamente, los melanomas de 5mm de grosor por un 1cm por lado aproximadamente, y el riñón de 5mm de grosor por 1cm de ancho y 1.5 cm de largo aproximadamente, el resto de cada tejido se resguardó nuevamente en su frasco de formalina al 10%.

II. Fijación:

Una vez cortados, los tejidos se colocaron en un cassette de plástico, se cerró y se etiquetó para identificarlos, se incubaron por 48 horas en un frasco con formalina nueva al 10% para impedir los procesos de autólisis celular, conservando de esta forma su morfología sin cambios notables y manteniendo la integridad de cada célula, también se logró que las células adquirieran la capacidad oxidante reductora para conferirse en ellas una mejor absorción hacia el colorante.

La formalina tiene la capacidad de penetrar muy rápido en el tejido fijando no solo la parte superficial, sino que también lo más profundo, confiriendo cierta dureza para mantenerse intactos durante todo el proceso de la técnica.

III. Inclusión:

Pasadas las 48 horas se sacaron los cassettes y se lavaron con agua corriente, se pasaron al Histoquinette en donde se resguardaron por 24 horas.

Proceso:

1. Se deshidrataron las muestras para extraer el agua de los tejidos y el solvente actuara correctamente.

Tabla 3. Deshidratadores de los Tejidos.

Deshidratadores	Tiempo de duración de las muestras en c/u
Alcohol al 70%.	8 horas
Alcohol al 80%.	8 horas
Alcohol al 96%.	1 hora
Alcohol al 100%.	1 hora

2. Los tejidos se pasaron a las soluciones de aclaración o diafanización que permitían la solubilidad de la parafina.

Tabla 4. Aclaradores de los Tejidos.

Aclarante	Tiempo de duración de las muestras en c/u
Alcohol/Xilol (50:50)	1 hora
Xilol Puro	1 hora
Xilol Puro	1 hora

3. Por último se preincluyeron en baños de parafina.

Tabla 5. Líquidos de preinclusión de los tejidos.

Pre inclusiones	Tiempo de duración de las muestras en c/u
Parafina 1	1:30 hora y media
Parafina 2	1:30 hora y media

Nota: Cada una de las soluciones estaba vertida en una especie de jarra que forma parte del histoquinette y por un mecanismo giratorio automático va cambiando de solución después del tiempo establecido anteriormente, los tejidos siempre permanecieron en el cassette.

Una vez terminado el proceso en el histoquinette los tejidos se extrajeron del cassette y se pasaron a la inclusión final para formar los bloques de donde se extraían los cortes.

- Se colocaron los recipientes con parafina sólida en la estufa a 70°C y se dejaron por 5 a 10 minutos para que se hiciera líquida.

-Se prepararon los moldes de metal en los cuales se colocó el tejido orientado de forma correcta.

-Se vertió la parafina líquida en el molde con el tejido, se aplicó una ligera presión y se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se llevaron al refrigerador para que se solidificaran por completo de forma homogénea.

.-Una vez solidificado se extrajo el bloque del molde de metal y se le retiró el excedente que quedaba a los lados.

-Finalmente el bloque quedó listo.

IV. Microtomía:

- Antes de realizar los cortes en el micrótopo los bloques, éstos se metieron al congelador para que las secciones del tejido fueran uniformes.

-Posteriormente se realizaron los cortes a 4µm.

-Se desprendieron del micrótopo con la ayuda de un estilete y con mucho cuidado se pasaron a baño maría por flotación a 45°C para realizar su extensión.

-De inmediato se colocó cada corte por individual en una laminilla con especial cuidado para evitar romper el tejido. Se dejaron secar a temperatura ambiente por un día.

-Posteriormente se procedió a realizar la tinción convencional de H&E.

5.3.2. Tinción Convencional con Hematoxilina y Eosina (H&E):

V. Coloración o tinción:

En una gradilla metálica se colocaron las laminillas que contenían la piel sana, el melanoma y el riñón y se pasaron a procesar en el tren de tinción de H&E.

1. Se desparafinaron los tejidos sumergiendo la gradilla en xilol puro por 5 minutos.

2. Se hidrataron en baños decrecientes de alcohol:
 - Alcohol/xilol por 2 minutos.
 - Alcohol al 100% por 2 minutos.
 - Alcohol al 96% por 2 minutos.
 - Finalmente se enjuagaron en agua destilada por 2 minutos.
3. Se pasaron a la hematoxilina por 3 minutos para colorear los núcleos de las células.
4. Se lavaron con agua de la llave por 1 minuto.
5. Se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
6. Se pasaron al alcohol ácido haciendo una inmersión rápida para eliminar el exceso de colorante.
7. Se lavaron con agua destilada por 2 minutos.
8. Se realizó una inmersión rápida en agua amoniacal en donde se viraba el color azul.
9. Se lavaron en agua destilada por 1 minuto.
10. Se pasaron a la eosina por 30 segundos para la coloración del citoplasma y material extracelular.
11. Se deshidrataron en alcoholes de forma creciente:
 - Alcohol al 96% 2 inmersiones.
 - Alcohol al 96% 2 inmersiones.
 - Alcohol al 100% 2 inmersiones.
 - Al alcohol/xilol por 2 minutos.
12. Se diafanizaron con otro baño de xilol por 2 minutos.
13. Se pasaron nuevamente a otro baño de xilol por 2 minutos.
14. Finalmente se realizó el montaje.

VI. Montaje:

Procedimiento:

Cada laminilla se sacó del xilol y se colocó una gota de entellan (pegamento) por encima del tejido teñido, se sumergió nuevamente al xilol para que el entellan se volviera menos acuoso y se colocó un cubre objetos con especial cuidado para evitar la formación de burbujas sobre el tejido al momento de la adhesión del cubreobjetos con la laminilla para que la observación de los tejidos al microscopio fueran claros y concisos.

Una vez realizado el montaje se dejaron secar por un día, posteriormente se procedió con su análisis.

VII. Observación al microscopio:

Se realizó la observación de cada tejido mediante el microscopio óptico, permitiendo ver a detalle cada estructura que constituían los tejidos y con la ayuda de los expertos en la materia realizamos el diagnóstico de cada uno. El análisis de cada tejido es mostrado en los resultados.

5.4. Técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en muestras de piel sana, melanoma y riñón de equino:

La técnica diagnóstica empleada para la detección, interpretación y cuantificación de ambas proteínas se realizó en la Facultad de Medicina, en el Departamento de Histología, bajo la asesoría del Dr. Adolfo Soto Domínguez.

Esta técnica se da en dos fases:

1- La preparación de los tejidos sobre las laminillas.

Dentro de esta fase se desarrolló la fijación de los tejidos y el procesamiento de mismos.

2. La interpretación y la cuantificación en base a la expresión obtenida de las proteínas WT1 y PPAR- β/δ .

Aquí se obtienen los resultados concluyentes de este estudio.

5.4.1. Procedimiento de fijación de los tejidos:

-Las laminillas fueron tratadas previamente con poli-L-lisina para formar una membrana como medio de adherencia o pegamento para los tejidos: en recipientes estériles se colocaron 72ml de agua destilada y 8ml de poli-L-lisina, se sumergieron las laminillas por 5 minutos, se secaron a temperatura ambiente por un día, tiempo después del cual estaban listas para ser utilizadas.

-Para la obtención de los cortes se utilizaron los cubos previamente procesados en la técnica histológica.

-Se realizó el corte de los tejidos a 4µm en el micrótopo (Microm HM 315 Micotome, GMI, EUA).

-Se pasaron a baño maría por flotación a 45°C (Modelo 14792, Boekel Scientific, EUA). Antes de recolectarlos, en las laminillas se colocó otro pegamento denominado RubAdol para que los tejidos fueran reforzados en conjunto con la poli-L-lisina y quedaran perfectamente adheridos a la laminilla evitando que los tejidos se desprendieran durante el procedimiento de la técnica.

-Una vez puesto el pegamento en la laminilla fue esparcido y antes de que se secase se recolectaron los tejidos, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por un día y posteriormente se realizó la técnica de IHQ.

5.4.2. Técnica de Inmunohistoquímica:

Anticuerpos utilizados: Para la detección de la proteína de WT1, se utilizó el anticuerpo primario policlonal WT1-C19 y un anticuerpo secundario anti-conejo, para la detección de la proteína PPAR-β/δ se utilizó el anticuerpo primario policlonal C20 y un anticuerpo secundario anti-cabra, todos adquiridos de Santa Cruz Biotenhnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA.

Procedimiento:

1. Desparafinización de los tejidos a 60°C durante 20 minutos, cuidando que no se aumente demasiado la temperatura para no tener problemas con la identificación de los antígenos.
2. Hidratación de los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xilol por 5 minutos (2 cambios).
 - Etanol absoluto por 3 minutos.
 - Etanol 95 % por 3 minutos.
 - Etanol 70 % por 3 minutos.
 - Agua destilada por 3 minutos.
 - Por último la Solución Tris-buffer salino buffer salino + Tween 20 (TBST) por 3 minutos.
3. Exposición de los antígenos con solución TRS (Target Recovery Solution), introduciendo las laminillas en jarras koplín de plástico que se quedan abiertos en una olla de vapor a baño María durante 60 minutos a 100 °C.

4. Bloqueo con la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3 % por 10 minutos.
5. Lavado en solución buffer TBST de 3-5 minutos (2 veces).
6. Aplicación del bloqueador de las proteínas endógenas del kit (Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHQ kit, abcam, EUA) por 30 minutos. Para la proteína WT1 se utilizó suero de cabra y para la proteína de PPAR-β/δ se utilizó suero de conejo. Estos se diluyeron de la siguiente forma: 480μl de cada suero en 1920μl de PBS.
- 7.- Escurrir solamente (NO lavar)
- 8.- Añadir el anticuerpo primario (C-19 para WT1 y C-20 para PPAR-β/δ) dejándose incubar toda la noche a 4 °C. Para WT1 se empleó una dilución de 1:100 y para PPAR-β/δ fue de 1:400.
** Para los controles negativos se omite el anticuerpo primario y se añade en su lugar TBST.*
- 9.- Al día siguiente se lavaron en TBST de 3-5 minutos (2 veces).
- 10.- Se añadió el anticuerpo secundario respectivo para cada proteína: un anti-conejo para WT1 diluido 1:50 y un anti-cabra para PPAR-β/δ diluido 1:200, se dejaron incubar por 30 min.
- 11.- Se lavaron en TBST de 3-5 minutos.
- 12.- Se añadió la solución de estreptavidina-HRP y se dejó incubar durante 30 min.
- 13.- Lavado en TBST e 3-5 minutos.
- 13.- Revelado con solución de sustrato-cromógeno DAB (3´3-diaminobencidina) al 5% de 7-10 minutos.

Contratinción:

- 1.- Se lavaron en agua destilada por 2 minutos (3 veces).
- 2.- Se contrastó con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 minutos.
- 3.- Se lavó con agua corriente.
- 4.- Se enjuagaron en agua destilada.
- 5.- Se deshidrataron gradualmente con:
 - Etanol 70 %, 2 cambios.
 - Etanol 95 %, 2 cambios.
 - Etanol 100 %, 2 cambios.

- Xilol 2 cambios.

6.- Se limpió el exceso de xilol,

7.- Finamente se montaron con entellan y almacenaron en oscuridad.

5.5. Interpretación:

Se realizó el análisis de cada una de las proteínas en los distintos tejidos por el experto en la materia a partir de microscopia óptica, utilizando una cámara PowerShotG10MR (Canon, Japón)., obteniendo los resultados a partir de la comparativa con los controles positivos y negativos.

5.6. Métodos de Cuantificación:

Se emplearon dos métodos: el Densitométrico que se basa en medir la intensidad de positividad de expresión y el Morfométrico que muestra con exactitud el número de células positivas, ambos fueron utilizados bajo el mismo Software (ImageJ) a partir de un triplicado de imágenes.

5.7. Análisis estadístico:

Se utilizó el análisis estadístico T de Student con un intervalo de confianza del 95% para analizar la confiabilidad de los resultados obtenidos en las Inmunohistoquímicas, considerándose significativos con $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS:

6.1. Análisis histológico de los tejidos de piel sana y riñón, e histopatológico de la muestras de melanoma, mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E):

6.1.1. Piel sana:

Al analizar el tejido epitelial clasificado como sano, se observaron cada una de sus estructuras (Epidermis, Dermis, Folículo Piloso, Glándula Sebácea y Glándula Sudorípara), con buena conformación, así como una arquitectura normal, la cual puede observarse en la Fig. 7.

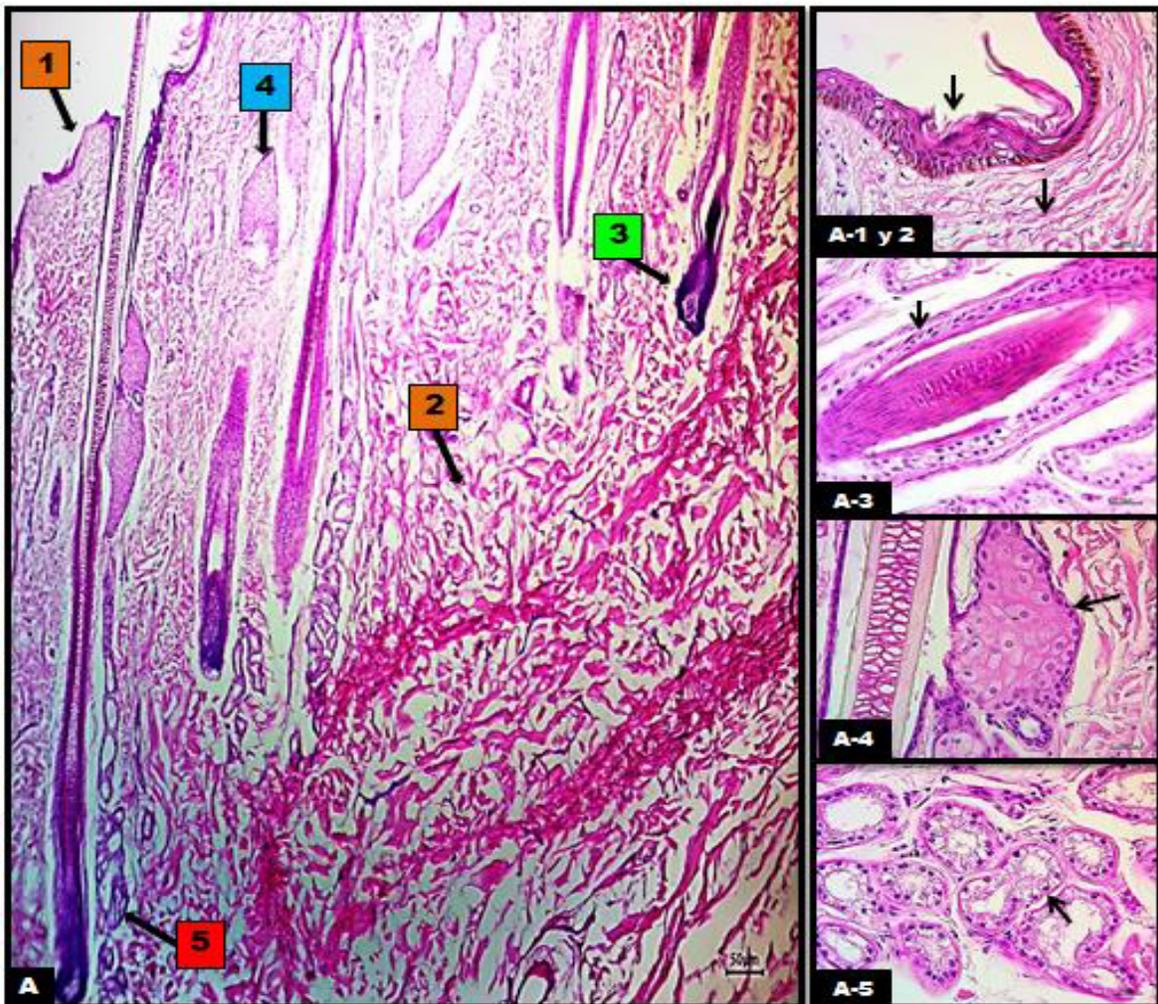


Figura 7. Fotomicrografías de la histología de piel sana de equino: A), Epidermis y Dermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). A1y A2) Epidermis y Dermis (flecha), A3) Folículo piloso (flecha), A4) Glándula sebácea (flecha), A5) glándula sudorípara (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. (H&E). Barra: 50 µm.

6.1.2. Melanoma:

Para corroborar el diagnóstico presuntivo de melanoma, se realizó el análisis histopatológico de las muestras de melanoma en piel y ganglio, mediante la tinción convencional con H&E.

Se analizó la arquitectura de cada tejido y en piel se observó gran cantidad de focos de células tumorales infiltrados en la dermis y algo en la epidermis, (Fig. 8). Por otro lado en ganglio también se observó la presencia de gran cantidad de focos de células tumorales, como se muestra en la Fig. 9. Con estos datos obtenidos, se confirmó el diagnóstico presuntivo de la patología de melanoma.

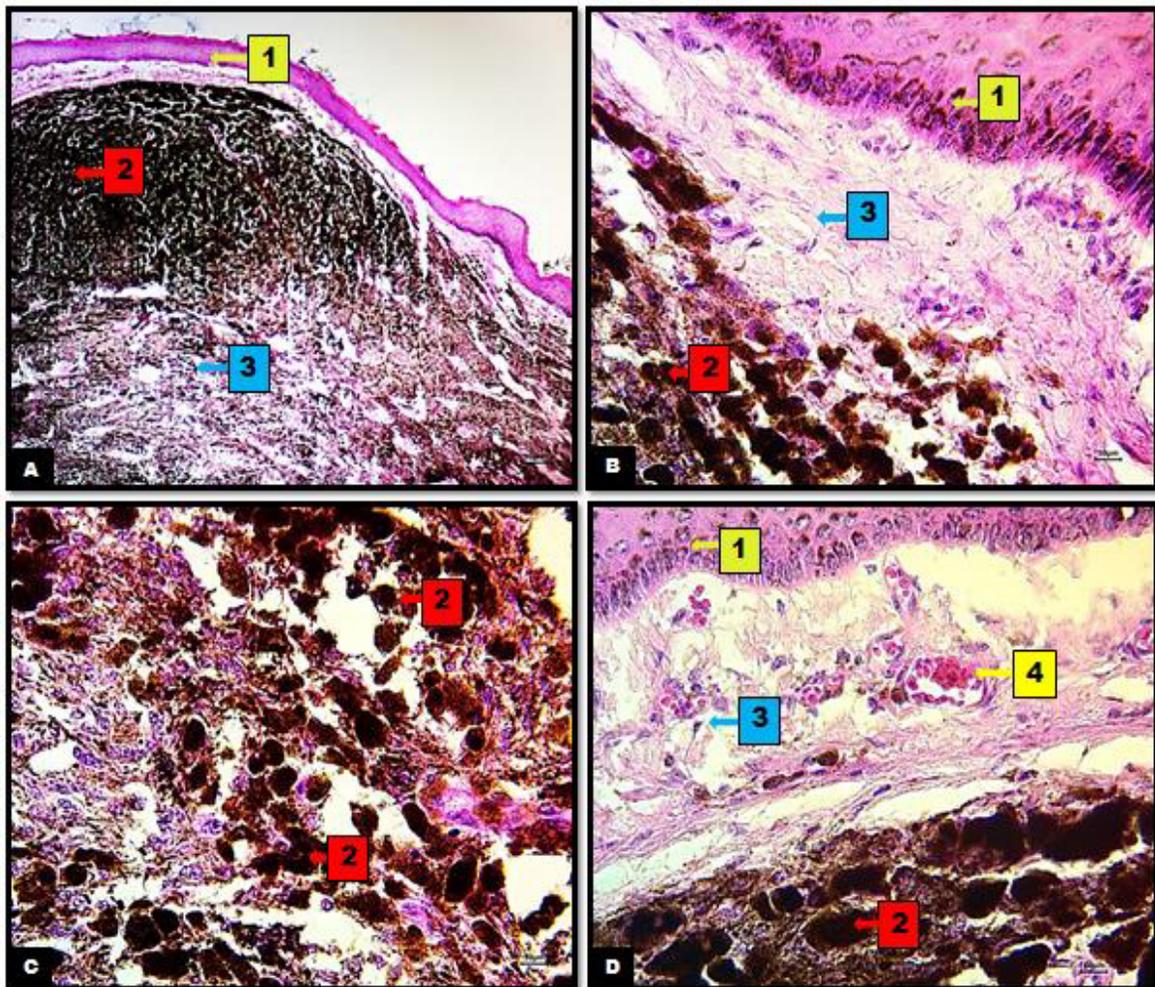


Figura 8. Fotomicrografías de la histología de melanoma en piel de equino: A), Epidermis (1), Focos de células tumorales (2), Dermis (3). **B)** Mismos elementos que A. **C)** Focos de células tumorales (2). **D),** Epidermis (1), Focos de células tumorales (2), Dermis (3), Vaso sanguíneo (4). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. H&E. Barra: 50 µm.

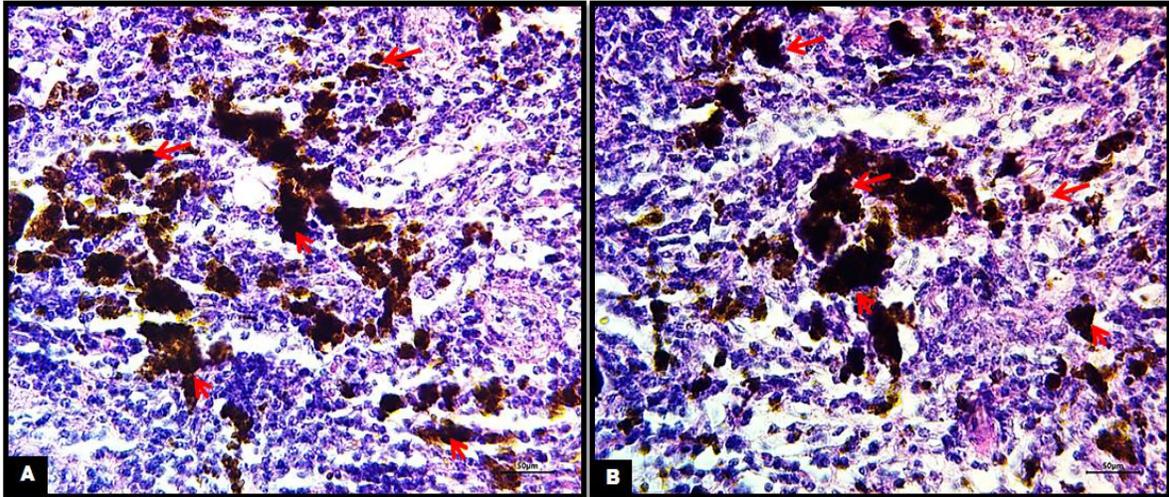


Figura 9. Fotomicrografías de la histología de melanoma en ganglio de equino: A) y B) Focos de células tumorales (flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. H&E. Barra: 50 µm.

6.1.3. Riñón:

Se analizaron las estructuras conformacionales de las muestras de riñón, las cuales mostraron una arquitectura normal, como se aprecia en la Fig. 10.

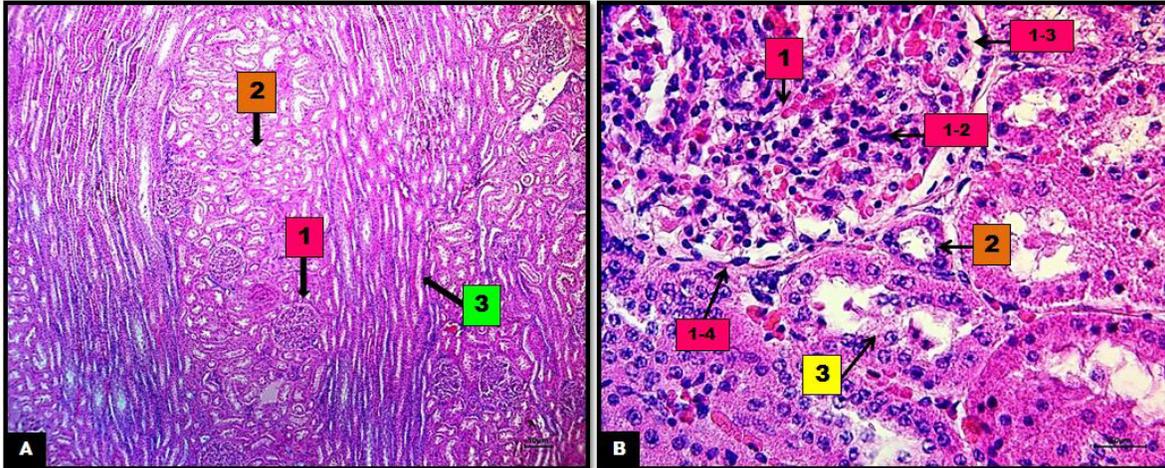


Figura 10. Fotomicrografías de la histología normal de riñón de equino: A), Glomérulo (1), Túbulos contorneados distales (2), Túbulos colectores (3). B), Glomérulo (1), Podocitos glomerulares (1-2), Espacio urinario (1-3), Cápsula de Bowman (1-4), Túbulos contorneados proximales (2), Túbulos contorneados distales (3). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. H&E. Barra: 50 µm.

6.2. Análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ), utilizando el revelado con Diaminobencidina (DAB):

6.2.1. Resultados de la proteína de WT1 en Piel Sana:

Para las muestras de piel sana se observó la positividad de la expresión de la proteína de WT1, localizada en Epidermis, Folículo piloso, Glándula sebácea y Glándula sudorípara, como se muestra en la Fig. 11.

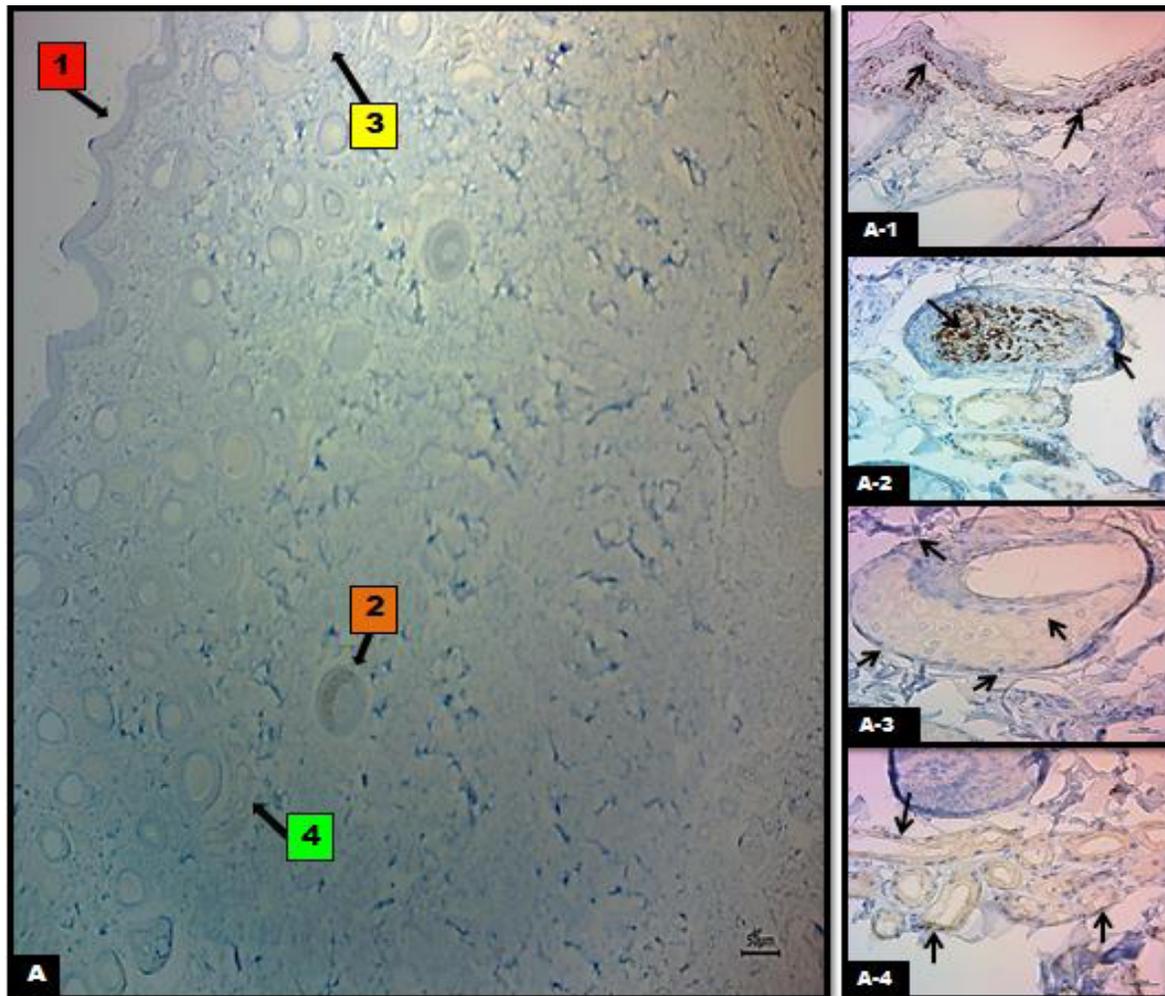


Figura 11. Fotomicrografías de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). A1) Epidermis (positividad-flechas), A2) Folículo piloso (positividad-flechas), A3) Glándula sebácea (positividad-flechas), A4) Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.2.2. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Piel:

Al analizar las muestras de melanoma en piel, se observó que debido a la coloración de la melanina con relación a la coloración que nos da el revelador (DAB), no es posible discriminar entre una posible positividad o bien corroborar específicamente que son negativas a la expresión de la proteína de WT1 en esta patología, como se muestra en la Fig. 12.

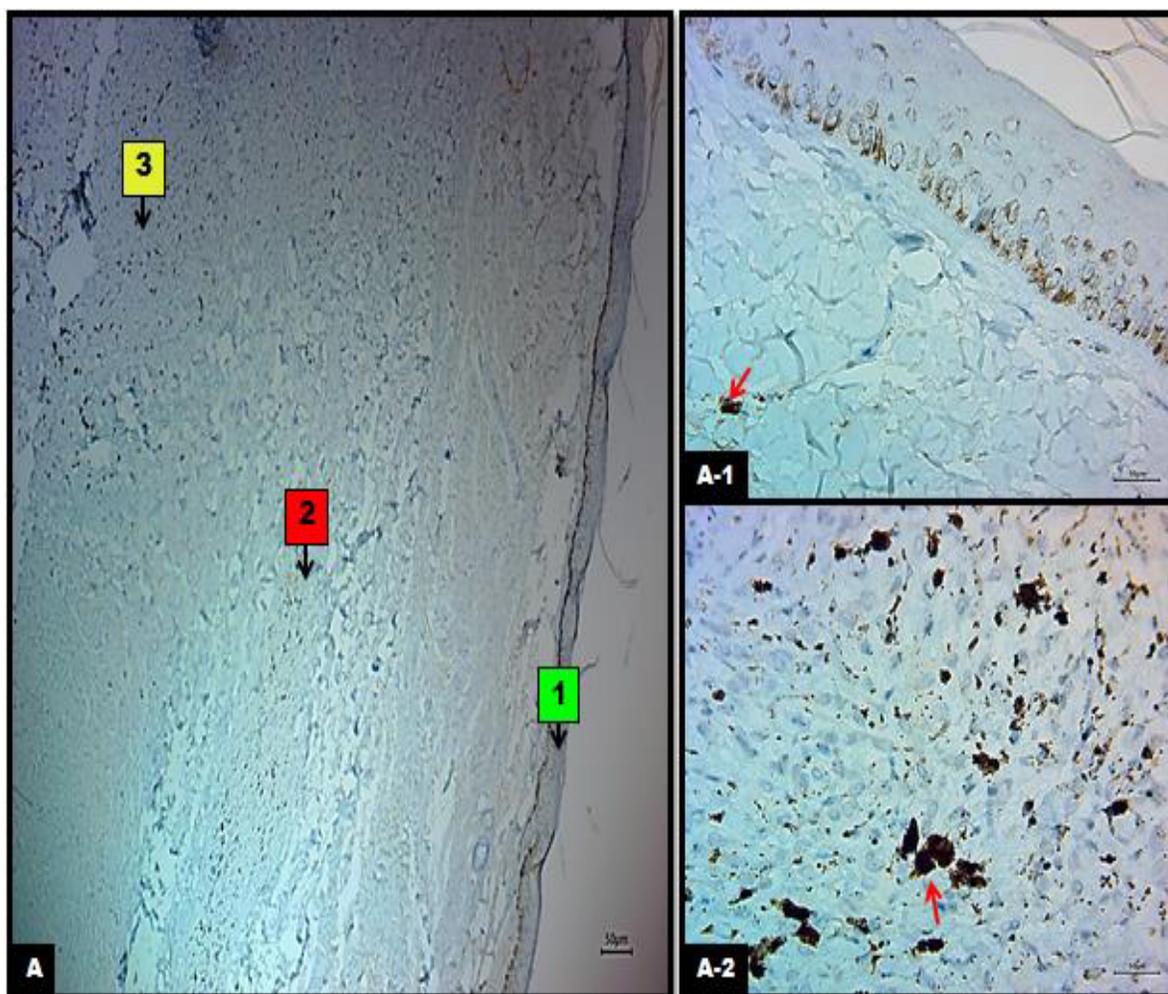


Figura 12. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Epidermis (1), Dermis (2), Focos de células tumorales (3). A1) y A2) Células tumorales con melanina (flechas). Es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μm.

6.2.3. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Ganglio:

Al analizar las muestras de melanoma en Ganglio, también se observó que debido a la coloración de la melanina con relación a la coloración que nos da el revelador (DAB), no es posible discriminar entre una posible positividad o bien corroborar específicamente que son negativas a la expresión de la proteína de WT1 en esta patología, como se muestra en la Fig. 13.

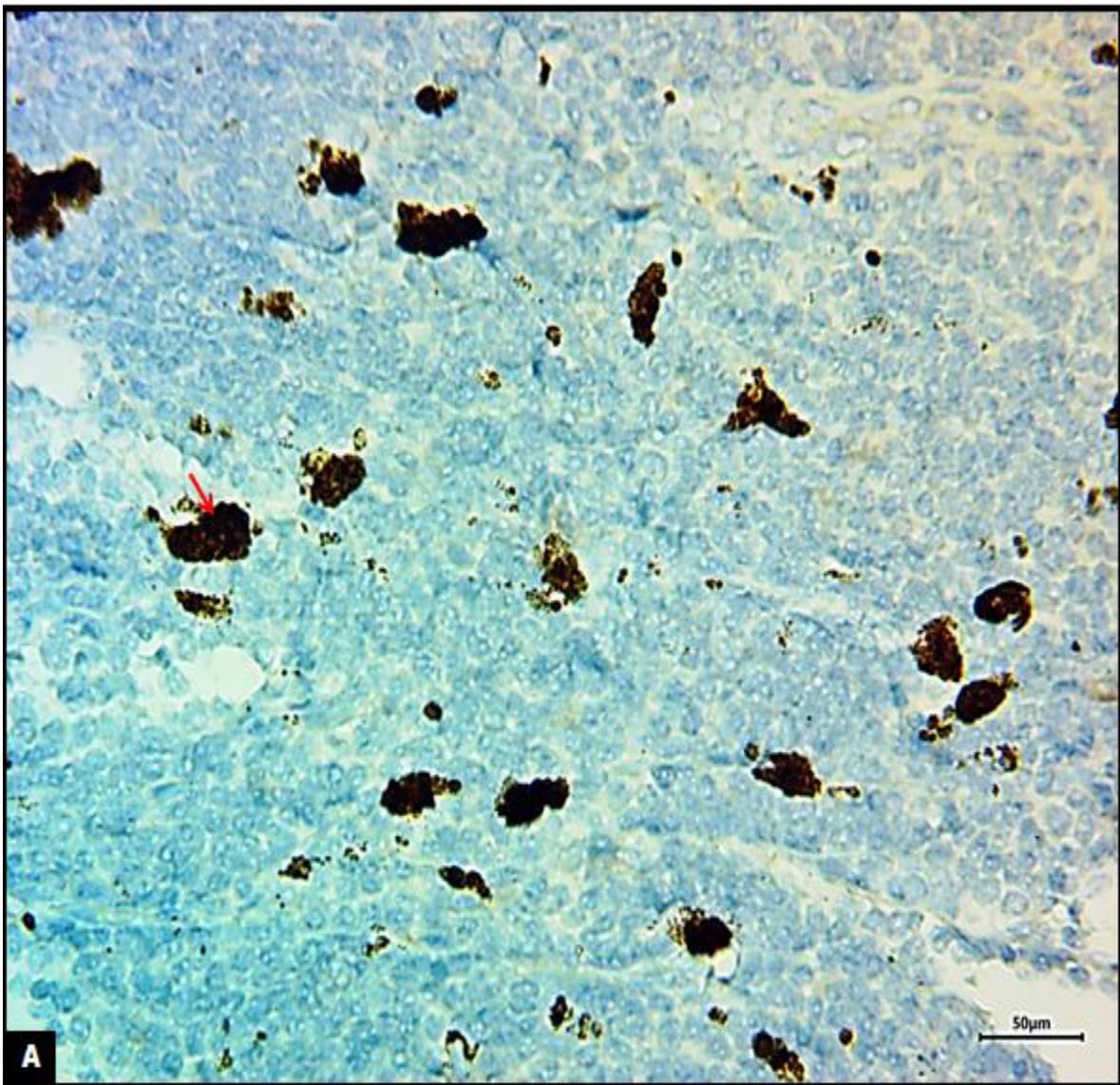


Figura 13. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A) Focos de célula tumorales con melanina (flecha). Es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.2.4. Resultados de la proteína de WT1 en Riñón:

Para estandarizar la técnica de IHQ para la proteína de WT1, utilizando DAB como revelador, se utilizaron muestras de riñón las cuales fueron analizadas como un control interno positivo de expresión para la proteína de WT1.

Se observó positividad en los glomérulos renales y en los túbulos contorneados proximales y distales, como se muestra en la Fig. 14.

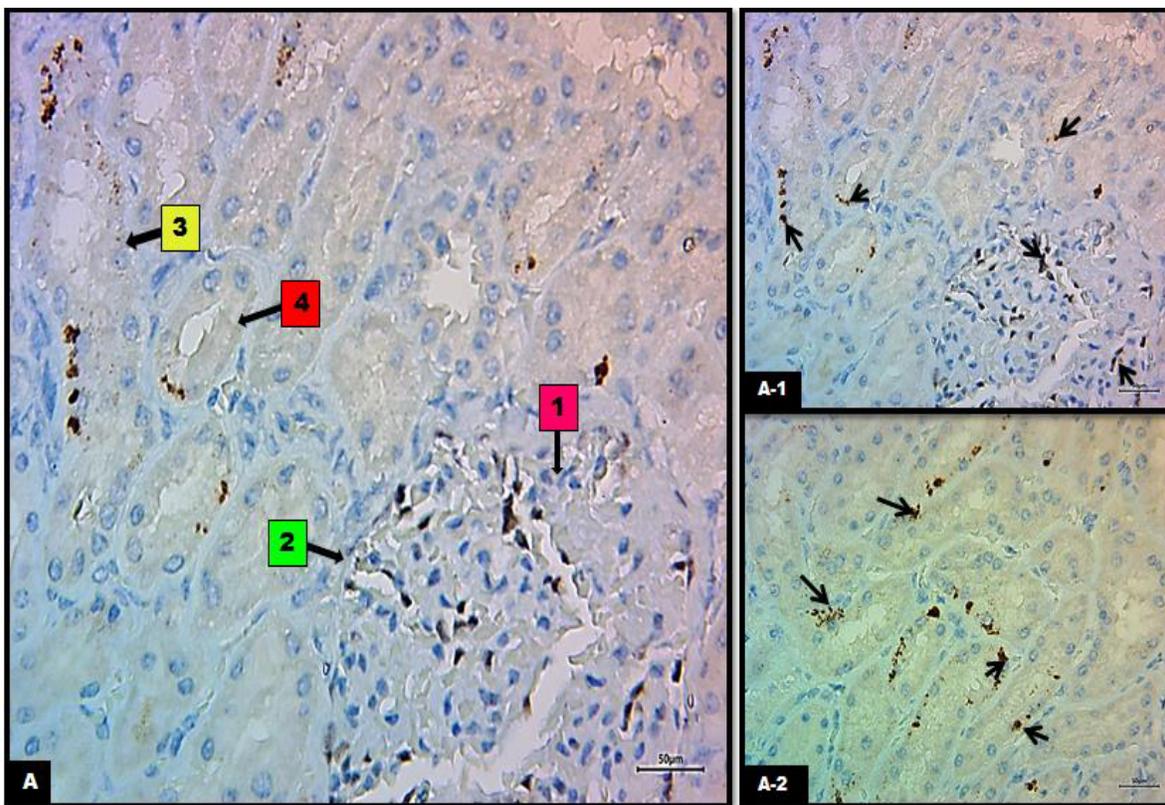


Figura 14. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Glomérulo (1), Capsula de Bowman (2), Túbulos contorneados proximales (3), Túbulos contorneados distales (4). **A1)** Se muestra positividad en glomérulo y túbulos contorneados proximales y distales (flechas), **A2)** Se muestra positividad en túbulos contorneados proximales y distales (flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 µm.

6.2.5. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Piel Sana:

Para las muestras de piel sana se observó la positividad de la expresión de la proteína de WT1, localizada en Epidermis, Folículo piloso, Glándula sebácea y Glándula sudorípara, como se muestra en la Fig. 15.

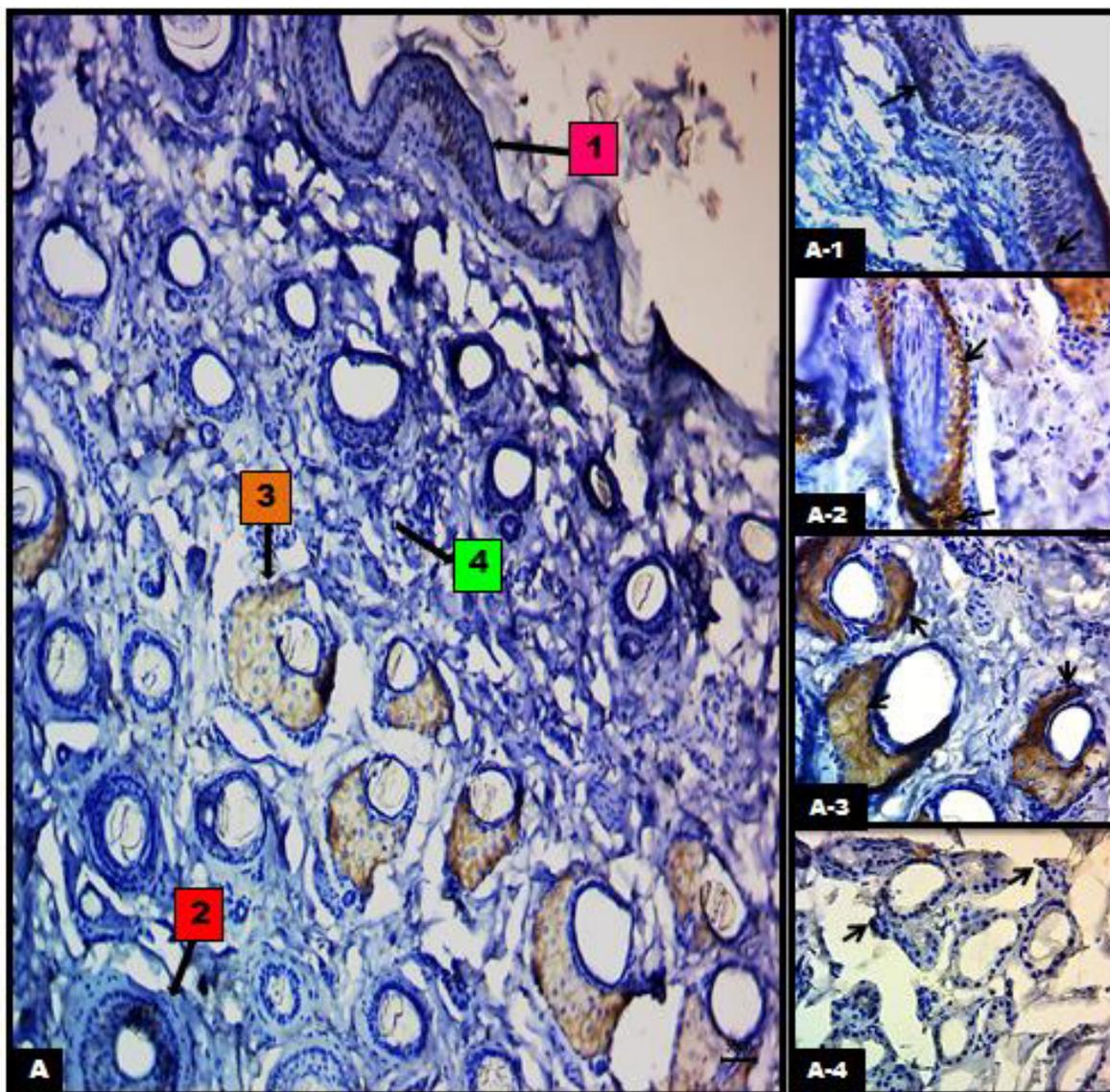


Figura 15. Fotomicrografías de piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : **A)** Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). **A1)** Epidermis (positividad-flechas), **A2)** Folículo piloso (positividad-flechas), **A3)** Glándula sebácea (positividad-flechas), **A4)** Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.2.6. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Piel:

Al analizar las muestras de melanoma en piel, al igual que las de WT1, se observó que debido a la coloración de la melanina con relación a la coloración que nos da el revelador (DAB), no es posible discriminar entre una posible positividad o bien corroborar específicamente que son negativas a la expresión de la proteína de PPAR- β/δ en esta patología, como se muestra en la Fig. 16.

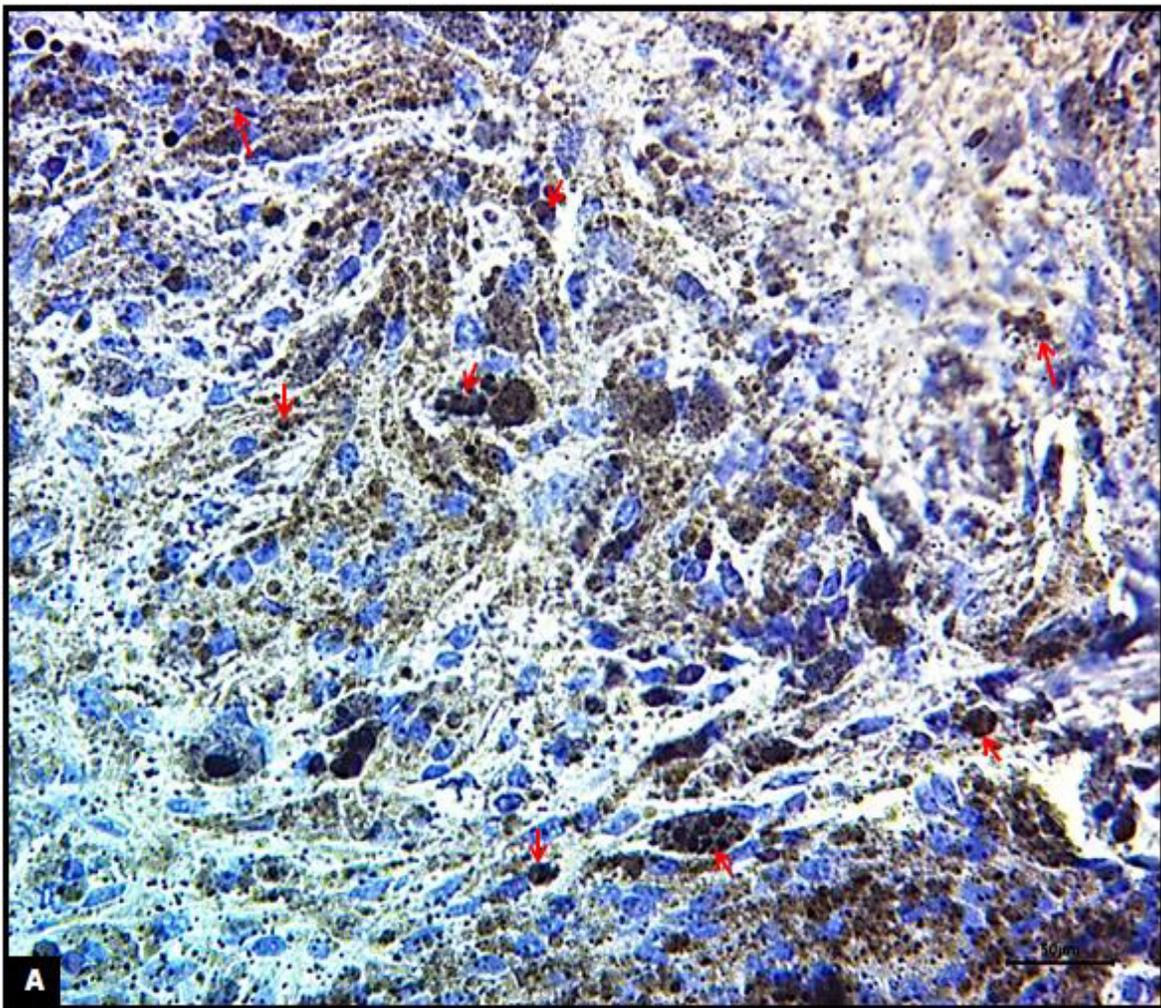


Figura 16. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A) Focos de células tumorales con melanina (flechas). Es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.2.7. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Ganglio:

Al analizar las muestras de melanoma en Ganglio, también se observó que debido a la coloración de la melanina con relación a la coloración que nos da el revelador (DAB), no es posible discriminar entre una posible positividad o bien corroborar específicamente que son negativas a la expresión de la proteína de PPAR- β/δ en esta patología, como se muestra en la Fig. 17.

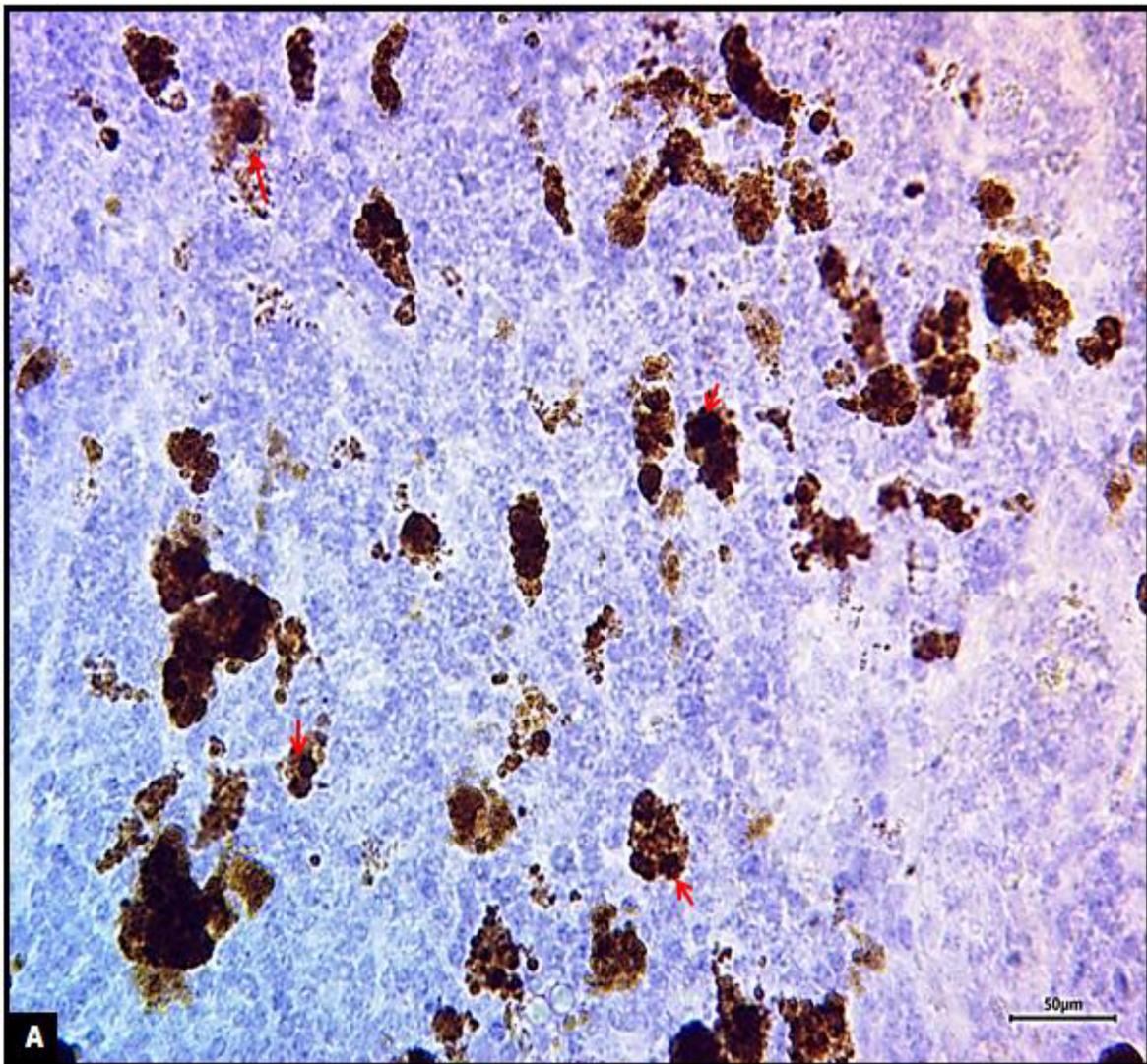


Figura 17. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A) Focos de células tumorales con melanina (flechas). Es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.2.8. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Riñón:

Para estandarizar la técnica de IHQ para la proteína de PPAR- β/δ , utilizando DAB como revelador, también se utilizaron muestras de riñón las cuales fueron analizadas como un control interno positivo de expresión para la proteína de PPAR- β/δ .

Se observó positividad en los glomérulos renales y en los túbulos contorneados proximales y distales, como se muestra en la Fig. 18.

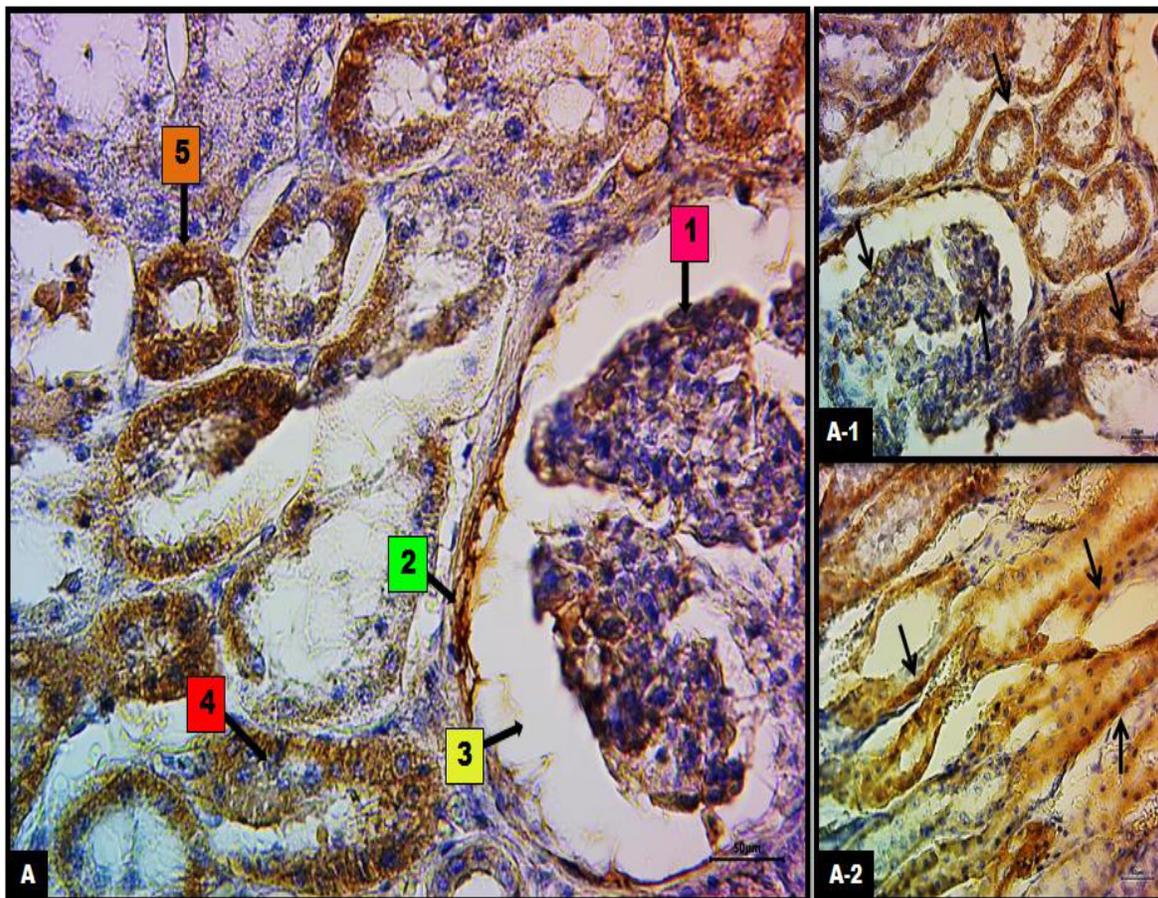


Figura 18. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A), Glomérulo (1), Espacio urinario (2), Capsula de Bowman (3), Túbulos contorneados proximales (4), Túbulos contorneados distales (5). A1) Se muestra positividad en glomérulo y túbulos contorneados proximales y distales (flechas), A2) Se muestra positividad en túbulos contorneados proximales y distales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB. Barra: 50 μ m.

6.3. Análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ), utilizando el revelado con Carbazol (EAC):

Este revelador fue utilizado con la finalidad de discriminar la melanina presente en el melanoma, corroborando así la presencia del marcaje positivo o negativo de la expresión de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ , debido a que con el revelado que se realizó con DAB no se lograba discriminar.

6.3.1. Resultados de la proteína de WT1 en Piel Sana:

Para las muestras de piel sana se identificó la presencia de la positividad de la expresión de la proteína de WT1, localizada en Epidermis, Folículo piloso, Glándula sebácea y Glándula sudorípara, como se muestra en la Fig. 19.

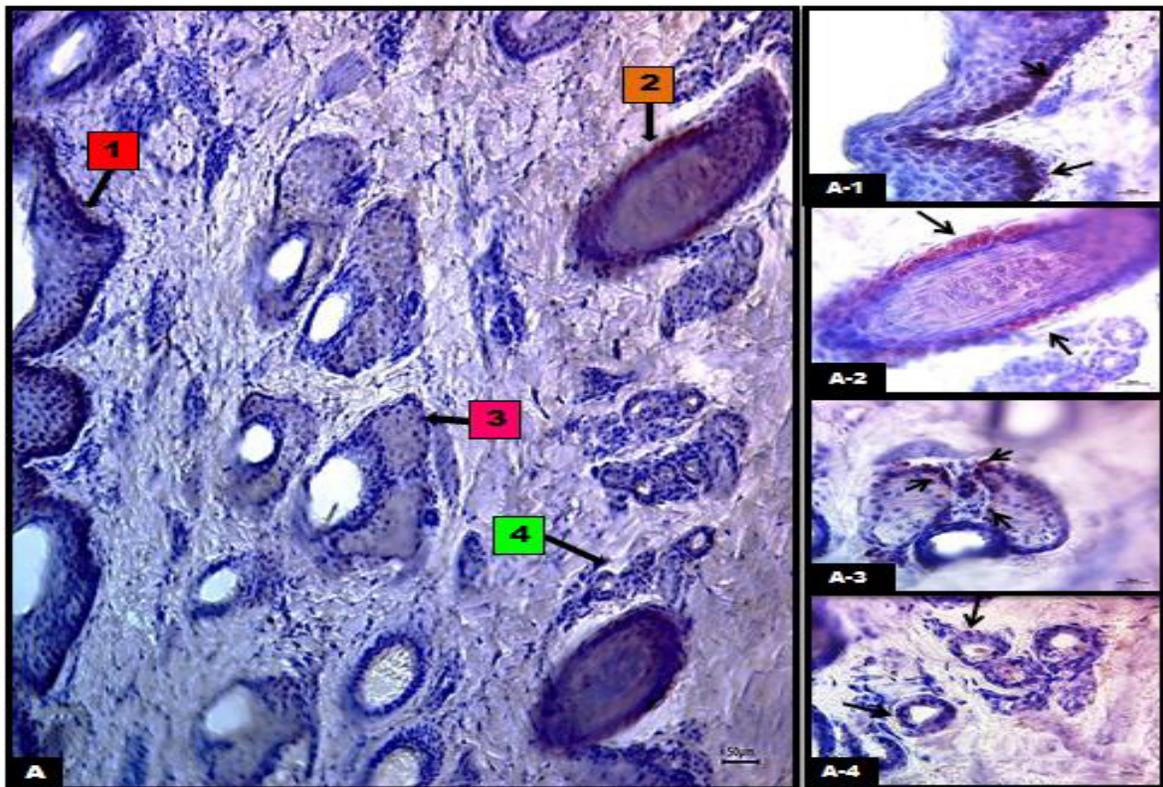


Figura 19. Fotomicrografías de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). A1) Epidermis (positividad-flechas), A2) Folículo piloso (positividad-flechas), A3) Glándula sebácea (positividad-flechas), A4) Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.

6.3.2. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Piel:

Al analizar las muestras de melanoma en piel, se observó que no hay presencia de la proteína de WT1 en las células tumorales, por lo que estos resultados sugieren que la expresión de esta proteína es negativa para esta patología, como se muestra en la Fig. 20.

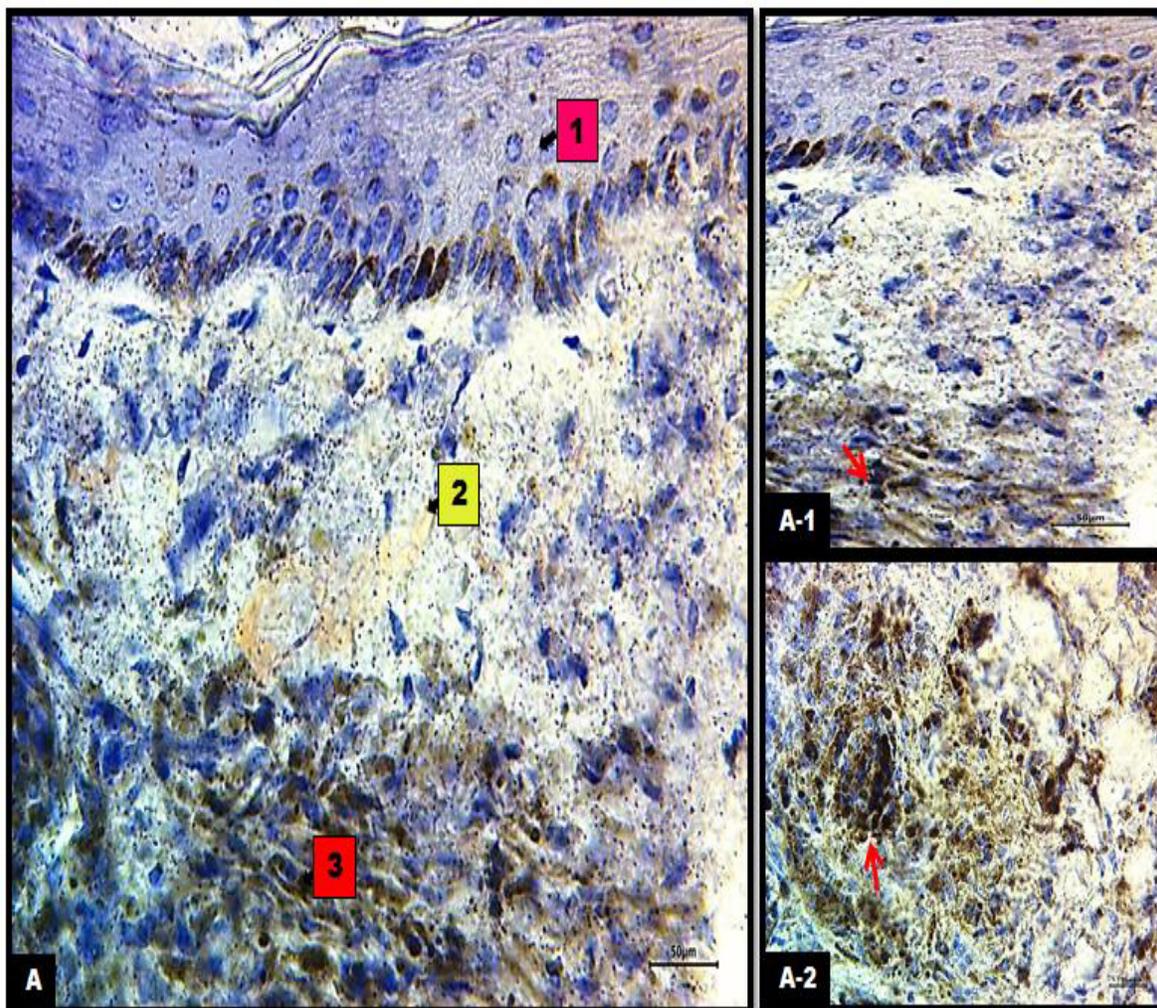


Figura 20. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Epidermis (1), Dermis (2), Focos de células tumorales (3). A1) y A2) Se observa que la proteína de WT1 es negativa en los focos de células tumorales (flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 µm.

6.3.3. Resultados de la proteína de WT1 en Melanoma en Ganglio:

Al analizar las muestras de melanoma en Ganglio, también se observó que no hay presencia de la proteína de WT1 en las células tumorales, por lo tanto al igual que el melanoma en piel, la expresión de esta proteína también es negativa para esta patología (Fig. 21).

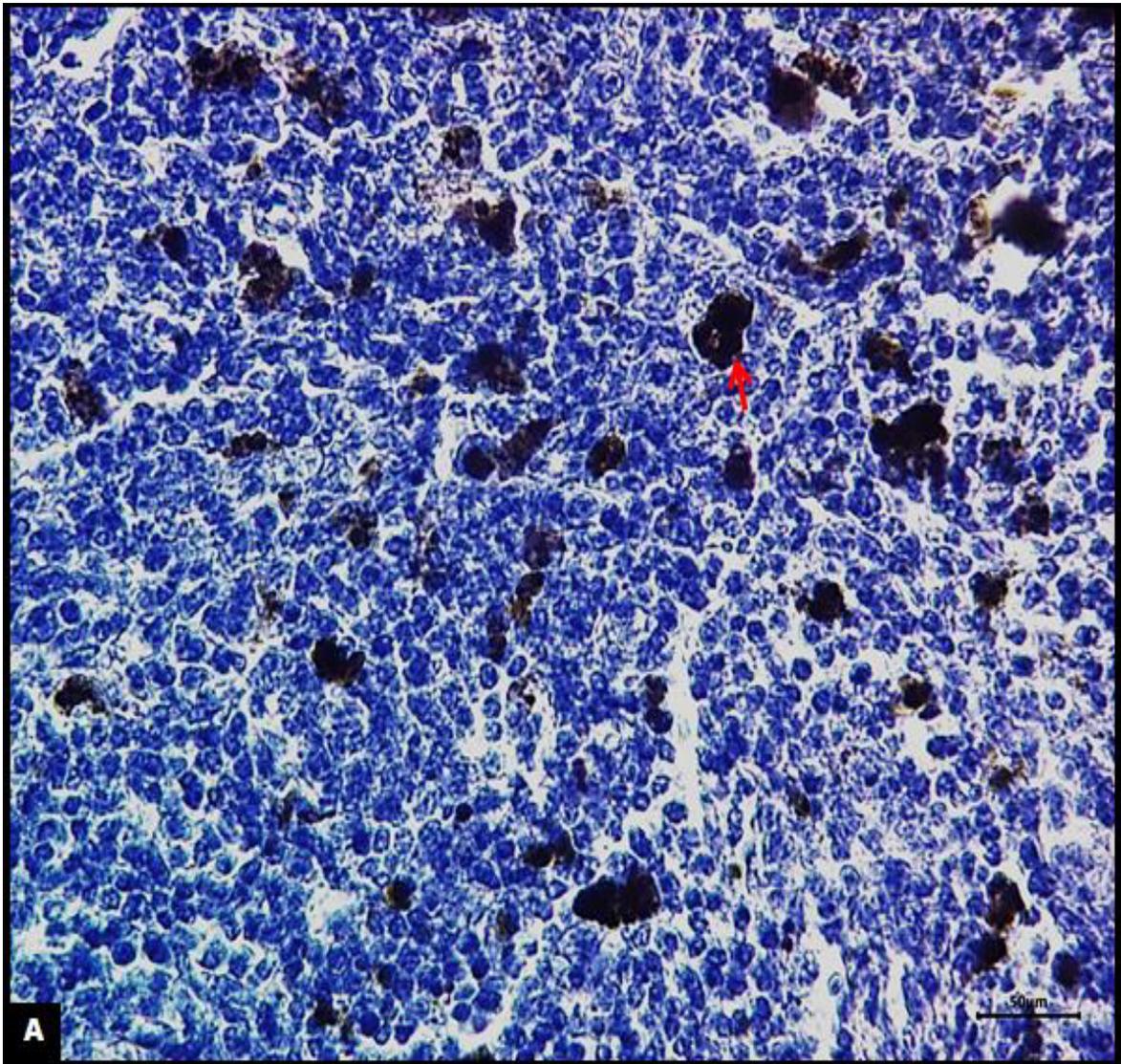


Figura 21. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A) Se observa que la proteína de WT1 fue negativa para los focos de células tumorales (flecha). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μm.

6.3.4. Resultados de la proteína de WT1 en Riñón:

Para estandarizar la técnica de IHQ utilizando Carbazol como revelador, las muestras de riñón fueron utilizadas para ser analizadas como un control interno positivo de expresión para la proteína de WT1.

Se observó positividad en los glomérulos renales y en los túbulos contorneados proximales y distales, como se muestra en la Fig. 22.

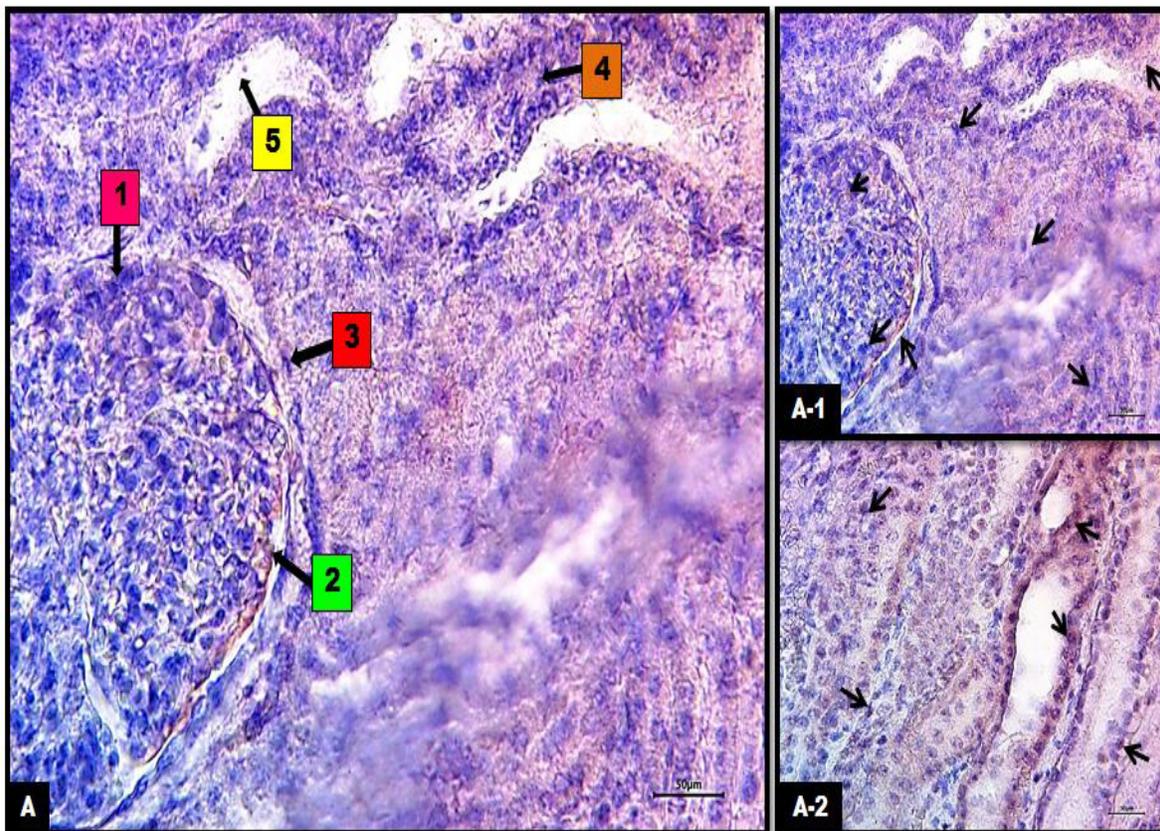


Figura 22. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1: A), Glomérulo (1), Espacio urinario (2), Capsula de Bowman (3), Túbulos contorneados proximales (4), Túbulos contorneados distales (5). A1) Se muestra positividad en glomérulo y túbulos contorneados proximales y distales (flechas), A2) Se muestra positividad en túbulos contorneados proximales y distales y túbulo colector (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. I Barra: 50 µm.

6.3.5. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Piel Sana:

Para las muestras de piel sana se identificó la presencia de la positividad de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ , localizada en Epidermis, Folículo piloso, Glándula sebácea y Glándula sudorípara, como se muestra en la Fig. 23.

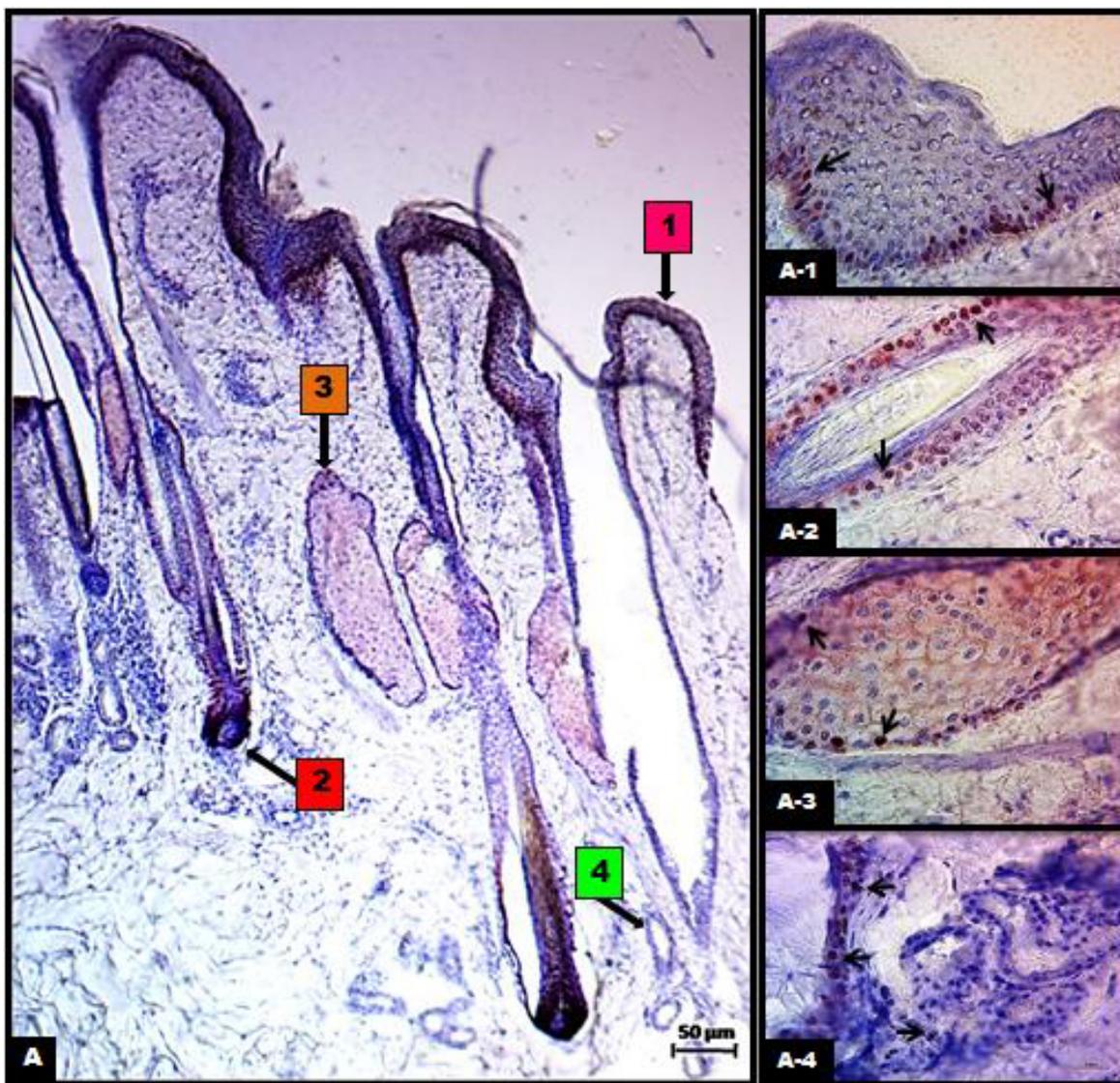


Figura 23. Fotomicrografías de piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A), Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). A1) Epidermis (positividad-flechas), A2) Folículo piloso (positividad-flechas), A3) Glándula sebácea (positividad-flechas), A4) Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.

6.3.6. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Piel:

Al analizar las muestras de melanoma en piel, se observó la presencia de la proteína de PPAR- β/δ en las células tumorales, por lo que estos resultados sugieren que la expresión de esta proteína es positiva para esta patología, como se muestra en la Fig. 24.

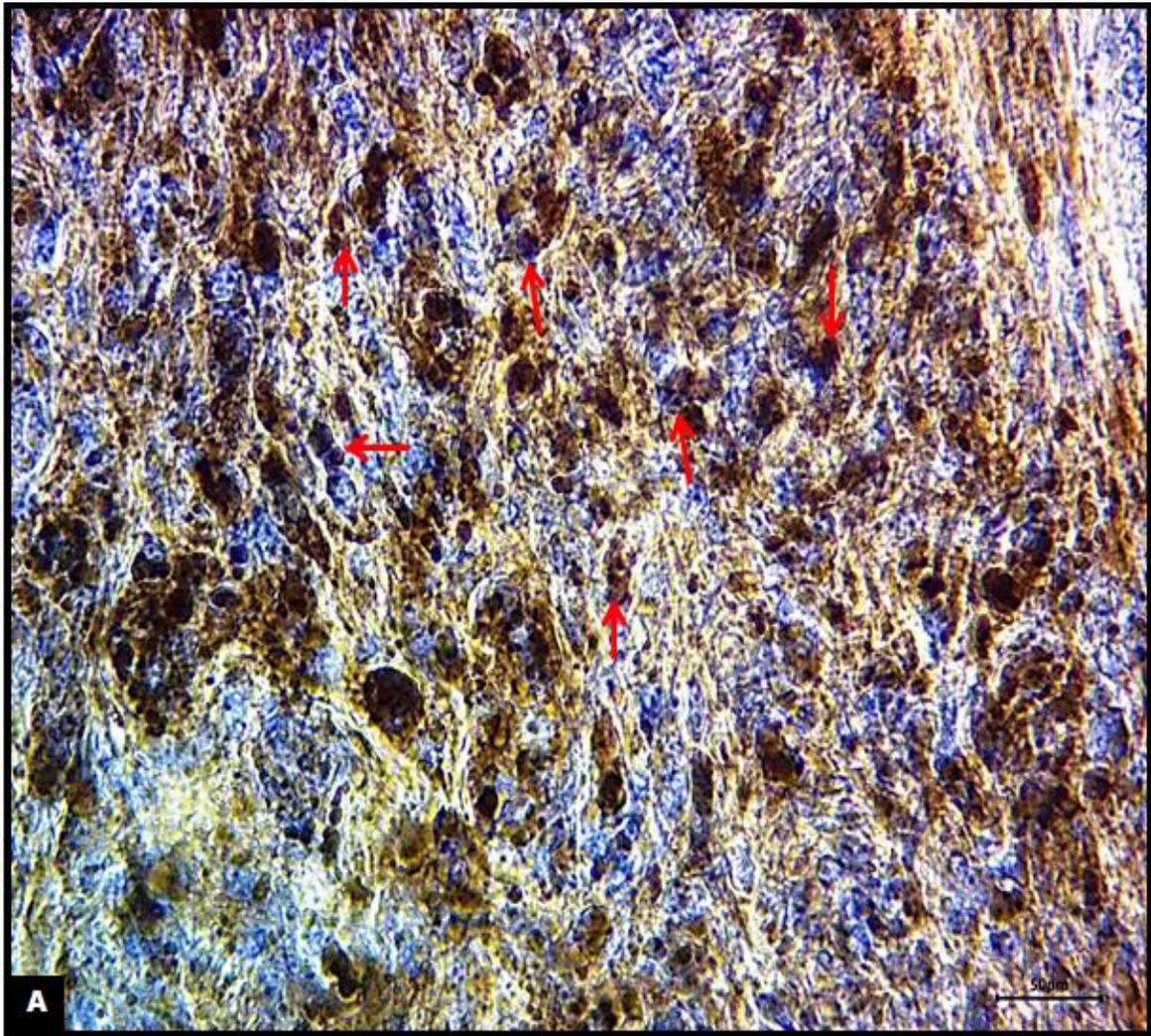


Figura 24. Fotomicrografías de melanoma en piel de equino para el análisis de la expresión de la localización de la proteína de PPAR- β/δ : A), Focos de células tumorales. Se observa que la proteína de PPAR- β/δ fue positiva para los focos de células tumorales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μm .

6.3.7. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Melanoma en Ganglio:

Al analizar las muestras de melanoma en Ganglio, también se observó que hay presencia de la proteína de PPAR- β/δ en las células tumorales, por lo tanto al igual que el melanoma en piel, la expresión de esta proteína también es positiva para esta patología (Fig. 25).

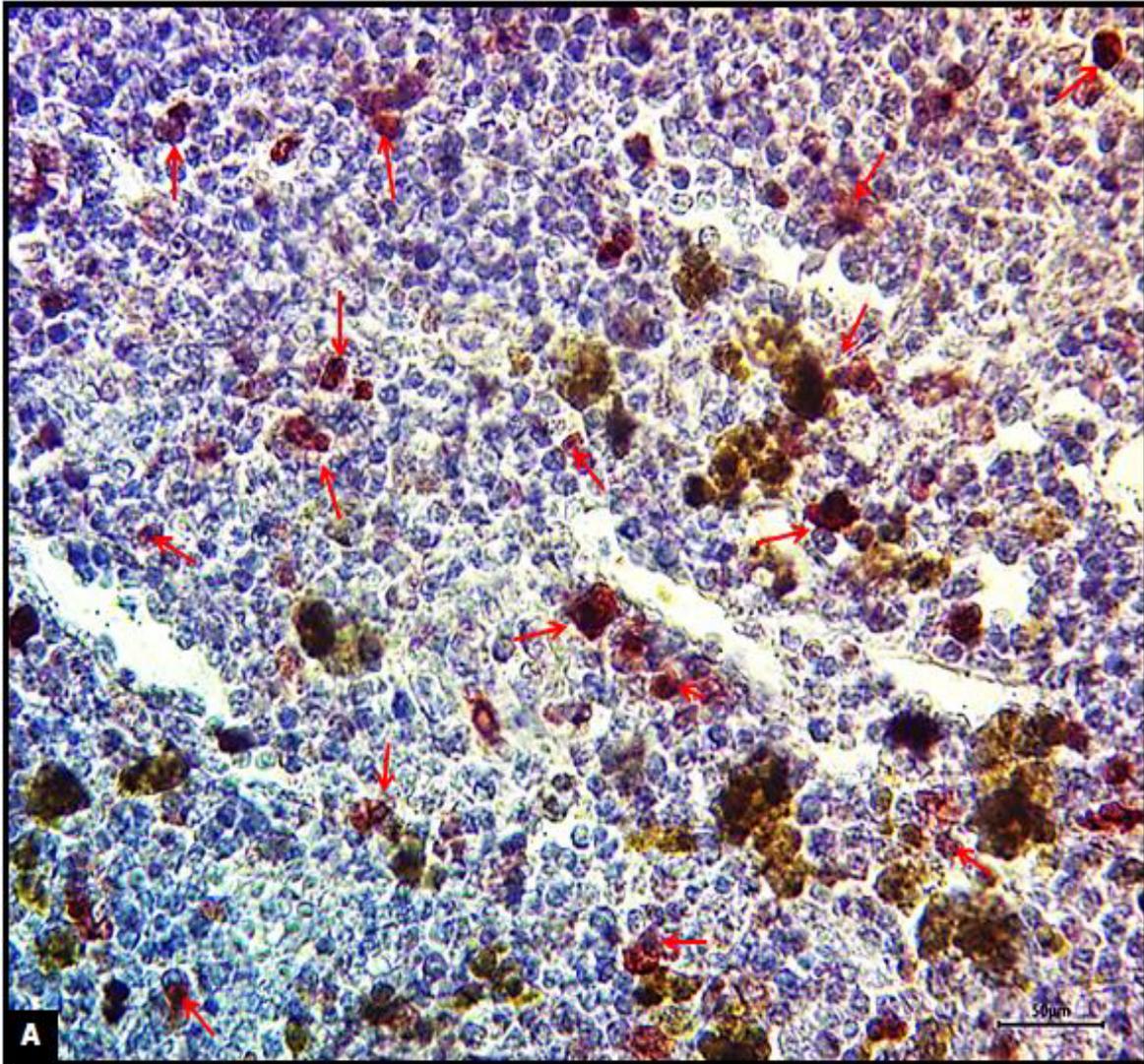


Figura 25. Fotomicrografías de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A) Se observa que la proteína de PPAR- β/δ fue positiva para los focos de células tumorales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.

6.3.8. Resultados de la proteína de PPAR- β/δ en Riñón:

Para estandarizar la técnica de IHQ utilizando Carbazol como revelador, también las muestras de riñón fueron utilizadas para ser analizadas como un control interno positivo de expresión para la proteína de PPAR- β/δ .

Se observó positividad en los glomérulos renales y en los túbulos contorneados proximales y distales, como se muestra en la Fig. 26.

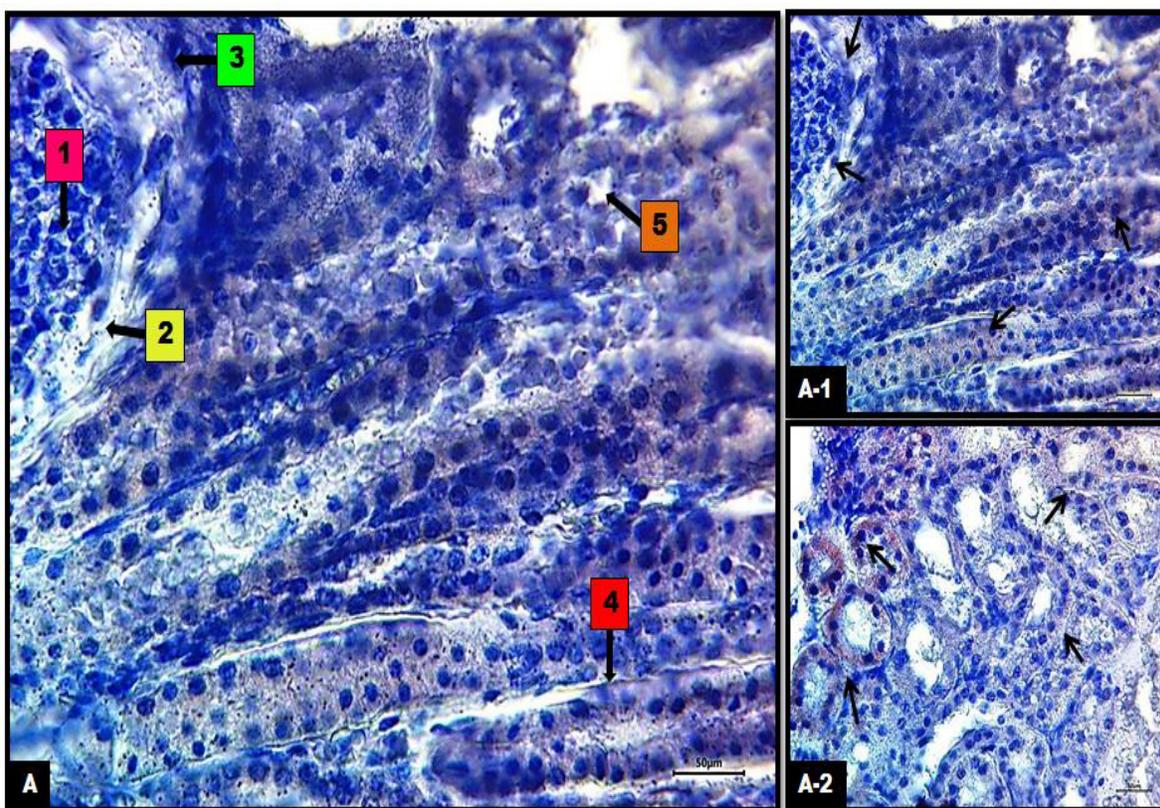


Figura 26. Fotomicrografías de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ : A), Glomérulo (1), Espacio urinario (2), Capsula de Bowman (3), Túbulos contorneados proximales (4), Túbulos contorneados distales (5). A1) Se muestra positividad en glomérulo y túbulos contorneados proximales y distales (flechas), A2) Se muestra positividad en túbulos contorneados proximales y distales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.

6.4. Análisis comparativo de los dos reveladores, Diaminobencidina (DAB) y Carbazol (EAC), para mostrar la localización de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma y riñón, por medio de la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ).

Con estos resultados comparativos mostramos como el revelador con Carbazol discrimina la melanina en relación a los resultados obtenidos con el primer revelador que utilizamos (DAB), corroborando con exactitud la presencia o ausencia de las proteínas en análisis para los distintos tejidos en estudio.

6.4.1. Comparativa de Piel Sana para la expresión de la proteína de WT1:

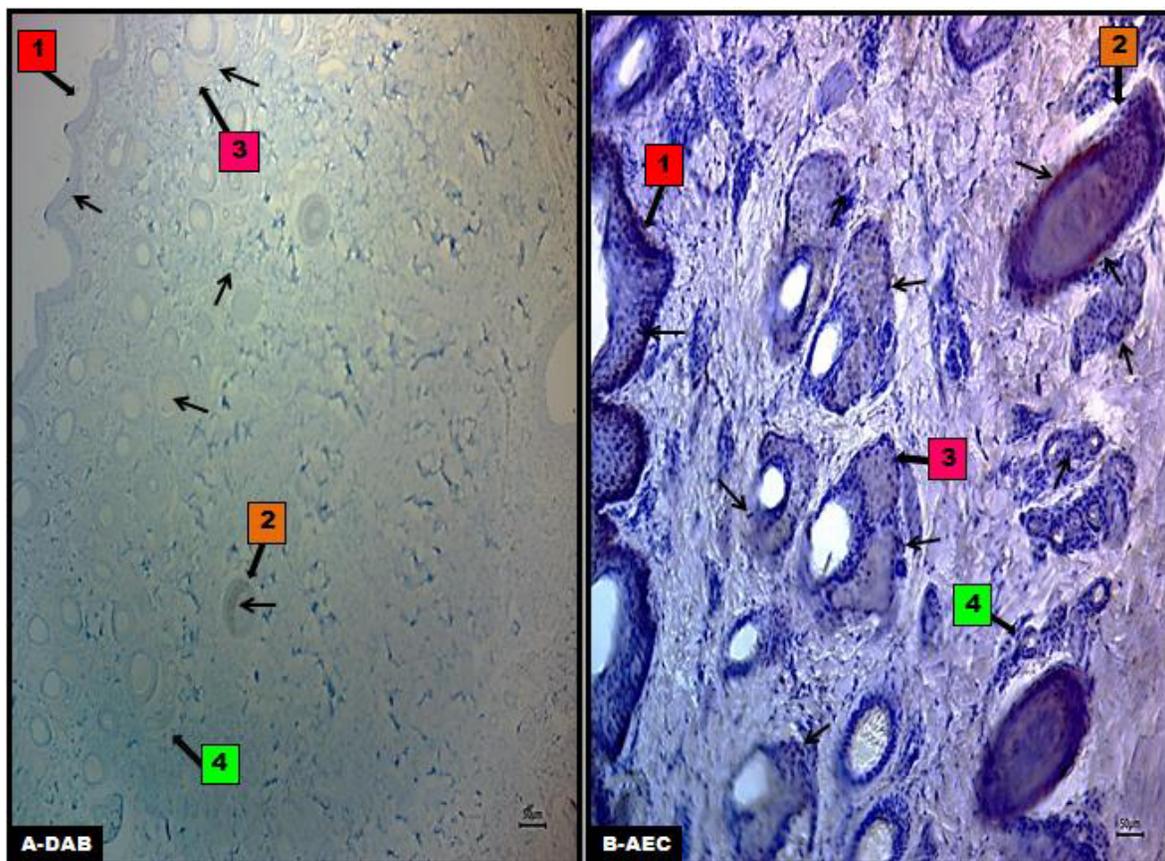


Figura 27. Fotomicrografías comparativas de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador: A) Piel revelada con Diaminobencidina. B) Piel revelada con Carbazol. A) y B), Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). Las flechas muestran la positividad de la proteína de WT1. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.

6.4.1.1. Comparativa de las estructuras de Piel sana para la expresión de la proteína de WT1:

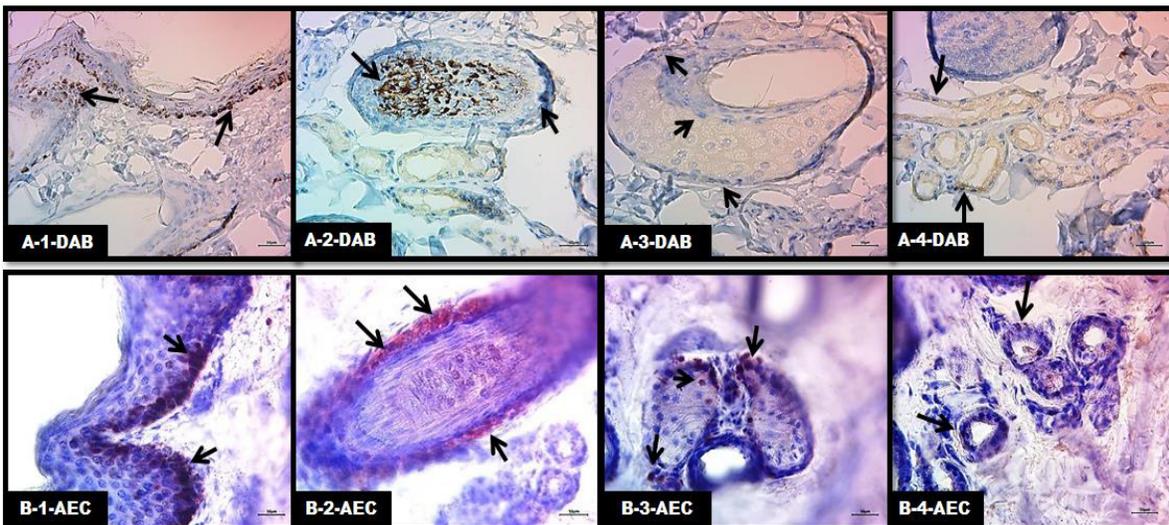


Figura 28. Fotomicrografías comparativas de las distintas estructuras de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador: **A)** (1-4) Piel revelada con Diaminobencidina. **B)** (1-4), Piel revelada con Carbazol. **A1)** y **B1)** Epidermis (positividad-flechas), **A2)** y **B2)** Folículo piloso (positividad-flechas), **A3)** y **B3)** Glándula sebácea (positividad-flechas), **A4)** y **B4)** Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 µm.

6.4.2. Comparativa de Melanoma en Piel para la expresión de la proteína de WT1:

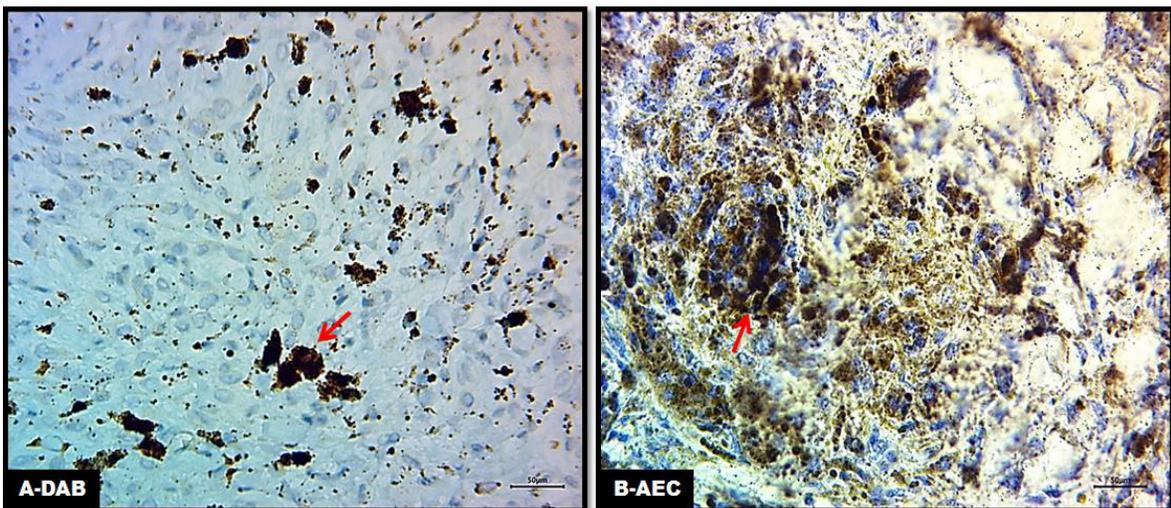


Figura 29. Fotomicrografías comparativas de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1. **A)** Piel revelada con Diaminobencidina. Focos de células tumorales (flechas), es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. **B)** Piel revelada con Carbazol. Se confirma que la expresión de la proteína de WT1 es negativa para los focos de células tumorales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 µm.

6.4.3. Comparativa de Melanoma en Ganglio para la expresión de la proteína de WT1:

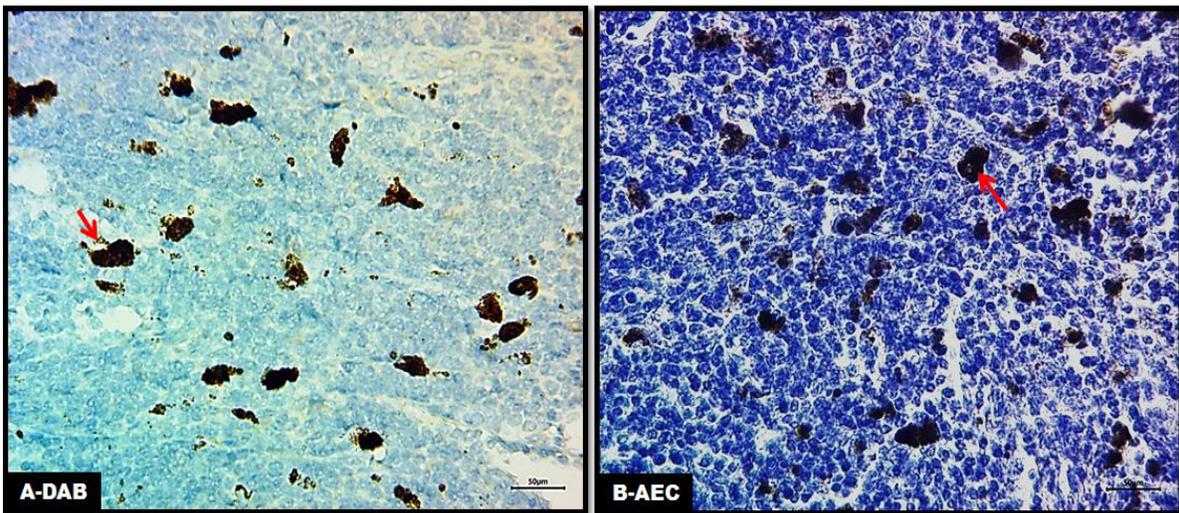


Figura 30. Fotomicrografías comparativas de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1. A) Piel revelada con Diaminobencidina. Focos de células tumorales (flechas), es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. B) Piel revelada con Carbazol. Se confirma también que la expresión de la proteína de WT1 es negativa para los focos de células tumorales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-EAC. Barra: 50 µm.

6.4.4. Comparativa de Riñón para la expresión de la proteína de WT1:

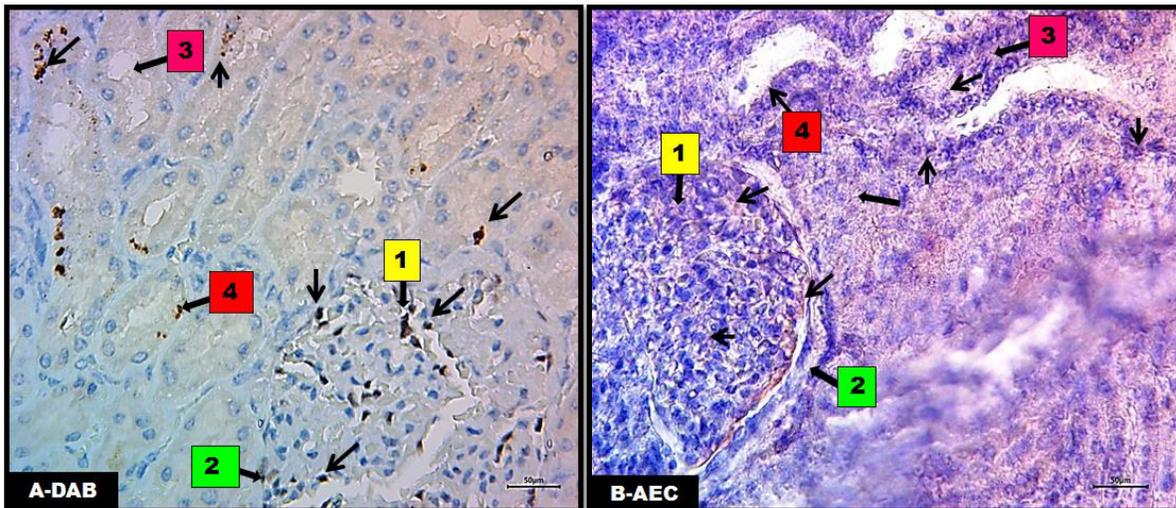


Figura 31. Fotomicrografías comparativas de riñón de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de WT1 con distinto revelador. A) Piel revelada con Diaminobencidina. B) Piel revelada con Carbazol. A) y B) Glomérulo (1), Capsula de Bowman, Espacio urinario (2), Túbulo contorneado proximal (4), Túbulo contorneado distal (5). Se muestra positividad en glomérulo y túbulo contorneado proximal y distal (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 µm.

6.4.5. Comparativa de Piel Sana para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ :

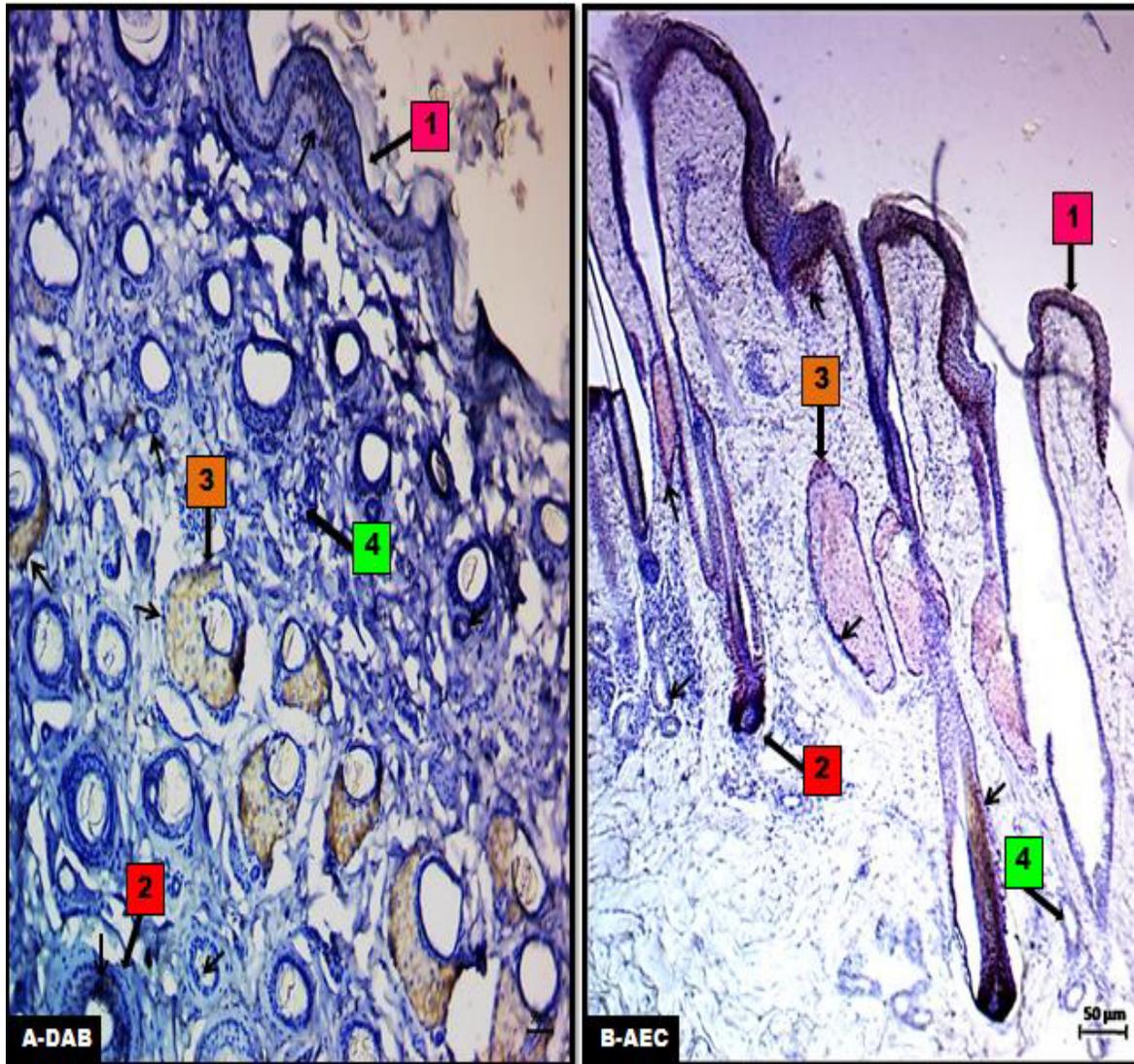


Figura 32. Fotomicrografías comparativas de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador. A) Piel revelada con Diaminobencidina. B) Piel revelada con Carbazol. A) y B), Epidermis (1), Folículo piloso (2), Glándula sebácea (3), Glándula sudorípara (4). Las flechas muestran las positividad de la proteína de PPAR- β/δ . Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC Barra: 50 μm .

6.4.5.1. Comparativa de las estructuras de Piel sana para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ :

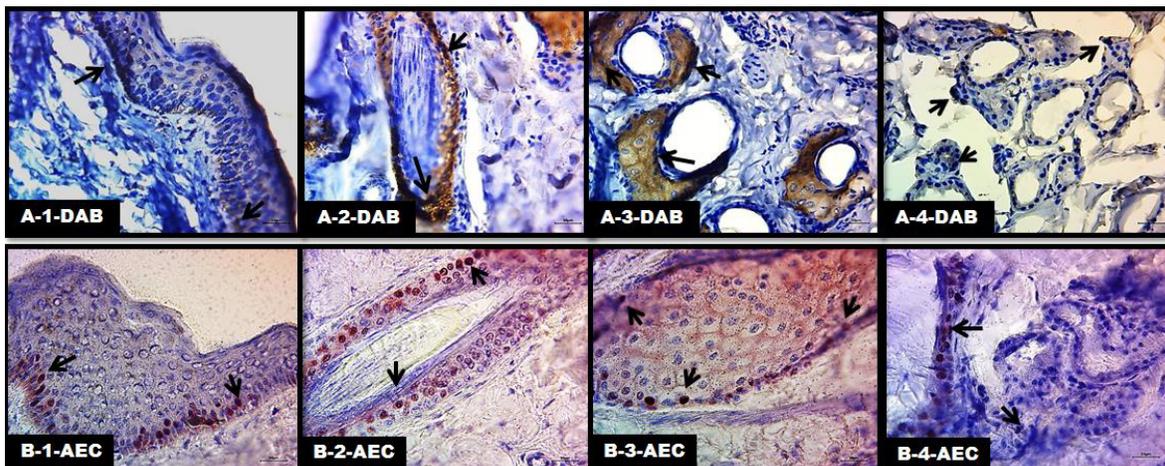


Figura 33. Fotomicrografías comparativas de las distintas estructuras de piel sana de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador. **A)** (1-4) Piel revelada con Diaminobencidina. **B)** (1-4), Piel revelada con Carbazol. **A1)** y **B1)** Epidermis (positividad-flechas), **A2)** y **B2)** Folículo piloso (positividad-flechas), **A3)** y **B3)** Glándula sebácea (positividad-flechas), **A4)** y **B4)** Glándula sudorípara (positividad-flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.

6.4.6. Comparativa de Melanoma en Piel para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ :

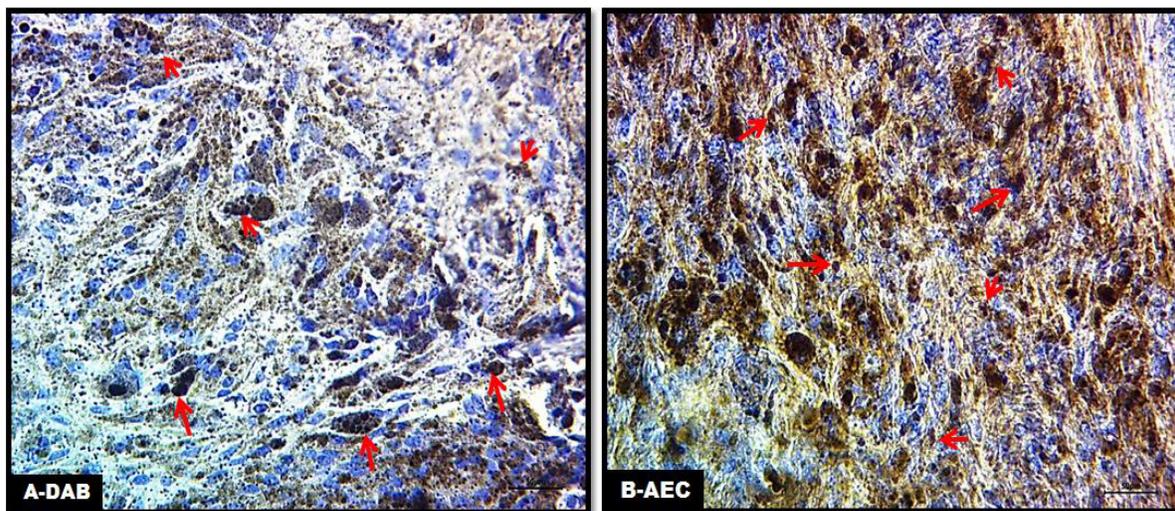


Figura 34. Fotomicrografías comparativas de melanoma en piel de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ . **A)** Piel revelada con Diaminobencidina. Focos de células tumorales (flechas), es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. **B)** Piel revelada con Carbazol. Se confirma la expresión positiva de la proteína de PPAR- β/δ para los focos de células tumorales (flechas). Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.

6.4.7. Comparativa de Melanoma en Ganglio para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ :

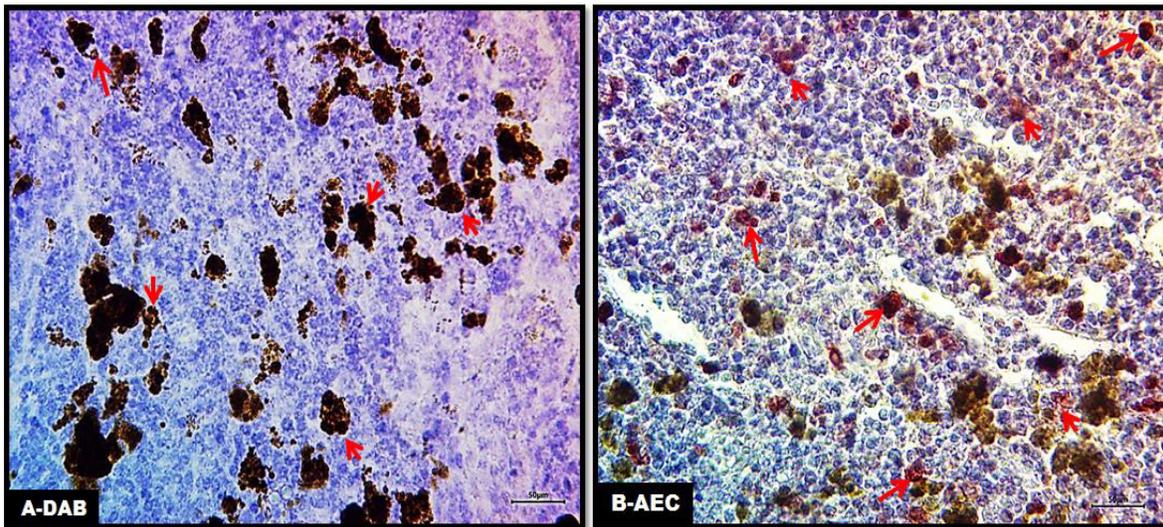


Figura 35. Fotomicrografías comparativas de melanoma en ganglio de equino para el análisis de la localización de la expresión de la proteína de PPAR- β/δ . A) Piel revelada con Diaminobencidina. Focos de células tumorales (flechas), es difícil discriminar entre la posible positividad con DAB y la coloración de la melanina. B) Piel revelada con Carbazol. Se confirma también la expresión positiva de la proteína de PPAR- β/δ para los focos de células tumorales (flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.

6.4.8. Comparativa de Riñón para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ :

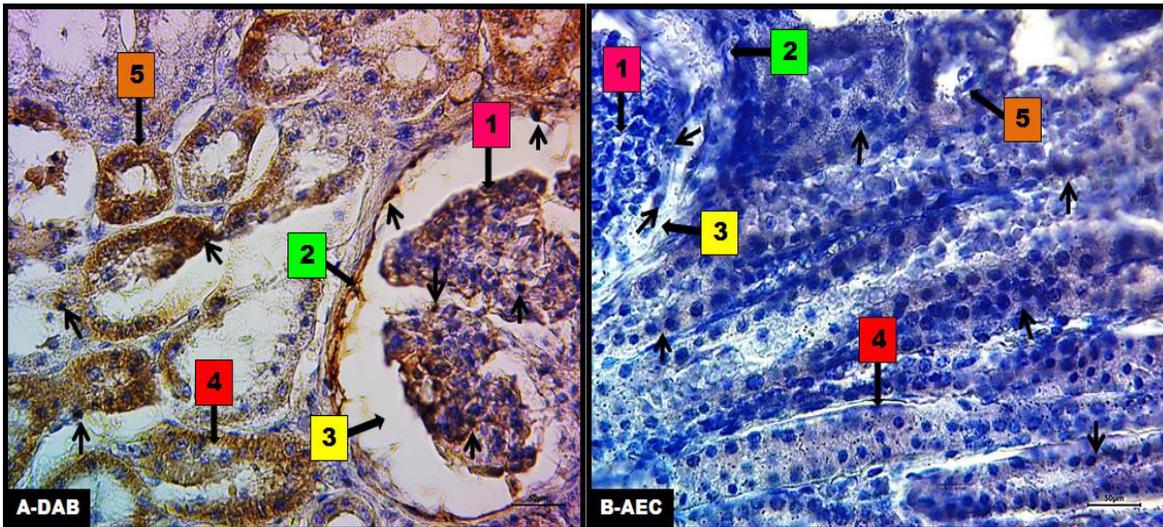


Figura 36. Fotomicrografías comparativas de riñón de equino para el análisis de la expresión de la localización de la proteína de PPAR- β/δ con distinto revelador. A) Piel revelada con Diaminobencidina. B) Piel revelada con Carbazol. A) y B) Glomérulo (1), Capsula de Bowman, Espacio urinario (2), Túbulo contorneado proximal (4), Túbulo contorneado distal (5). Se muestra positividad en glomérulo y túbulo contorneado proximal y distal (flechas). Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.

6.5. Evaluación inmunohistoquímica a través de los Análisis: Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de riñón, piel sana y melanoma.

6.5.1. Análisis Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el Riñón:

El riñón fue utilizado como un control interno positivo para estandarizar la técnica de IHQ, utilizando por individual los reveladores de Diaminobencidina (DAB) y Carbazol (AEC), con la finalidad de corroborar que los anticuerpos en estudio para las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ estaban funcionando correctamente, (Fig. 37), (Fig. 38).

Los resultados fueron evaluados por el método Densitométrico (Gráfica 1) el cual mide la intensidad de positividad y el método complementario Morfométrico (Gráfica 2) que muestra el número de células positivas, haciendo que nuestros resultados sean exactos, ambos métodos evaluaron un correcto funcionamiento de los Anticuerpos para la expresión de ambas proteínas en el riñón, (Gráfica 2).

Para el análisis Densitométrico en el riñón observamos que la expresión positiva de la proteína de WT1 al ser revelada con DAB es menor que con el revelado a partir de AEC, los cual estadísticamente muestra una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre los reveladores, (Gráfica 1).

Por el contrario la expresión para la proteína de PPAR- β/δ en el riñón fue mayor al ser revelada con DAB que con el revelado a partir de AEC, los cual estadísticamente también nos mostró una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre los reveladores, (Gráfica 1).

Se determinó que el análisis Densitométrico revela una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre el marcaje realizado con DAB en comparación con el marcaje realizado con AEC, para la expresión basal de la proteína de WT1 y la proteína de PPAR- β/δ en el riñón, (gráfica 1).

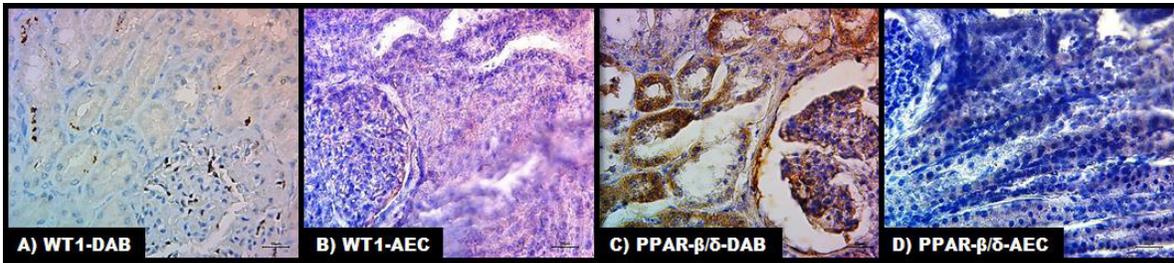
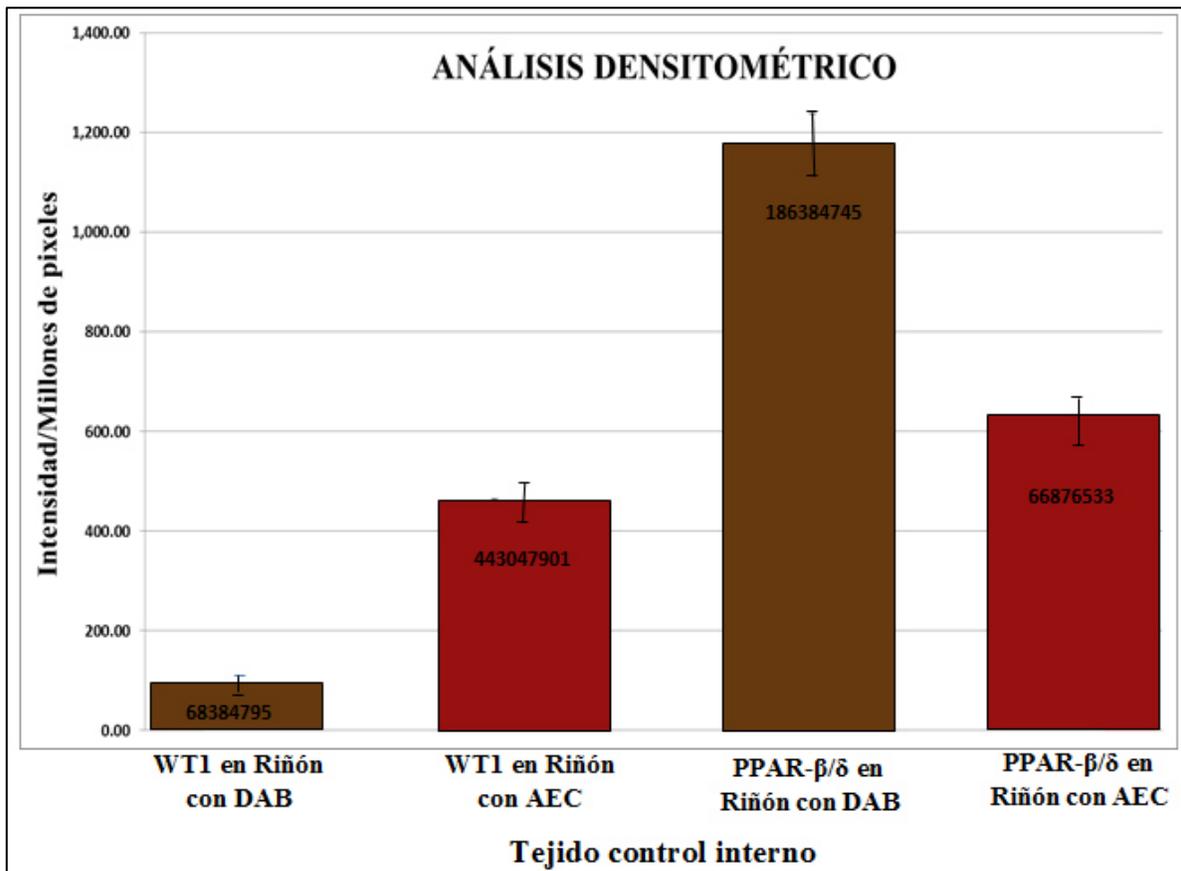


Figura 37. Fotomicrografías de riñón, para su estudio Densitométrico. A) WT1 en riñón revelado con DAB, B) WT1 en riñón revelado con AEC, C) PPAR β/δ en riñón revelada con DAB, D) PPAR- β/δ Riñón revelada con AEC. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.



Gráfica 1. Método Densitométrico para el análisis de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el riñón, utilizando ambos reveladores, DAB y AEC.

Para corroborar los datos obtenidos y verificar el buen funcionamiento de los Anticuerpos con ambos reveladores se realizó el estudio Morfométrico complementario, antes mencionado, en el mismo tejido, utilizando también ambos reveladores, (Fig. 38).

En el análisis Morfométrico corroboramos la similitud de los resultados observados en el método anterior descrito, de igual manera en el riñón observamos que la expresión positiva de la proteína de WT1 al ser revelada con DAB es menor que con el revelado a partir de AEC, los cual estadísticamente muestra una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre los reveladores, (Grafica 2).

De la misma forma paso para la proteína de PPAR- β/δ , los resultados se repitieron en este método en relación con el método anteriormente descrito, observamos en el riñón que la expresión fue mayor al ser revelada con DAB que con el revelado a partir de AEC, los cual estadísticamente también nos mostró una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre los reveladores.

Finalmente, se determinó que el análisis Morfométrico concuerda con los resultados revelados en el análisis Densitométrico, dando ambos una diferencia significativa de $p \leq 0.05$ entre el marcaje realizado con DAB en comparación con el marcaje realizado con AEC, para la expresión basal de la proteína de WT1 y la proteína de PPAR- β/δ en el riñón, (grafica 1).

Con estos resultados podemos determinar que la técnica de IHQ ha sido estandarizada correctamente con ambos tipos de reveladores y que el funcionamiento de los anticuerpos para la detección de la proteína de WT1 y la proteína de PPAR- β/δ se encuentra en perfecto estado.

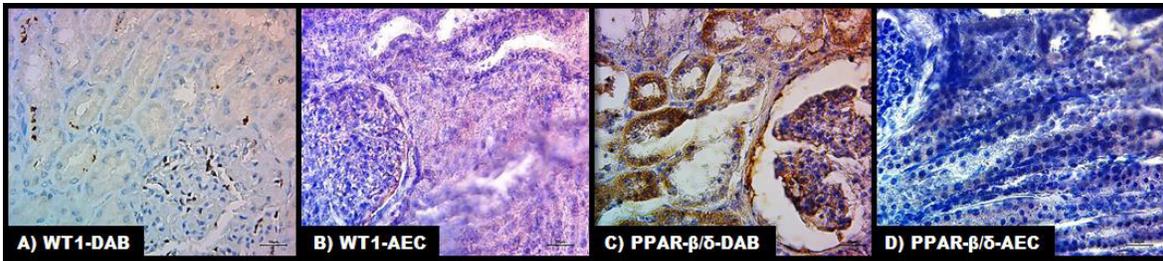
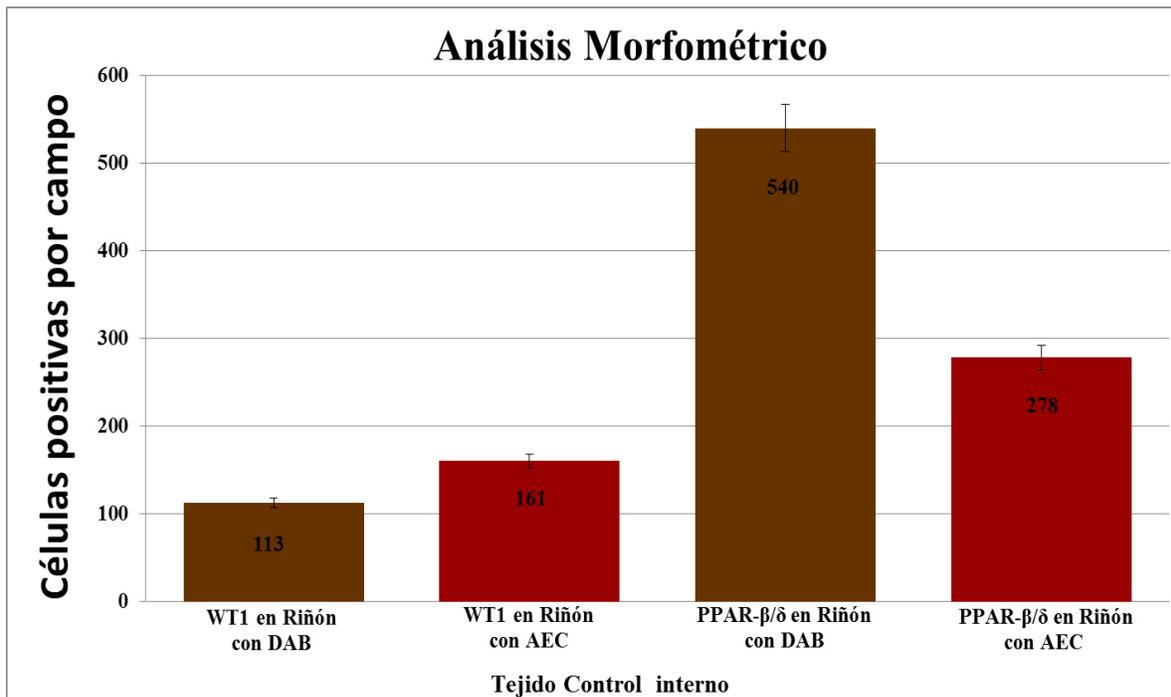


Figura 38. Fotomicrografías de riñón, para su estudio Morfométrico. A) WT1 en riñón revelado con DAB, B) WT1 en riñón revelado con AEC, C) PPAR β/δ en riñón revelada con DAB, D) PPAR- β/δ Riñón revelada con AEC. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-DAB-AEC. Barra: 50 μ m.



Gráfica 2. Método Densitométrico para el análisis de la expresión de la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en el riñón, utilizando ambos reveladores, DAB y AEC.

6.5.2. Análisis Densitométrico y Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en las muestras de piel sana, melanoma.

Ambos análisis fueron utilizados para la evaluación Inmunohistoquímica (IHQ) de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en cada uno de los tejidos en estudio, dichos análisis nos permite conocer la intensidad relativa del grado de tinción positivo (Densitométrico) de cada una de las proteínas de forma independiente en cada tejido y la exactitud del número de células positivas (Morfométrico) que se tiñen, esto con la finalidad de evaluar la localización de la expresión positiva de ambas proteínas en los tejidos y corroborar de forma cuantitativa si existe una asociación entre las mismas.

Por lo tanto, aquí se presentan los resultados de ambos análisis para piel sana y melanoma revelados con Carbazol (Fig. 39), (Fig. 40), gracias a que este revelador sí discriminó la melanina con respecto al marcaje positivo de la localización de la expresión de cada una de las proteínas, así como un resultado negativo de las mismas sobre cada uno de los tejidos, obteniendo así los resultados específicos con respecto a la presencia o ausencia de las proteínas en estudio.

El motivo de realizar ambos análisis fue debido a que el Densitométrico solo nos midió el grado de intensidad, revelándonos una cierta cantidad relativa en base a la positividad de cada una de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ , en cada uno de los tejidos de Piel Sana, Melanoma y Riñón, por lo tanto los resultados obtenidos de esta prueba se basan en la capacidad del programa para determinar las células que están teñidas como positivas en el tejido, sin embargo los resultados que nos arroja este análisis suelen ser no tan exactos, por ello se realizó como método complementario el análisis Morfométrico, el cual nos permitió medir con exactitud el número de células positivas para las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en cada uno de los tejidos y realizar con ello la asociación de ambas proteínas en los diversos tejidos que estudiamos. Finalmente se observó una la similitud de los resultados en ambos análisis.

6.5.2.1. Análisis Densitométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en Piel Sana y Melanoma:

Los resultados para la proteína de WT1 mostraron que se encuentra expresada de forma basal en la piel sana, más no se encuentra expresada en el melanoma en piel ni en el melanoma con metástasis a ganglio (Gráfica 3), por el contrario la proteína de PPAR- β/δ muestra una expresión basal en piel sana, por otro lado en el melanoma ubicado en la piel y en el melanoma con metástasis a ganglio se encuentra sobreexpresada, (Gráfica 3), también se muestra que la expresión de esta proteína es menor para el melanoma metastásico en relación al melanoma en la piel, (Gráfica 3).

Estadísticamente mostramos que la expresión basal de la proteína de WT1 en piel sana muestra diferencia significativa $p \leq 0.05$, en relación a los melanomas, (Gráfica 3).

De igual forma, la expresión basal de la proteína de PPAR- β/δ en piel sana mostró una diferencia significativa $p \leq 0.05$ en relación al melanoma en piel, por otro lado comparando la piel sana en relación con el melanoma metastásico a ganglio, la diferencia significativa $p \leq 0.05$ fue menor (Gráfica 3).

También se muestra que existe diferencia significativa $p \leq 0.05$, entre los niveles basales de expresión en piel sana para las dos proteínas, (Gráfica 3).

Al analizar los resultados de forma conjunta de la expresión entre ambas proteínas para la Piel sana y Melanoma a través del método por densitometría, se observa claramente en la Gráfica 1, que existe una asociación aparente entre la proteína PPAR- β/δ y la proteína de WT1 en el tejido de melanoma en piel y de melanoma con metástasis a ganglio, comparándolas con sus niveles de expresión basal en la piel sana de ambas proteínas, estos resultados estadísticamente nos muestran que hay una diferencia significativa $p \leq 0.05$, (Gráfica 3).

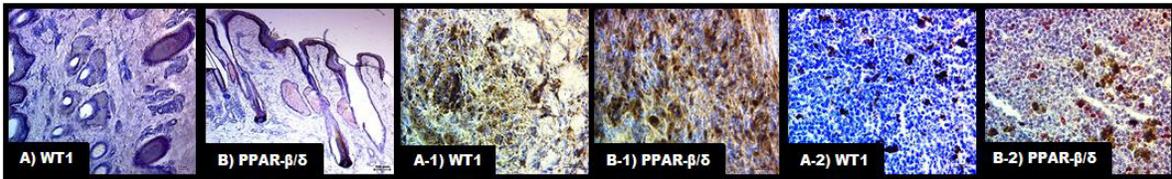
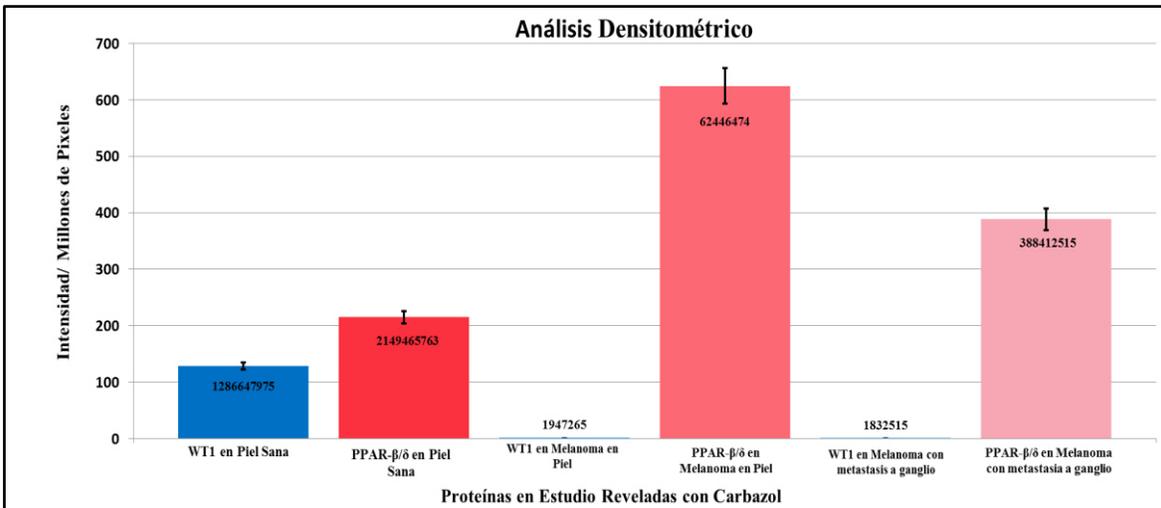


Figura 39. Fotomicrografías de los Tejidos de inmunohistoquímica revelados con AEC, para su estudio Densitométrico. A) WT-1 en Piel Sana, B) PPAR β/δ en piel sana, A-1) WT1 en Melanoma en Piel, B-1) PPAR- β/δ en Melanoma en Piel, A-2) WT1 en Melanoma con metástasis a ganglio, B-2) PPAR- β/δ en Melanoma con metástasis a ganglio. Microscopía de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.



Gráfica 3. Método Densitométrico para el análisis de la expresión y la asociación de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equinos.

Aunque con este método no podemos concluir, los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en el análisis inmunohistoquímico, en base a la presencia o ausencia de la positividad de ambas proteínas.

6.5.2.2. Análisis Morfométrico para la proteína de WT1 y PPAR- β/δ en Piel Sana y Melanoma:

Este análisis corroboró los resultados que obtuvimos por el método anterior, de igual forma encontramos que la proteína de WT1 mostramos se encuentra expresada de forma basal en la piel sana, más no así en el melanoma en piel ni en el melanoma con metástasis a ganglio (Gráfica 4), por otro lado la proteína de PPAR- β/δ muestra también una expresión basal en piel sana y en el caso de melanoma ubicado en la piel se encuentra sobreexpresada,, en este análisis para el melanoma con metástasis a ganglio observamos que la expresión de la proteína PPAR- β/δ sobrepasa de forma no tan marcada el nivel de expresión basal de la piel sana, mostrando que existe una ligera sobreexpresión de esta

proteína en este melanoma, (Grafica 4), por lo tanto al igual que los datos anteriores decimos también que la expresión de esta proteína es menor para el melanoma metastásico en relación al melanoma en la piel, (Grafica 4).

Los datos estadísticos fueron similares:

Estadísticamente mostramos que la expresión basal de la proteína de WT1 en piel sana muestra diferencia significativa $p \leq 0.05$, en relación a los melanomas, (Grafica 4).

También mostramos que la expresión basal de la proteína de PPAR- β/δ en piel sana mostró fuerte diferencia significativa $p \leq 0.05$ en relación al melanoma en piel, por otro lado la diferencia significativa $p \leq 0.05$ de la piel sana con relación al melanoma metastásico a ganglio, fue menor (Grafica 4).

También se muestra que existe diferencia significativa $p \leq 0.05$, entre los niveles basales de expresión en piel sana para las dos proteínas (Grafica 4).

En este análisis se pudo determinar que la expresión de la proteína de WT1 no muestra diferencia significativa $p \leq 0.05$ entre los melanomas, por el contrario la expresión de la proteína PPAR- β/δ entre los melanomas muestra una muy visible diferencia significativa $p \leq 0.05$, (Grafica 4).

Al analizar los resultados de forma conjunta de la expresión entre ambas proteínas para la Piel sana y Melanoma a través del método Morfométrico, se muestran claramente en la Grafica 2, qué ciertamente está existiendo una asociación entre la proteína PPAR- β/δ y la proteína de WT1 en el tejido de melanoma en piel y de melanoma con metástasis a ganglio, comparándolas con sus niveles de expresión basal en la piel sana de ambas proteínas, estos resultados estadísticamente nos muestran que hay una diferencia significativa $p \leq 0.05$, (Grafica 4).

Los resultados también concuerdan con lo observado en el análisis inmunohistoquímico, en base a la presencia o ausencia de la positividad de ambas proteínas.

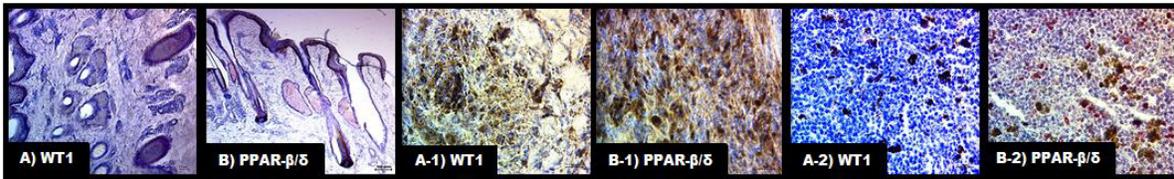
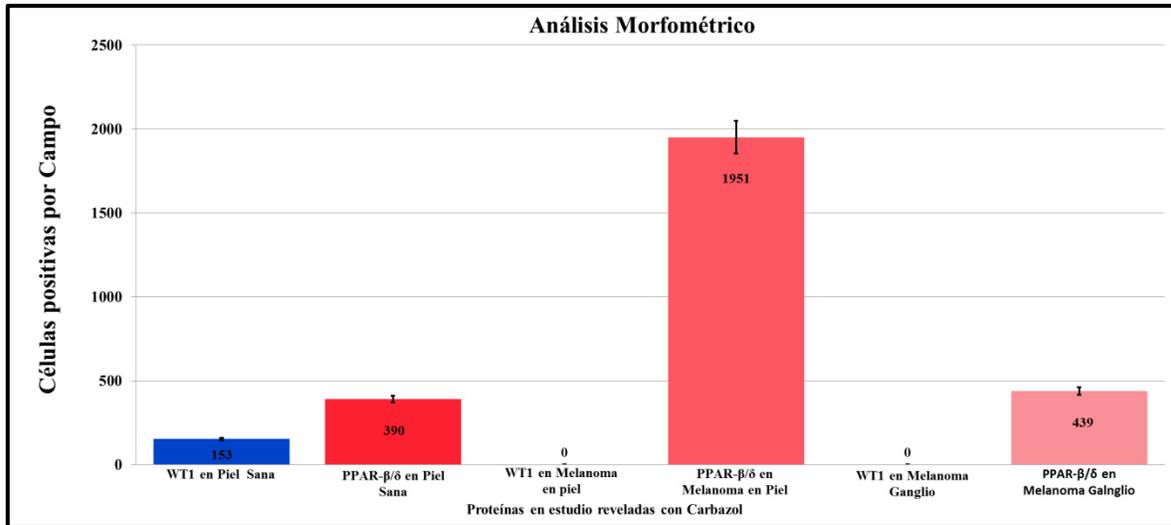


Figura 40. Fotomicrografías de los Tejidos de inmunohistoquímica revelados con AEC, para su estudio Morfométrico. A) WT-1 en Piel Sana, B) PPAR β/δ en piel sana, A-1) WT1 en Melanoma en Piel, B-1) PPAR- β/δ en Melanoma en Piel, A-2) WT1 en Melanoma con metástasis a ganglio, B-2) PPAR- β/δ en Melanoma con metástasis a ganglio. Microscopia de luz. Inclusión en parafina. IHQ-AEC. Barra: 50 μ m.



Gráfica 4. Método Morfométrico para el análisis de la expresión y la asociación de las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equino.

Con estos resultados obtenidos en la Grafica 2 podemos determinar que PPAR- β/δ modula la expresión del gen WT1 en piel sana y melanoma de equino.

7. DISCUSIÓN:

En equinos, el melanoma es una de las tres principales neoplasias presentes en la piel, se han analizado la expresión de algunos genes en esta patología tales como: STX17, NR4A3 (Sundstrom Elisabeth, et al., 2012) el gen S-100, los antígenos nucleares de las células en proliferación (PCNA), así como el HMB-45, el Ki-67, el T-311 y el CD44 (Seltenhammer et al., 2004), Melan-A, MAGE-1, MAGE-3 (Kamau Chapman et al., 2009), TYR, TRP1, MITF, PMEL, ASIP, MC1R, POMC, y KIT, el p16, PTEN y el gen supresor tumoral p53 (Heidemarie Seltenhammer Monika., et al., 2014).

Haciendo una comparativa con el melanoma en humanos, en donde se han estudiado la expresión de genes asociados al desarrollo de la neoplasia, destaca la expresión en más del 80% de los casos, del gen WT1, el cual se ha encontrado sobreexpresado en numerosos tipos de cáncer y se ha asociado a proliferación celular, quimioresistencia, agresividad y baja sobrevivencia, aunado a esto, WT1 no ha sido reportado en piel sana.

En la línea celular murina B16F10 también se ha reportado una alta expresión de WT1 y en un modelo de melanoma murino con metástasis pulmonar establecido a partir de esta línea, el silenciamiento de WT1 con RNAi induce disminución de la masa tumoral y aumento en la sobrevivencia de los ratos, sugiriéndose así que WT1 puede ser considerado como un marcador diagnóstico para este tipo de neoplasia (Zamora Avila D. E., et al., 2009).

Los datos anteriormente mencionados sugieren un papel oncogénico de WT1 en melanoma, sin embargo, existe un reporte de la expresión de PPAR β en donde su activación farmacológica en líneas celulares de melanoma humanas y murinas induce una inhibición en la proliferación celular sin inducir apoptosis, asociada a una baja en la expresión de WT1, demostrándose una represión por la unión directa de PPAR β al promotor de WT1 que resulta en la inhibición de los efectos de WT1 como promotor de la proliferación celular (Michiels Jean F et. al, 2010).

En un estudio previo realizado por nuestro equipo de trabajo, en donde se analizó la expresión de WT1 en piel sana y melanoma equino, contrario a lo esperado conforme a lo obtenido en otras especies, no se encontró expresión de esta proteína en melanoma pero si en piel sana, lo cual nos permitió plantear la posibilidad de que pudiera existir una modulación de WT1 por PPAR β como lo reportado por Michiels Jean F., et. al, 2010.

Debido a que no existen estudios que reporten la expresión del gen WT1 y PPAR- β/δ en melanoma en equinos, en el presente trabajo se analizó la expresión de ambas proteínas en piel sana y melanoma de equinos, para dilucidar el posible rol biológico que desempeñan y su analogía con otras especies.

La expresión de las proteínas de estudio se analizó por IHQ utilizando como control de expresión de WT1 en tejido proveniente de riñón, ya que aquí se expresa durante el desarrollo embrionario para dar lugar al sistema genitourinario como lo reportado para humanos (Mrowka Christian et al., 2000), encontrándose expresión positiva del gen WT1 y PPAR- β/δ a nivel de los glomérulos y túbulos contorneados distales y proximales.

Al analizar las muestras de melanoma, éstas fueron negativas para la expresión de WT1 y positivas para PPAR- β/δ . Las muestras de piel sana de equinos fueron positivas para WT1 a nivel del folículo piloso, en glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, ésta expresión no ha sido reportada para ninguna otra especie.

Estos resultados son contrarios a lo reportado en melanoma de humanos en donde WT1 se encuentra altamente expresado predominantemente en el citoplasma de las células neoplásicas, reconociéndose a WT1 como un marcador para esta patología (Garrido Ruiz María Concepción et al., 2010).

En un estudio hecho por Nakatsuka Shin-ichi y colaboradores en el 2006, se encontró expresión de la proteína de WT1 en melanoma humano a partir de la técnica IHQ, utilizando el anticuerpo policlonal C-19, reconociendo que esta expresión puede ser significativa en el pronóstico de melanoma. En el presente trabajo fue utilizado este mismo anticuerpo para la expresión de la proteína de WT1 en melanoma equino y piel sana, sin embargo, los resultados obtenidos son lo opuesto a lo reportado en este estudio, no encontrándose expresión de WT1 en melanoma y si una expresión basal en piel sana, por lo tanto estos resultados sugieren que el gen WT1 en equinos no tiene el mismo rol biológico que lo reportado en humanos, sugiriendo que posiblemente esté actuando como un supresor tumoral en melanoma equino debido a la expresión basal que se presenta en la piel o también podría estar funcionando como oncogén y encontrarse reprimido por la interacción con otros genes.

No hay reportes del uso del anticuerpo policlonal C-20 para la expresión de la proteína de PPAR- β/δ en melanoma y piel sana de equinos, como lo muestra el presente

estudio. Tampoco se sabe el rol biológico que desempeña en este tipo de neoplasia para esta especie.

En el presente estudio encontramos que el gen PPAR- β/δ en equinos se encuentra expresado citoplasmático en la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas como lo reportado en humanos (Michalik Liliane, et al., 2007), (Michiels Jean F., et al., 2010), (Tyagi Sandeep, et al., 2011), por lo tanto se podría sugerir que se encuentra involucrado durante el desarrollo normal de la piel de ambas especies.

Otro aspecto importante que reporto Lee Chih-Hao y colaboradores en el 2006 es que PPAR β/δ desempeña un papel muy importante en el proceso del metabolismo de las grasas en el músculo de los equinos y en humanos se ha encontrado que está implicado en la regulación genética del metabolismo de los lípidos (lipogénesis), carbohidratos y otras proteínas (Rodríguez Martín M., 2008), (Sertznig Pit, et al., 2011) (Dunning Kylie R., et al., 2014) por lo tanto estos datos podrían sugerir que el gen PPAR β/δ en equinos desempeña un rol biológico similar a lo reportado en humanos y a la par estar ejerciendo actividad supresora tumoral en numerosos tipos de cánceres en equinos, como en humanos (Rodríguez Martín M., 2008).

Hemos visto que la IHQ como técnica diagnóstica a partir del uso del revelador Carbazol es exacta para la detección y cuantificación de proteínas a partir de tejidos como lo presentamos en este estudio en comparación con lo reportado en humanos y murinos (Soto-Domínguez Adolfo, et al., 2013).

Nuestros resultados sugieren una posible represión de WT1 en melanoma equino, que contrastando con la literatura, pudiera ser por efecto de la expresión de PPAR β , sin embargo, es necesario ampliar el número de muestras de piel normal y melanoma para analizar la expresión de éstos PPARs y la interacción con WT1 para dilucidar el rol biológico que podría estar jugando en esta neoplasia.

8. CONCLUSIONES:

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos concluir que:

- En equinos, las proteínas de WT1 y PPAR- β/δ se encuentra expresada de forma basal en las diferentes estructuras de la piel sana: epidermis y dermis, en el folículo piloso, en la glándula sebácea y en la glándula sudorípara.

- En melanoma equino, contrario a lo reportado en humanos, no se encontró expresión de WT1 y se encontró una sobreexpresión de PPAR- β/δ .

Los resultados obtenidos sugieren que PPAR- β/δ modula la expresión del gen WT1 en piel sana y melanoma de equino, ya que la sobreexpresión de PPAR- β/δ en melanoma se asoció con una represión de la expresión de WT1.

9. BIBLIOGRAFÍA:

1. Arif Khan Abdul, Shrivastava Abhinav, Khurshid Mohsin, 2012, Normal to cancer microbiome transformation and its implication in cancer diagnosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, Department of Microbiology, India y Arabia Saudita, (p. 331-337).
2. Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson James D., 2002, *Biología Molecular de la Célula, Cáncer*, OMEGA, Tercera Edición, Traducción por Barcelona, España, Cap. 24 (p. 1345-1387).
3. Encina S. Gonzalo, 2013, *Molecular Biology in Oncology: What a Phisician Should Know*, Medica Clínica las Condes, Laboratorio de Oncología y Génética Molecular, Las Condes, Chile, (p. 563-570).
4. Aktipis C. Athena, Boddy Amy M., Jansen Gunther, Hibner Urszula, Hochberg Michael E., Maley Carlo C., Wilkinson Geral S., 2015, *Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity*, Royal Society, Center for Evolution and Cancer, University of California San Francisco, San Francisco, USA, (p. 1-21).
5. Somarelli Jason A., Ware Kathryn E., Kostadinov Rumen, Robinson Jeffrey M., Amri Hakima, Abu-Asab Mones, Fourie Nicolaas, Diogo Rui, Swofford David, Townsend Jeffrey P., 2016, *PhyloOncology: Understanding cancer through phylogenetic analysis*, *Biochimica et Biophysica Acta*, Duke Cancer Institute and the Department of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, United States (p. 1-8).
6. Hanahan Douglas and Weinberg Robert A., 2011, *The Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, Cell Press, Institute for Experimental Cancer Research, Lausanne, Suiza, and Department of Biochemistry and Biophysics and Hormone Research Institute, University of California at San Francisco, USA, and Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts, USA, (p. 646-674).
7. Hanahan Douglas and Weinberg Robert A., 2000, *The Hallmarks of Cancer*, Cell Press, Department of Biochemistry and Biophysics and Hormone Research Institute, University of California at San Francisco, USA, and Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts, USA, (p. 57-70).
8. American Cancer Society, 2017, *Tipos comunes de Cáncer*, Instituto Nacional del Cáncer (NIH), Atlanta, USA, (p. 1).

9. Contreras Martínez J., Definición y áreas de la calidad de vida en Oncología, 2005, Oncología, Unidad Multidisciplinaria para el Estudio y Tratamiento del Dolor, Hospital Universitario Madrid, Madrid, España, (p. 123-128).
10. Catellanos Julio, Grupo C3, 2014, Genes Supresores Tumorales, Bases Moleculares del Cáncer, San Carlos de Guatemala, (p. 1).
11. Huff Vicki, 2011, Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene, Nat Rev Cancer, Houston, Texas, USA, (p. 111-121).
12. Rosenfeld C., Cheever, MA., Gaiger A., 2003, WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemias and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies, Leukemia, Vienna Austria and Dallas, TX, USA (p. 1301-1312).
13. Díaz Chico N., Dorta J., Zárata R., Díaz D., 2010, Proto-oncogenes y Oncogenes, BioCancer, (p. 1).
14. Ramos Zerpa Hilda V. and Ramos Zerpa Wilmer E., 2010, Marcadores Tumorales en Melanoma Maligno, PIEL Latinoamérica, Venezuela, (p. 1-2).
15. Garrido Ruiz María Concepción, Rodríguez Peralto José Luis, Carrillo Gijón Rosario, 2010, Comparación del Perfil de Expresión Proteico entre Nevus y Melanoma, Tesis Doctoral, Madrid, Spain, (p. 1-235).
16. Fuertes L., Santonja C., Kutzner H., Requena L., 2013, Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part I), ACTAS Dermo-Sifilográficas, Friedrichshafen, Alemania, (p. 99-127).
17. Yang L., Han Y., Saurez Saiz F., Minden MD., 2007, A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story, Nature Publishing Group, Toronto, Ontario, Canada, (p. 868-876).
18. Porrello A., Cardelli P., Spugnini EP., 2006, Oncology of companion animals as a model for humans an overview of tumor histotypes, J Exp Clin Cancer Res., Rome, Italy, (p. 97-105).
19. Zachary James F. and McGavin Donal M., 2011, Chapter 6: Neoplasia and Tumor Biology, Pathologic Basis of Veterinary Disease, 5th Edition, Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, (p. 289-309).
20. American Veterinary Medical Association (AVMA), American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), 2017, Veterinary Cancer Society (VCS), Animal Cancer, AVMA, USA, (p. 3-10).

21. Pielberg Rosengren Gerli, Golovko Anna, Sundström Elisabeth, Curik Ino, Lennartsson Johan, Seltenhammer Monika H., Druml Thomas, Binns Matthew, Fitzsimmons Carolyn, Lindgren Gabriella, Sandberg Kaj, Baumung Roswitha, Vetterlein Monika, Strömberg Sara, Grabherr Manfred, Wade Claire, Lindblad-Toh Kerstin, Pontén Fredrik, Heldin Carl-Henrik, Sölkner Johann, Andersson Leif, 2008, A *cis*-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse, *Nature Genetics*, Sweden, (p. 1004-1009).
22. Davis E. G. and Rush B. R., 2013, Diagnostic challenges: Equine thoracic neoplasia, *Equine Veterinary Education*, Kansas, USA, (p. 96-107).
23. Martínez de Merlo Elena M., 2012, Introducción al Diagnóstico en Oncología Equina, *RCCV*, Madrid, España, (p. 88-98).
24. Schaffer PA., Wobeser B., Martin LE., Dennis MM., Duncan CG., 2013, Cutaneous neoplastic lesions of equids in the central United States and Canada: 3,351 biopsy specimens from 3,272 equids (2000-2010), *J Am Vet Med Assoc*, USA, (p. 99-104).
25. Valentine Beth A., 2006, Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest, *J Vet Diagn Invest*, Corvallis, USA, (p. 123-126).
26. Burden Katherine, 2011, Melanomas and their effect on the grey horses, *Young Scientists Journal*, Canterbury, England, (75-81).
27. Fleury Catherine, Bérard Frederic, Ágnes Leblond , Faure Christine, Ganem Nathalie, Thomas Luc, 2000, The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (2): Epidemiological Survey, *Pigment Cell Res*, France, (p. 47-51).
28. Bellone R. R., 2010, Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses, *Animal Genetics*, USA, (p. 100-110).
29. Sutton R. H. and G. T. Coleman, 1997, Melanoma and the greying horse: a study of the grey horse melanoma, with special reference to prevalence, tumor structure and biology and associated pigment metabolism abnormalities: a report for the Rural Industries Research Development Corporation/by R H Sutton and G T Coleman, *Rural Industries Research and Development*, Australia, (p. 1-23).

30. Heidemarie Seltenhammer Monika, Simhofer H., Scherzer S., Zechner P., Curik I., Sölkner J., Brandt S. M., Jansen B., Pehamberger H., Eisenmenger E., 2003, Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses *Equine Veterinary Journal*, Vienna, Austria, (p. 153-157).
31. Patterson-Kane J. C., Sanchez L. C, Uhl E. W., Edens L. M., 2001, Disseminated Metastatic Intramedullary Melanoma in an Aged Grey Horse, *J. Comp. Path.*, USA, (p. 204-207).
32. Scotty Nicole C., Barrie Kathleen B., Brooks Dennis E., Taylor David, 2008, Surgical management of a progressive iris melanocytoma in a Mustang, *Veterinary Ophthalmology*, USA, (p. 75-80).
33. Barabas K., Milner R., Lurie D., Adin C., 2008, Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications, *Veterinary and Comparative Oncology*, Florida, USA, (p. 1-18).
34. Hunter Robert P., Short Charles R., Myers Michael J., Farrell Dorothy E., McClure James R., Koch Catherine E., Keowen Michael L., 2007, The Effect of Cimetidine and Aminoguanidine on Pro-inflammatory Cytokines in the Horse, *Journal Equine Veterinary Science*, USA, (p. 307-311).
35. Laus F., Cerquetella M., Paggi E., Ippedico, G., Argentieri M., Castellano G., Spaterna A., Tesei B., 2010, Evaluation of Cimetidine as a Therapy for Dermal Melanomatosis in Grey Horse, *ISRVMA*, Italy, (p. 48-52).
36. Scacco Licia, Bolaffio Carlo, Romano Antonio, Fanciulli Maurizio, Baldi Alfonso, Pierluigi Spugnini Enrico, 2013, Adjuvant Electrochemotherapy Increases Local Control in a Recurring Equine Anal Melanoma, *Journal of Equine Veterinary Science*, Italy, (p. 67-639).
37. Theón AP., Pascoe JR., Carlson GP., Kraq DN., 1993, Intratumoral chemotherapy with cisplatin in oily emulsion in horses, *J Am Vet Med Assoc.*, Davis, USA, (p. 261-267).
38. McCauley Charles T., Hawkins Jan F., Adams Stephen B., Fessler John F., DVM, MS, DACVS, 2002, Use of a carbon dioxide laser for surgical management of cutaneous masses in horses: 32 cases (1993–2000), *J Am Vet Med Assoc*, USA, (p. 1192-1197).
39. Hewes Christina A. and Sullins Kenneth E., 2006, Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 cases (2000-2004), *J Am Vet Med Assoc*, USA, (p. 1617-1622).

40. Lembcke Luis M., Kania Stephen A., Blackford James T., Trent Dianne J., 2012, Agrícola Odoi BVM, MSc, PhD a , Deborah A. Grosenbaugh DVM, PhD b , Darrilyn G. Fraser MS, PhD b , Timothy Leard DVM, PhD b , Jeffrey C. Phillips, Development of Immunologic Assays to Measure Response in Horses Vaccinated with Xenogeneic Plasmid DNA Encoding Human Tyrosinase, *Journal of Equine Veterinary Science*, USA, (p. 607-615).
41. Bei Li, Xiao-long He, Yi-ping Zhao, Qi-nan Zhao, Unierhu, Dong-yi Bai, Dugarjaviin Manglai, 2014, Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse, *Livestock Science*, China, (p. 58-64).
42. Heinzerling Lucie M., Feige Karsten, Rieder Stefan, Akens Margarete K, Dummer Reinhard, Stranzinger Gerald, Moelling Karin, 2001, Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses, *J Mol Med*, Switzerland, (p. 692-702).
43. Pavlin Darja, Cemazar Maja, Sersa Gregor, Tozon Natasa, 2012, IL-12 based gene therapy in veterinary medicine, *Journal of Translational Medicine*, Slovenia, (p. 1-11).
44. Finocchiaro L. M., Riveros M. D., Glikin G. C., 2009, Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as adjuvant treatments of metastatic melanoma in a horse, *Vet. Rec.*, Buenos Aires, Argentina, (p. 278-279).
45. Brown Elizabeth L., Ramiya Vijayakumar K., Wright Cara A., Jerald Maya M., Via Angela D., Kuppala Venkata N., Hazell William S., Lawman Patricia D., Lawman Michael J., 2014, Treatment of Metastatic Equine Melanoma with a Plasmid DNA Vaccine Encoding *Streptococcus Pyogenes* EMM55 Protein, *Journal of Equine Veterinary Science*, Florida, (p. 704-708).
46. Sundstrom Elisabeth, Insländ Freyja, Mikko Sofia, Wade Claire, Sigurdsson Snaevar, Rosengren Pielberg Gerli, Golovko Anna, Curik Ino, Seltenhammer Monica H., Solkner Johann, Lindblad-Toh Kerstin, Andersson Leif, 2012, Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses, *BMC Genomics*, Sweden, (p. 1-13).

47. Kavar Tatjana, Ceh Eva, Dovc Peter, 2012, A simplified PCR-based method for detection of gray coat color allele in horse, *Molecular and Cellular Probes*, Slovenia, (p. 256-258).
48. Jiang Lin, Campagne Cécile, Sundström Elisabeth, Sousa Pedro, Imran Saima, Seltenhammer Monika, Pielberg Gerli, Olsson Mats J., Egidy Giorgia, Andersson Leif, Golovko Anna, 2014, Constitutive activation of the ERK pathway in melanoma and skin melanocytes in Grey horses, *BMC Cancer*, Sweden, (p. 1-11).
49. Curik Ino, Drumi Thomas, Seltenhammer Monika, Sundstrom Elisabeth, Rosengren Pielberg Gerli, Andersson Leif, Solkner Johann, 2013, Complex Inheritance of Melanoma and Pigmentation of Coat and Skin in Grey Horses, *PLOS GENETICS*, Sweden, (p. 1-9).
50. Heidemarie Seltenhammer Monika, Heere-Ress Elisabeth, Brandt Sabine, Druml Thomas, Jansen Burkhard, Pehamberger Hubert, Willhelm Niebauer Gert, 2004, Comparative Histopathology of Grey-Horse-Melanoma and Human Malignant Melanoma, *Pigment Cell Research*, Vienna Austria, (p. 674-681).
51. Kamau Chapman Sarah W., Metzger Nadine, Grest Paula, Feige Karsten, Rechenberg Brigitte von, Auer A. Jörg, Hottinger Michael O., 2009, Isolation, establishment, and characterization of ex vivo equine melanoma cell cultures, *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, Zurich, Switzerland, (p. 152-162).
52. Heidemarie Seltenhammer Monika, Sundström Elisabeth, Meisslitzer-Ruppitsch Claudia, Cejka Petra, Kosiuk Jędrzej, Neumüller Josef, Almeder Marlene, Majdic Otto, Steinberger Peter, Losert Udo M., Stockl Johannes, Andersson Leif, Solkner Johann, Vetterlein Monika, Golvko Anna, 2014, Establishment and characterization of a primary and metastatic melanoma cell line from Grey Horses, *In Vitro Cell Dev Biol Animal*, Vienna Austria, (p. 56-65).
53. Grossmann Kenneth F. and Christiansen Shelley., 2013, Advances in Adjuvant Therapy for the Treatment of High-risk Melanoma, *Oncology & Hematology Review*, Huntsman Cancer Institute, University of Utah, Salt Lake City, US, (p. 132-137).
54. Aris Mariana, 2009, Origin of normal and malignant melanocytes, *Bioquímica Molecular*, Acta Bioquím Clín Latioam, (p. 333-337).
55. Ombra Maria N., Paliogiannis Panagiotis, Doneddu Valentina, Sini Maria C., Colombino Maria, Rozzo Carla, Stanganelli Ignazio, Tanda Francesco, Cossu Antonio,

Palmier Giuseppe, 2016, Vitamin D status and risk for malignant cutaneous melanoma: recent advances, *European Journal of Cancer Prevention*, Department of Surgical, Microsurgical and Medical Sciences, University of Sassari, Viale San Pietro, Italy, (p. 1-10).

56. Arozarena Imanol and Wellbrock, 2011, Targeting Invasive Properties of Melanoma Cells, *cancer Research UK*, Pamplona, Spain y Manchester UK, (p 1-35).

57. Restrepo Catalina, Velásquez Margarita María, 2012, Mecanismos de patogénesis del melanoma maligno, *Rev Asoc Colomb Dermatol*, Medellín, Colombia, (p. 161-172)

58. Puig Susana, Potrony Miriam, Cuellar Francisco, Anton Joan, Butille-Puig, Carrera Cristina, Aguilera Paula, Nagore Eduardo, Casado García Zaida, Requena Celia, Kumar Rajiv, Landman Gilles, Costa Soares de Sá Bianca, Gargantini Rezze Gisele, Facure Luciana, Leon Ribeiro de Avila Alexandre, Achatz Maria Isabel, Carraro Dirce Maria, Pedreira Duprat Neto Joao, Grazziotin Thais C., Bonamigo Renan R., Rey María Carolina W., Balestrini Claudia, Morales Enrique, Molgo Montserrat, Marchiori Bakos Renato, Ashton-Prolla Patricia, Giugliani Roberto, Larre Borges Alejandra, Barquet Virginia, Pérez Javiera, Martínez Miguel, Cabo Horacio, Cohen Sabban Emilia, Latorre Clara, Carlos-Ortega Blanca, Salas-Alanis Julio C., González Roger, Olazaran Zulema, Malvehy Josep, Badenas Celia, 2015, Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma, *GENETICS in MEDICINE*, Barcelona, España, (p. 727-736).

59. Acosta Álvaro Enrique, Fierro Eduardo, 2009, Velásquez Victoria Eugenia, Rueda Xavier, *Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología*, Asoc Col Dermatol, Bogotá, Colombia, (p. 87-108).

60. Potrony Miriam, Badenas Celia, Aguilera Paula, Puig-Butille Joan Anton, Carrera Cristina, Malvehy Josep, Puig Susana, 2015, Update in genetic susceptibility in melanoma, *Annals of Translational Medicine*, Barcelona, España, (p. 210-215).

61. Singh Meena K., Lin J., Hocker Thomas L., Tsao Hensin., 2008 Genetics of melanoma tumorigenesis, *Br. J. Dermatol*, Boston, USA, (p. 15–21).

62. Shitara D., Tell-Marti G., Badenas C., Enokihara M.M.S.S., Alós L., Larque A.B. Michalany Nilceo, Puig-Butille J., Carrera C., Malvehy J., Puig S., Bagatin E., 2015,

Mutational status of nevus associated-melanomas, *Br. J. Dermatol*, Barcelona, Spain, (p. 671-680).

63. Ibrahim Nageatte and Haluska Frank G., 2009, Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Massachusetts, USA, (p. 551-579).

64. Hocker Thomas L., Singh Meena K., Tsao Hensin, 2008, Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside, *Journal of Investigative Dermatology*, Boston, USA, (p. 2575-2595).

65. Davies Helen, Bignell Graham R., Cox Charles, Stephens Philip, Edkins Sarah, Clegg Sheila, Teague Jon, Woffendin Hayley, Garnett Mathew J., Bottomley William, Davis Neil, Davis, Dicks Ed, Ewing Rebecca, Floyd Yvonne, Gray Kristian, Hall Sarah, Hawes Rachel, Hughes Jaime, Kosmidou Vivian, Menzies Andrew, Mould Catherine, Parker Adrian, Stevens Claire, Watt Stephen, Hooper Steven, Wilson Rebecca, Jayatilake Hiran, Gusterson Barry A., Cooper Colin, Shipley Janet, Hargrave Darren, Pritchard-Jones Katherine, Maitland Norman, Chenevix-Trench Georgia, Riggins Gregory J., Bigner Darell D., Palmieri Giuseppe, Cossu Antonio, Flanagan Adrienne, Nicholson Andrew, Judy W., Ho C., Leung Suet Y., Yuen Siu T., Weber Barbara L., Seigler Hilliard F., Darrow Timothy L., Paterson Hugh, Marais Richard, Marshall Christopher J., Wooster Richard, Stratton Michael R., Futreal P. Andrew, 2002, Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*, UK, (p. 949-954).

66. Pollock Pamela M., Harper Ursula L., Hansen Katherine S., Yudt Laura M., Stark Mitchell, Robbins Christiane M., 2003, High frequency of BRAF mutations in nevi, *Nature Genetics*, New York, USA, (p. 19–20).

67. Patton E. Elizabeth, Widlund Hans R., Kutok Jeffery L., Kopani Kamden R., Amatruda James F., Murphey Ryan D., Berghmans Stephane, Mayhall Elizabeth A., Traver David, Fletcher Christopher D.M., Aster Jon C., Granter Scott R., A. Look Thomas, Lee Charles, Fisher David E., Zon Leonard I., 2005, BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma, *Current Biology*, Boston, Massachusetts, USA, (p. 249–254).

68. Thompson John F., Scolyer Richard A., Kefford Richard F., 2009, Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling, *The Lancet*, Melanoma Institute Australia, North Sydney, Australia, (p. 374-362).
69. Wu Min, Hemesath Timothy J., Takemoto Clifford M., Horstmann Martin A., Wells Audrey G., Price E. Roydon, Fisher Daniel Z., Fisher David E., 2000, c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi, *Genes Development*, (p. 301–312).
70. Curtin John A., Busam Klaus, Pinkel Daniel, Bastian Boris C., 2006, Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma, *J. Clinical Oncology*, New York, (p. 4340–4346).
71. Tang Liren, Tron Victor A., Reed John C., Mah Karen J., Krajewska Maryla, Li Gang, Zhou Xiwu, Ho Vincent C., Trotter Martin J., 1998, Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma, *Clinic Cancer Research*, Canada, (p. 1865–1871).
72. Nicole Wagner, Panelos John, Massi Daniela, Dietrich Wagner Kay, 2008, The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation, *CELL AND MOLECULAR PHYSIOLOGY*, France and Italy, (p. 839-847).
73. Sertznig Pit. and Reichrath Jörg, 2011, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in dermatology, *Dermato-Endocrinology*, Germany, (p. 130-135).
74. Michiels Jean F., Perrin Christophe, Leccia Nathalie, Massi Daniela, Grimaldi, Paul, Wagner Nicole, 2010, PPARB activation inhibits melanoma cell proliferation involving repression of the Wilms' tumour suppressor WT1, *Molecular and Genomic Physiology*, France, (p. 689-703).
75. Mrowka Christian and Schedl Andreas, 2000, Wilms' Tumor Suppressor Gene WT1: From Structure to Renal Pathophysiologic Features, *J Am Soc Nephrol*, Germany, (p. 5106-5115).
76. Leo and Rosen Gloria, 2017, What Is Wilms Tumor?, 2017 American Cancer Society, Inc., USA, (p. 1-3).
77. Medicine® A. S., WT1 Gene, 2017, Genetics Home Reference <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/WT1>, NIH (U.S. National Library of Medicine), USA, (p. 1-6).
78. Zamora Avila D. E., Zapata Benavides P., Franco Molina M. A., Saavedra Alonso S., Trejo Avila L. M., Reséndez Pérez D., Méndez Vázquez J. L., Badillo Isaisa J., Rodríguez Padilla C., 2009, WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits

B16-F10 lung metastases growth, Cancer Gene Therapy, Nuevo León, México, (p. 892-899).

79. Hernández Fernández Rolando A., 2011, El tumor de wilms. Un paradigma de heterogeneidad genética, Revista Habanera de Ciencias Médicas, Habana, Cuba, (p. 213-223).

80. Zamora-Avila D. E., Franco-Molina M. A., Trejo-Avila L. M., Rodriguez-Padilla C., Resendez-Perez D., 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).

81. Muñoz Chápuli Ramón, Carmona Rita, Gonzalez Iriate Mauricio, Macías David, Perez Pomares José María, 2003, Las múltiples caras del gen WT1: funciones en el desarrollo e implicaciones clínicas, Acta pediátrica de México, México, (p. 29-38).

82. Nakatsuka Shin-ichi, Yusuke Oji, Tetsuya Horiuchi, Takayoshi Kanda, Michio Kitagawa, Tamotsu Tekeuchi, Kiyoshi Kawano, Yuko Kuwae, Akira Yamauchi, Meinoshin Okumura, Yayoi Kitamura, Yoshihiro Oka, Kawase Ichiro, Haruo Sugimaya, Aozasa Katsuyuki, 2006, Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells, Modern Pathology, Japan, (p. 804-814).

83. Scharnhorst Volkher, van der Eb Alex J., Jochemsen Aart G., 2001, WT1 proteins: functions in growth and differentiation, GENE AND GENOMAS, Wassenaarseweg, Netherlands, (p. 141-171).

84. Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner K-D, 2008, The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration:expression in tumour vessels in vivo, Oncogene, France, (p. 3662-3672).

85. Young Guy, Toretsky Jeffrey. A., Campbell Andrew B., Eskenazi Allen E., 2000, Recognition of common Childhood Malignancies, Am Fam Physiciam, Baltimore, Maryland, (p. 2144-2154).

86. NCBI, Gene, 2017, WT1 Wilms tumor 1 [*Equus caballus* (horse)], NCBI, USA, (p. 1).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100072704>

87. NCBI, Gene Bank, 2013, PREDICTED: Equus caballus Wilms tumor 1 (WT1), mRNA, NCBI, USA, (p. 1).
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_005612334.1?report=genbank
88. NCBI, GenBank, 2016, Equus caballus Wilms tumor 1 protein (WT1) gene, partial cds, NCBI, USA, (p. 1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AH008865.2>
89. Brouillette James. A., Andrew Jennifer R., Venta Patrick J., 2000, Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method, Mammalian Genome, USA, (p. 1079-1086).
90. Garza Rodríguez O. I., Zamora Avila D. E., Zapata Benavides P., Trejo Chávez A., Cedillo Rosales S., Zarate Ramos J. J., 2015, *Análisis de la expresión del gen WT1 (Tumor de Wilms) en melanoma equino, Tesis-MC*, Escobedo, Nuevo León, (p. 1-60).
91. King Michael W., 2015, Los miembros individuales de la familia de PPAR, The medical biochemistry, (p. 1-10).
92. Tyagi Sandeep, Gupta Paras, Singh Saini Arminder, Kaushal Chaitnya, Sharmahe Saurabh, 2011, The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases, J. Adv. Pham. Tech. Res., Punjab, India, (p. 184-187).
93. Lemay Danielle G. and Hwang Daniel H., 2006, Genome-wide identification of peroxisome proliferators response elements using integrated computational genomics. *J. Lipid Research*, Davis, CA, USA, (p. 1583-1587).
94. Guan Youfei and Breyer Matthew D, 2001, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease, *Kidney International*, Nashville, Tennessee, USA, (p. 14-30).
95. Zoete Vincent, Grosdidier Aurelien, Michielin Olivier, 2007, Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Switzerland, (p. 915-925).
96. Han Shou Wei, Roman Jesse, 2010, Anticancer actions of PPAR γ ligands: Current state and future perspectives in human lung cancer, *World Journal of Biological Chemistry*, (p. 31-40).
97. Heligon Christophe, 2012, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *Transcription factor encyclopedia*, Vancouver Canada, USA, (p. 1-5)

98. Michalik Liliane, Desvergne Béatrice, Wahli Walter, 2004, Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors and Cancers: Complex Stories, NATURE REVIEWS, Lausanne Switzerland, (p. 61-70)
99. Michalik Liliane and Walter Wahli, 2007, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease, *Biochim Biophys Acta*, Switzerland, (p. 991-998).
100. Rodríguez Martín M., 2008, Targeting the PPARs, Med Cutan Iber Am, California, San Francisco, USA, (p. 161-163).
101. Dunning Kylie R., Anastasi Marie R., Zhang Voueleng J., Russell Darryl L., Robker Rebecca L., 2014, Regulation of Fatty Acid Oxidation in Mouse CumulusOocyte Complexes during Maturation and Modulation by PPAR Agonists, PLOS ONE, Australia, (p. 1-11).
102. NCBI, Gene, 2017, PPAR δ peroxisome proliferator activated receptor delta [*Equus caballus* (horse)], NCBI, USA (p.1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=100053404>
103. Hyun-Woo Cho, Sangsu Shin, Jeong-Woong Park, Jae-Young Choi, Nam-Young Kim, Woon-Kyu Lee, Hak-Kyo Lee, Ki-Duk Song, Byung-Wook Cho, 2015, Molecular Characterization and Expression Analysis of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR δ) Gene before and after Exercise in Horse, Asian-Australas J Anim Sci., Korea, (p. 697-702).
104. Lee Chih-Hao, Olson Peter, Hevener Andrea, Mehl Isaac, Chong Ling-Wa, Olefsky Jerrold M., Gonzalez Frank J., Ham Jungyeob, Kang Heonjoong, Peters Jeffrey M., Evans Ronald M., 2006, PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity, Proc Natl Acad Sci USA, USA, (p. 3444-3449).
105. Angione Alison R., Jiang Chunhui, Pan Dongnig, Wang Yong-Xu, Kuang Shihuan, 2011, PPAR δ regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration, Skelet Muscle, USA, (p. 1-33).
106. Berger Joel and Moller David E., 2002, The mechanisms of action of PPARs, Annu Rev Med, USA, (p. 409–435).

107. Wahli W., Braissant O., Desvergne B., 1995, Peroxisome proliferator activated receptors: Transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more, *Chem Biol*, Switzerland, (p. 261–266).
18. Wilsher M. and Cheerla, 2007, WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: an immunohistochemical study of whole sections, *Histopatology*, Australia, (p. 605-610).
109. Perry Betsy N., Cohen Cynthia, Govindarajan Baskaran, 2006, Wilms Tumor 1 Expression Present in Most Melanomas but Nearly Absent in Nevi, *Arch Dermatology*, USA, (p. 1031-1034).
110. Soto-Domínguez Adolfo, Serrano-Gallardo Luis B., García-Garza Rubén, Ruíz-Flores Pablo, Morán-Martínez Javier, Nava-Hernández Martha P., Martínez-Pérez Edith F., 2013, El Extracto Acuoso de *Ruta graveolens* del Norte de México Causa Apoptosis y Muestra Efecto Antiproliferativo sobre el Hígado de Rata Wistar: Evidencia Morfológica, *Int. J. Morphol.*, México N.L., (p. 1340-1348).