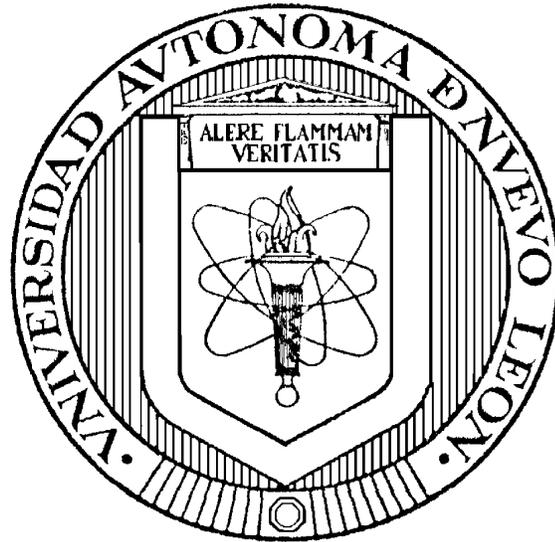


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**VALOR PRONÓSTICO DE LA INMUNORREACTIVIDAD A WT-1 EN
LAS NEOPLASIAS DE MÚSCULO LISO EN PEQUEÑAS ESPECIES**

PRESENTA

JAIME EDUARDO ELIZONDO CANTÚ

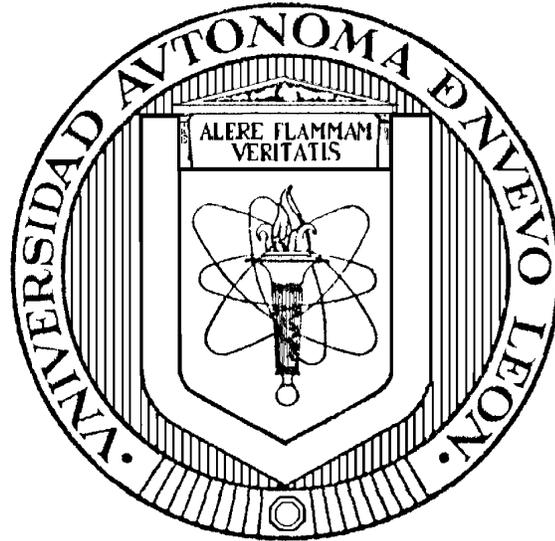
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ENERO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

**VALOR PRONÓSTICO DE LA INMUNORREACTIVIDAD A WT-1 EN
LAS NEOPLASIAS DE MÚSCULO LISO EN PEQUEÑAS ESPECIES**

PRESENTA

JAIME EDUARDO ELIZONDO CANTÚ

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

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

ENERO, 2019

**“VALOR PRONÓSTICO DE LA INMUNORREACTIVIDAD A WT-1 EN LAS
NEOPLASIAS DE MÚSCULO LISO EN PEQUEÑAS ESPECIES”**

POR

MVZ. JAIME EDUARDO ELIZONDO CANTÚ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Aprobación de la Tesis:



PhD. Rafael Ramírez Romero

DIRECTOR DE TESIS



MC. Cecilia Ramírez Hernández

CODIRECTORA DE TESIS



PhD. Emilio Olivares Sáenz

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer de manera muy profunda a CONCAYT, cuyo apoyo fue invaluable para mi estancia en la maestría.

Así mismo, quisiera agradecer a ambas facultades, FMVZ y FA, ya que su enseñanza, sus maestros y su ambiente fueron indispensables para mi desarrollo académico.

Al PhD. Rafael Ramírez Romero, que a lo largo de años ha transmitido e impreso un conocimiento monumental a todas las personas que tenemos el placer de convivir con él. Sus enseñanzas y consejos permanecerán en mi mente hasta el día que muera. Así mismo agradecerle su inversión económica en los recursos para la elaboración de esta tesis.

Quiero agradecer de la manera más atenta a la MC Cecilia Ramírez, ya que de la manera más amable siempre tomó un poco de su tiempo para facilitarme la toma de micrografías y para apoyarme académicamente en el transcurso de mi maestría. Eso jamás lo voy a olvidar.

También quisiera agradecer al equipo técnico del Laboratorio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario, ya que me brindaron la capacitación técnica que utilicé en este trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a todas las personas que creyeron en mi trabajo, que depositaron su confianza, tiempo y esfuerzo en mi persona sin importar absolutamente nada, y que conmigo tomarán los frutos de la grandeza y el éxito que muy pronto serán apreciables a la vista y al tacto.

También quiero hacerle una dedicatoria a mi perro Brownie, quien murió de una forma trágica y triste mientras yo apenas cursaba segundo semestre de licenciatura. Su muerte me brindó la iniciativa de buscar el por qué los animales se enferman y mueren, iniciándome en el camino de la patología. Siempre quise dedicarle un logro de estos.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Revisión de literatura.....	2
Sarcomas de tejidos blandos (STB).....	2
Componentes celulares para las Inmunohistoquímicas.....	3
Wilm's Tumor 1 (WT-1).....	4
Morfología y biología de los tumores de músculo liso.....	5
Valor pronóstico en base a la morfología tumoral de STB.....	10
Justificación.....	11
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	11
Materiales y métodos.....	11
Lugar de estudio.....	11
Información de casos.....	11
Obtención y manejo de muestras.....	12
Proceso histológico de H&E.....	12
Proceso histoquímico.....	12
Proceso de inmunohistoquímica.....	12
Criterios para el diagnóstico.....	13
Diseño estadístico.....	13
Resultados.....	14
Histopatología de los casos.....	14
Discusión.....	22
Conclusión.....	24
Referencias.....	25

ABREVIATURAS

STB (Sarcoma de Tejidos Blandos)

WT-1 (Wilm's Tumor 1)

LM (Leiomioma)

LMS (Leiomiosarcoma)

IHQ (Inmunohistoquímicas)

FLM (Fibroleiomioma)

TPP (Tumores de la pared perivascular)

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Leiomioma (H&E)
- Figura 2.** Leiomioma (Tricrómica de Masson)
- Figura 3.** Leiomioma (IHQ)
- Figura 4.** Leiomioma (IHQ)
- Figura 5.** Leiomioma (H&E)
- Figura 6.** Leiomioma (IHQ)
- Figura 7.** Leiomioma (H&E)
- Figura 8.** Leiomioma (H&E)
- Figura 9.** Leiomioma (IHQ)
- Figura 10.** Leiomioma (IHQ)
- Figura 11.** Leiomiosarcoma (H&E)
- Figura 12.** Leiomiosarcoma (macroscópico)
- Figura 13.** Leiomioma (H&E)
- Figura 14.** Leiomioma (IHQ)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tejidos de origen de los sarcomas de tejidos blandos

Tabla 2. Lista de casos

Tabla 3. Resultados

RESUMEN

Los tumores de músculo liso pertenecen a una amplia familia de neoplasias derivadas del mesénquima; estas pueden originarse desde los músculos piloerectores, medias vasculares o vísceras huecas. La analogía con las afecciones neoplásicas en medicina humana es evidente; en los humanos, las neoplasias que son inmunorreactivas a la proteína del gen WT-1 en los procedimientos de inmunohistoquímica generalmente tienen un peor pronóstico para el paciente.

El objetivo principal de este estudio es utilizar este biomarcador en los perros, y así, poder brindar un pronóstico en base al hallazgo de la proteína del gen WT-1 en los tumores de músculo liso.

Se utilizaron 21 muestras de tumores, de los cuales 11 son leiomiomas y 10 leiomiosarcomas. Estos tumores provienen de diferentes partes del cuerpo. 20 muestras proceden de caninos y 1 de un felino. De 20 neoplasias caninas, 17 eran de hembras, 3 de machos y la restante era de un felino macho. Se utilizó la tinción de Tricrómica de Masson para probar que estos tumores eran de origen muscular, posteriormente se sometieron a las inmunohistoquímicas empleando anticuerpos monoclonales contra la proteína α actina de músculo liso y la proteína del WT-1.

Los resultados arrojaron 3 leiomiomas positivos a la proteína de WT-1 y 8 leiomiomas negativos, así como 1 leiomiosarcoma positivo a la proteína del WT-1 y 9 leiomiosarcomas negativos.

Debido a la baja positividad de estas neoplasias contra WT-1, se optó por utilizar una simple proporción. El 27.27% de los leiomiomas fueron positivos, así como 10% de los leiomiosarcomas fueron positivos, contrastando notoriamente con los trabajos de otros autores que han empleado este biomarcador en patología humana. Se observó una tendencia de estos tumores para aparecer en hembras caninas, así como sobre expresar WT-1 de manera nuclear en algunos leiomiomas genitales en hembras. Sin embargo, el uso de las inmunohistoquímicas contra la proteína del gen WT-1 para predecir comportamiento biológico en perros, al menos en este estudio, no fue de utilidad.

ABSTRACT

Smooth muscle tumors are included in a big family of neoplasms derived from mesenchyme; these could be originated from arrector pili muscles, vascular media or hollow viscera. The analogy with neoplastic diseases in human medicine are evident; in humans, neoplasms that are immunoreactive to the WT1 protein usually have a poor prognosis to the patient.

The objective of this study was to use this biomarker as a prognostic marker in dogs, and be able to provide a prognosis based on the finding of WT-1 protein in smooth muscle tumors.

21 tumor samples were used, of which 11 are leiomyomas and 10 leiomyosarcomas. These tumors are derived from different parts of the body. 20 samples are from dogs, and the other one from a feline. Of 20 canine neoplasms, 17 were from female dogs, 3 from male dogs and the other one from a male cat. We use Masson Trichrome stain to prove the muscular origin of the neoplasm, subsequently the IHC process was carried out.

The IHC resulted in 3/11 WT1 positive leiomyomas and 1/10 leiomyosarcoma.

Due to the low positivity of these neoplasms to WT1 IHC, it was chosen the use of simple proportions. 27.27% of leiomyomas were positive, as well as 10% of leiomyosarcomas were positive, contrasting with other works from different authors in human pathology. Despite of a tendency of these tumors to appear in canine females, as well as on expressing nuclear WT-1 in some genital leiomyomas in females, the use of immunohistochemistry against the WT-1 gene protein to predict biological behavior in dogs, at least in this study, was not useful.

1. INTRODUCCIÓN

En este texto se utilizará de manera indiferente la denominación “tumor”, haciendo referencia al término “neoplasia”, esto con el fin de no causar confusión sobre el lector.

Cabe mencionar que en las poblaciones animales que incluyen al perro y el gato, la morfología, presentación clínica y comportamiento de los tumores de la familia de los Sarcomas de Tejidos Blandos son muy similares a los que ocurren en el hombre (Di Cerbo *et al.*, 2014). Se ha subestimado el valor que tiene el uso de las mascotas como modelos experimentales comparativos para las neoplasias en el hombre, ya que un perro o un gato tiene un promedio de vida muy corto relativamente en comparación al del hombre y por consiguiente, la neoplasia tiene la capacidad de desarrollarse a su máximo potencial en un menor tiempo, sin olvidar que histológicamente y al momento de aplicar terapias antineoplásicas sus resultados son muy comparables con lo descrito en medicina humana (Cekanova & Rathore, 2014). El uso de la morfología al microscopio de luz sigue siendo un pilar excepcional y la piedra angular en el reconocimiento de los tumores, ya que con esto se puede dar un dictamen más acertado enfocado a la malignidad y el pronóstico del tumor que se trate (Rosai, 2007).

Los tumores de músculo liso se dividen en benignos y malignos, leiomiomas y leiomiomasarcomas, respectivamente (Miettinen & Fetsch, 2006). Estos tienden a incidir sobre el aparato genital de la mujer Lee *et al.* (2009), y su clasificación dependerá del hallazgo morfológico de atipia y actividad mitótica que demuestren a la histopatología (Miettinen & Fetsch, 2006); a pesar de esto, en ocasiones, es complicado predecir el comportamiento biológico de los tumores de músculo liso del aparato reproductor de la mujer con sólo su morfología histológica (Lee *et al.*, 2009), debido a lo anterior, se ha optado usar diferentes inmunomarcadores para poder así intentar predecir el comportamiento biológico del tumor. Se ha observado que los tumores de músculo liso pueden sobre expresar la proteína del gen *WT-1* de manera nuclear en la inmunohistoquímica (Nakatsuka *et al.*, 2006; Deavers, 2008). Esta clase de trabajos también se han realizado en sarcomas óseos y sarcomas de tejido blando, observando una fuerte sobre expresión de WT-1 y pudiendo relacionar la misma expresión como factor

pronóstico (Ueda *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2009). Satobori *et al.* relacionaron la sobre expresión de WT-1 con el comportamiento clínico de algunos sarcomas de tejido blando. En tumores sólidos de útero (Oji *et al.*, 1999) y en leiomiomas (Coosemans *et al.*, 2007) también se ha logrado observar una fuerte sobre expresión de WT-1. Miyoshi *et al.*, 2002 logró relacionar la sobre expresión de la proteína del WT-1 en las neoplasias mamarias de la mujer; este relacionó la sobre expresión de WT-1 y los bajos tiempos de vida de estas mujeres. Al menos en perros, ya está comprobado que una alteración en el p53 se relaciona con un gran número de neoplasias, y se ha descrito que al menos este biomarcador sirve para predecir pronósticos en algunos tumores mamarios (Lee & Kweon, 2002), abriendo la posibilidad de utilizar otros biomarcadores con la finalidad de poder establecer un factor pronóstico en un gran número de neoplasias. Recientemente se ha intentado identificar la proteína WT1 en tumores mamarios de la perra; sin embargo, a pesar de la inmunoreactividad en algunos casos, los resultados fueron inconstantes. Su inmunoreactividad fue siempre citoplásmica (Carranza *et al.*, 2015).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Sarcomas de tejidos blandos

Los sarcomas de tejido blando conforman una amplia familia de neoplasias muy heterogénea morfológicamente, las cuales se originan del mesénquima, un tejido que proviene del mesodermo (Cormier & Pollock 2004). Se estima que las neoplasias de mesénquima son el 10 % de todas las neoplasias que ocurren en personas (Mohseny & Hogendoorn, 2011). En el hombre, estas neoplasias pueden aparecer en todo el cuerpo, pero con especial afinidad en el espacio retroperitoneal, tronco, sistema genitourinario, cabeza y cuello (Cormier & Pollock, 2004), mientras que el perro son mucho más comunes en los tejidos cutáneos y subcutáneos (Dennis *et al.*, 2011) y aparato reproductor de las perras (Meuten, 2017). La histogénesis de los sarcomas de tejidos blandos sigue dando mucho de qué hablar, debido a su complejidad. Las células madres del mesénquima tienen la capacidad de formar estructuras vasculares, hueso o cartílago y desarrollar estructuras

con amplia variabilidad morfológica (Mohseny & Hogendoorn, 2011). Los sarcomas de tejidos blandos de células elongadas más comunes del perro y gato son los fibrosarcomas, mesenquimomas, leiomiosarcomas, liposarcomas, sarcomas pleomórficos (antes llamados histiocitomas fibrosos malignos), schwannomas malignos, los tumores de la pared perivascular y hemangiosarcomas (Tabla 1). Además son muy complicados a la hora de apreciar su estructura morfológica al microscopio de luz, ya que tienden a formar estructuras como remolinos, ir en palizada en una matriz colagenoide muy densa o mixoide y así mismo mostrar un patrón histológico similar entre ellos siendo neoplasias de diferente histogénesis (Dennis *et al* 2011; Hendrick, 2017). Los tumores de células elongadas poseen una complejidad diagnóstica prominente. La World Health Organization (WHO), fue la que en 2002 definió su clasificación.

Está descrito que un defecto en la diferenciación mesenquimatosa es lo que promueve el desarrollo de los leiomiosarcomas y algunos otros sarcomas (Mohseny & Hogendoorn, 2011).

Origen	Benigno	Maligno
Tejido conectivo fibroso	Fibroma Mixoma	Fibrosarcoma Mixosarcoma
Tejido adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Músculo liso	Leiomioma	Leiomiosarcoma
Músculo estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Vasos sanguíneos y linfáticos	Hemangioma Linfangioma	Hemangiosarcoma Linfangiosarcoma
Nervios periféricos	Tumor de la raíz nerviosa Neurofibroma Schwannoma	Tumor maligno de la raíz nerviosa Neurofibrosarcoma Schwannoma maligno

Tabla 1. Origen de algunos sarcomas de tejido blando en pequeños animales. Modificado de Baba, 2007.

2.2. Componentes celulares para la inmunohistoquímica

Es pertinente comentar que en algunos casos se necesita de otros recursos para llegar a un diagnóstico más adecuado y evitar confusiones, como lo es la inmunohistoquímica (IHQ), un arma que beneficia el diagnóstico de las neoplasias menos diferenciadas (Lin & Liu, 2014). Como es el caso con los sarcomas de tejidos blandos, los cuales tienen como

naturaleza histológica la morfología elongada que exhibe una gran cantidad de patrones morfológicos, la IHQ es necesaria para su diferenciación ante el grupo tan vasto y heterogéneo de las neoplasias que conforman esta familia. Su uso es muy habitual en la medicina veterinaria. En los tumores de músculo liso se ha descrito un marcaje específico con actina de músculo liso (SMA) y desmina (Lin & Liu, 2014).

La SMA y la desmina forman parte del citoesqueleto de la célula eucariota animal (Small & Gimona, 1998). La desmina es un componente de los filamentos intermedios que se expresa única y fuertemente en células musculares y endoteliales (Costa *et al.*, 2004), mientras que la SMA es un componente de los microfilamentos; forma parte del anclaje de la membrana de la célula muscular lisa con su medio externo (Gunst & Zhang, 2008). Estos componentes serán los apropiados para definir el origen muscular liso de las neoplasias al momento de realizar las IHQ.

2.3. Wilm's tumor 1 (WT-1)

En 1899 el médico pediatra Max Wilms describió un tumor de infantes, el cual se localizaba en los riñones. A este tumor se le denominó tumor de Wilm's (nefroblastoma) (Scholz & Kirschner, 2005). El desarrollo de los riñones es un proceso complicado que requiere diferenciación y apoptosis para poder definir la estructura final del riñón (Mrowka & Scheld, 2000). Esencialmente esto se debe a una transición mesenquimo-epitelial mediada por la proteína WT-1 (Rauscher, 1993). El gen de *WT-1* consiste de 10 exones y mide ~50 kb, se localiza en el cromosoma 11p13 y a parte de promover la formación del aparato genitourinario también promueve la diferenciación del corazón y tejidos mesoteliales Scholz & Kirschner (2005); su producto es una proteína que puede funcionar de 2 formas: como factor de transcripción (Scholz & Kirschner 2005) y como supresor tumoral (Kreidberg *et al.*, 1993).

La estructura de la proteína incluye un dominio de unión al ADN, este dominio está conformado por 4 dedos de zinc compuestos de cisteína-histidina en la región COOH- para la unión a los ácidos nucleicos y una zona de prolina-glutamina que regula la transcripción (Scholz & Kirschner, 2005; Rauscher, 1993). La alteración en la función de

esta proteína está relacionada con trastornos tumorales como el nefroblastoma, así como el Síndrome de Frasier, el cual es un síndrome nefrótico lentamente progresivo que lleva a cambios morfológicos glomerulares esclerosantes o bien, el síndrome de Denys-Drash, el cual es un raro síndrome de la infancia que conlleva a esclerosis de las células del mensangio, hipertensión severa y a una grave progresión a un estadio final renal (Mrowka & Scheld, 2000). Los pacientes con Síndrome de Denys-Drash son altamente proclives a padecer nefroblastoma, mientras que aquellos que poseen Síndrome de Frasier se encuentran exentos de padecer nefroblastoma. Está descrito que alteraciones en el gen de la proteína de WT-1 trae consigo otras alteraciones fuera del aparato urogenital, como lo es el mesotelioma, cáncer mamario y leucemia (Mrowka & Scheld, 2000).

2.4. Morfología y biología de los tumores de músculo liso y otros Sarcomas de Tejido Blando

Como regla general el sufijo -oma- hace referencia a tumores que poseen un comportamiento biológico benigno, mientras aquellos tumores que posean el sufijo -sarcoma- poseen un comportamiento biológico maligno, mientras que su prefijo denota su tejido de origen, p. ej. fibrosarcoma es un tumor originado de las células del tejido conectivo fibroso (Newkirk *et al.*, 2017). La pertinente clasificación de estas neoplasias está en manos del patólogo, ya que dependiendo de su capacitación y experiencia, podrá emitir una descripción adecuada para este grupo de sarcomas. Los leiomiomas y leiomiomas generalmente poseen un patrón fascicular o en palizada paralela, pero en ocasiones pueden generar remolinos, cambios microquísticos u otros patrones que puedan ser distintivos de otras malignidades del mismo grupo (Dennis *et al.*, 2011; Cooper & Valentine, 2017). Los fibrosarcomas también poseen un patrón en palizada como los tumores derivados de músculo, aunque estos generalmente exhiben un patrón en greca, y ocasionalmente pueden generar remolinos y tener una apariencia de tumores derivados de estructuras nerviosas (Hendrick, 2017). En el hombre algunos lipomas comparten estas características fusiformes, un ejemplo es el lipoma de células elongadas. A pesar de que los lipocitos se observen ovales, de citoplasma vacuolado y núcleo excéntrico, esta línea de malignidades comparte la forma elongada típica de un sarcoma de tejido blando

(Fisher, 2013); en veterinaria el liposarcoma mixoide puede contener células elongadas también (Hendrick, 2017).

Los tumores de músculo liso son una familia de malignidades que derivan del mesénquima (Cormier & Pollock 2004), y se denominan leiomiomas, los cuales poseen un comportamiento biológico benigno, y leiomiosarcomas, los cuales poseen un comportamiento biológico maligno. Generalmente el aspecto morfológico de estas neoplasias es dicotómico (Miettinen & Fetsch, 2006). Estos tumores anatómicamente puede aparecer en 3 localizaciones: la musculatura piloerectora, en las medias de los vasos sanguíneos, piel areolar y vísceras huecas (Holst *et al.*, 2002; Cooper & Valentine, 2017).

En el caso de los leiomiomas, generalmente son tumores no invasivos que no están encapsulados, pero a pesar de esto último, no poseen potencial metastásico. Su población celular es muy densa y el citoplasma de estas células generalmente es indistinguible y eosinofílico, su estructura es generalmente fusiforme, y sus núcleos son de extremos romos (Cooper & Valentine, 2017). A la forma de los núcleos también se le puede denominar “cigar-shaped”, que traducido sería “en forma de puro” (Cooper & Valentine, 2017). Estos tumores no poseen elementos inflamatorios, necrosis o atipia (Holst *et al.*, 2002) y en muchas ocasiones las células pueden mostrar vacuolización citoplásmica o un cambio degenerativo muy común en los leiomiomas denominado “degeneración microquística”, el cual se desarrolla a partir de una matriz extracelular edematosa (Meuten, 2017; Holst *et al.*, 2002). A pesar de esto, su diagnóstico se puede complicar, ya que otros tumores derivados del mesénquima pueden mostrar un aspecto similar, y pueden verse como tumores de células elongadas o formar remolinos que pueden ser confusos para el patólogo, el cual deberá de buscar un área microanatómica en la laminilla que le brinde la pauta de la morfología original del tejido (Dennis *et al.*, 2011), o bien, someter el espécimen a un amplio panel de inmunohistoquímicas.

Los leiomiosarcomas varían morfológicamente de los leiomiomas, y su comportamiento biológico también. La morfología de este tumor maligno contiene células atípicas, anisocariosis y pueden mostrar una zona blanca perinuclear (vacuola paranuclear) que da a conocer su origen muscular liso (Holst *et al.*, 2002; Fisher, 2013), aunque en ocasiones pueden mostrarse relativamente homogéneos, con las típicas células elongadas en

palizada, recordando a su tejido de origen (Cooper & Valentine, 2017). Usualmente el leiomioma es más hiper celular que el leiomioma. Cuando estos tumores son muy pleomórficos, pueden encontrarse células que van de morfología oval a redonda, con una cantidad abundante de mitosis, y en ocasiones, pueden mostrar degeneración microquística (Meuten, 2017; Holst *et al.*, 2002). En ocasiones, los leiomiomas pueden exhibir un patrón de palizada nuclear (Fisher, 2013)

Los angioleiomiomas y los piloleiomiomas son tumores raros en la piel del perro y el gato, y de hecho, sólo están descritos en estas especies domésticas (Hendrick, 2017). En el hombre el angioleiomioma es más común clínicamente que en el perro y el gato; incide más comúnmente sobre las extremidades (Holst *et al.*, 2002), mientras que en el perro y el gato pueden encontrarse sobre el dorso, extremidades u hocico (Hendrick, 2017). Estos últimos son formas de leiomiomas o leiomiomas que se desarrollan de la musculatura lisa de la media de los vasos sanguíneos o los músculos piloerectores, respectivamente. Los angioleiomiomas generalmente forman hendiduras vasculares en los animales (Meuten, 2017), pero existen 3 clasificaciones para los angioleiomiomas en el hombre: sólido, cavernoso y venoso (Holst *et al.*, 2002). Su escisión quirúrgica resulta ser curativa en la mayoría de los casos (Liu & Mikaelian, 2003). La pertinente clasificación de estas neoplasias sienta sus bases en los patrones vasculares encontrados al momento de ver el espécimen.

Los hamartomas de los músculos piloerectores son otro grupo de lesiones pseudo-neoplásicas que algunos autores colocan en el grupo de tumores de músculo liso (Hendrick, 2017; Holst *et al.*, 2002; Liu & Mikaelian, 2003). Los hamartomas se clasifican como errores del desarrollo de algún componente o componentes de un tejido; estos se encuentran al momento de nacer y no son invasivos (Machida *et al.*, 2002). Histológicamente los hamartomas de músculos piloerectores se componen de fibras musculares lisas hiperplásicas que van en palizada (Holst *et al.*, 2002). Algunos autores denominan a estos crecimientos hiperplásicos como nevos colagenosos (Hendrick, 2017).

Se describió anteriormente un poco acerca de los patrones histopatológicos que generan los sarcomas de tejido blando, pero es necesario describirlos a detalle, porque esto es esencial en la decisión del patólogo para colocar en ciertos grupos tumorales a ciertas

malignidades. Los tumores del tejido conectivo, el fibroma y el fibrosarcoma generalmente se organizan en un patrón fascicular paralelo o entretejido o bien, el patrón en grecas, produciendo de abundante a escasa matriz colagenoide, respectivamente, sus núcleos son alargados u ovoides de nucléolo inconspicuo; generalmente los fibrosarcomas son más hiper celulares y pueden contener algunas células multinucleadas (Hendrick, 2017). En ocasiones otros tumores como los liposarcomas de células elongadas (liposarcoma pleomórfico) pueden apreciarse como si fueran fibromas (Weiss, 1994; Fisher, 2013), aunque en ocasiones pueden presentar un moderado pleomorfismo que hace ver a las células más ovoides y su valor diagnóstico radica en encontrar una vacuola lipídica citoplásmica o múltiples vacuolas pequeñas; las células poligonales pleomórficas ocasionalmente pueden mostrar esta vacuolización. Una sección de únicamente células en fascículos paralelos de un liposarcoma pleomórfico, sin evidencias de vacuolas citoplásmicas, puede conllevar a una confusión morfológica. A pesar de que los tumores de músculo liso se pueden organizar de forma fascicular o en manojos intersectantes como se describió anteriormente, algunos autores describen que los tumores de músculo liso pueden llegar a presentar patrones morfológicos de greca, aunque esto brinda poca especificidad a la hora del diagnóstico y no es patognomónico (Cooper & Valentine, 2017). En el caso de los tumores vasculares, estos también están conformados por células elongadas, aunque su morfología puede ser variable y puede existir algo de pleomorfismo, haciendo que las células sean poligonales también; esto último es muy común en los hemangiosarcomas (Hendrick, 2017). Para los leiomiomas provenientes de la media de los vasos sanguíneos (angioliomiomas/angioliomiosarcomas) se puede apreciar la vasculatura excesiva y ensanchada (manojos de media) aunada a fascículos de células neoplásicas (Weiss, 1994) estos leiomiomas y leiomiosarcomas provienen de la amplia familia de los tumores de la pared perivascular, los cuales se describen adelante. Algunos leiomiosarcomas pueden apreciarse muy pleomórficos, demostrando células más ovoides y atípicas (Cooper & Valentine, 2017).

Tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, algunos tumores diagnosticados como leiomiomas o leiomiosarcomas desarrollados del sistema gastrointestinal han tenido que ser incluidos en un grupo complicado de tumores originados de otras partes del estroma del sistema gastrointestinal, haciendo una gran división; aquellos tumores que se

originan en la musculatura lisa y aquellos que se desarrollan de otras zonas inciertas del estroma gastrointestinal (Russell *et al.*, 2007). Se ha propuesto que el origen de los tumores estromales gastrointestinales es algún tipo de célula madre primitiva que se diferencia en células intersticiales de Cajal o leiomiocitos (Russell *et al.*, 2007). Esto último es importante, ya que estos tumores se comportan de diferente manera biológica. Otro grupo de sarcomas de tejido blando necesarios de mencionar son los tumores de la pared perivascular (TPP), este grupo de neoplasias deriva de todas las células murales de los vasos sanguíneos, con excepción de la línea endotelial, de la cual se originan los hemangiomas y hemangiosarcomas. Los miembros de la amplia familia de los TPP son el tumor glomoso, hemangiopericitoma, miopericitoma, angioleiomioma/sarcoma, angiomiofibroblastoma y el angiofibroma (Avallone *et al.*, 2007). Algunos autores han decidido simplemente colocar como diagnóstico “tumor de la pared perivascular” en sus hojas diagnósticas, ya que es una terminología más adecuada debido a los variables patrones morfológicos que estos ofrecen y la común confusión que pueden ocasionar al momento del diagnóstico; de hecho, el hemangiopericitoma es una neoplasia sobre diagnosticada (Hendrick, 2017). En general este último grupo de tumores posee un comportamiento biológico muy similar, y es por esto es pertinente su denominación general como tumores de la pared perivascular. Su caracterización específica se da a través del uso de algunos marcadores de inmunohistoquímica y su morfología puede variar desde patrones placentoides, manojos de media o remolinos perivascuales/de adventicia, entre otros patrones vasculares (Avallone *et al.*, 2007). Para los tumores de origen nervioso, los cuales pueden simular la apariencia de otros tumores de mesénquima (fibroma o leiomioma) o tumores melanocíticos (melanoma amelanico) se pueden mencionar los schwannomas (antes neurilemomas), neurofibrosarcomas o perineuromas dependiendo de los componentes de la vaina nerviosa que posean; células de schwann para los schwannomas, células de schwann, fibrocitos y células perineurales para los neurofibromas/sarcomas y solamente células perineurales para los perineuromas; cuando estos tumores ofrecen patrones pleomórficos suelen ser denominados “tumor de la raíz nerviosa” o “tumor maligno de la raíz nerviosa” (Higgins *et al.*, 2017; Schulman *et al.*, 2009). Generalmente estos tumores poseen un patrón en palizada paralela (Antoni tipo A) y patrón hipocelular mixoide donde las células de schwann se encuentran dispuestas al

azar (Antoni tipo B). En ocasiones hay palizada nuclear y a eso se le denomina cuerpos de Verocay. Los perineuromas poseen un patrón de remolino (Schulman *et al.*, 2009). Muy comúnmente los melanomas amelanícos desarrollan patrones muy similares a los tumores derivados de la vaina nerviosa, de hecho estos melanomas muy ocasionalmente desarrollan diferenciación neuroidal (Goldschmidt & Goldschmit, 2017). Estos melanomas deben de ser diferenciados de manera pertinente de otros sarcomas de células elongadas, ya que el comportamiento biológico de algunos melanomas amelanícos son en extremo agresivo, mientras que un tumor de la vaina nerviosa generalmente es reincidente e infiltrante, pero no metastásico. En medicina veterinaria el término Melanocitoma denota a un tumor de origen melanocítico de comportamiento benigno, en medicina humana se les denomina Nevo. Los melanocitomas poseen patrones variables, algunos pueden ser de células elongadas y otros de estirpes poligonales o bien, pueden tener patrones mixtos (Goldschmidt & Goldschmit, 2017).

2.5. Valor pronóstico con base a la morfología tumoral de los Sarcomas de Tejido Blando

Actualmente existen diversos criterios para mejorar los diagnósticos y pronósticos en la patología, tanto veterinaria así como de humanos. Estos criterios tratan de darle al paciente un diagnóstico más acertado, así como brindarle un valor pronóstico a la neoplasia de manera más acertada. De manera general, esto se consigue graduando a la neoplasia y reportando los márgenes quirúrgicos (Stromberg & Meuten, 2017). La forma más eficaz de llevar esto a cabo es a través de los conteos mitóticos; el criterio parte en contar las mitosis en el espécimen en 10 campos de 40X. Las zonas que son más diagnósticas son las zonas periféricas del tumor, así como las zonas más alejadas de la necrosis; aunque también se puede establecer a través del porcentaje de necrosis y el grado de diferenciación de la neoplasia. Reportar todos los bordes quirúrgicos en especímenes de gran tamaño puede ser muy costoso, y en medicina veterinaria puede perder practicidad (Stromberg & Meuten, 2017). La pertinente graduación de los STB generalmente es más importante para los sarcomas de células redondas; estos tumores comúnmente más agresivos que los tumores de células elongadas, p ej. un linfoma o un mastocitoma son generalmente más agresivos que un fibrosarcoma o un tumor de la pared perivascular.

3. Justificación

Debido a que los estudios en patología comparativa del hombre y el perro demuestran que hay una analogía en las características morfológicas y clínicobiológicas en el ámbito del cáncer, se ha optado por buscar una relación entre la inmunorreactividad a la proteína del WT-1 y el potencial maligno que tienen algunas neoplasias originadas del músculo liso. Hacer esto resulta imprescindible para los posteriores trabajos en comportamiento biológico tumoral de veterinaria.

3.1. Hipótesis

Los leiomiomas serán inmunorreactivos contra la proteína WT-1, mientras que los leiomiomas no.

3.2. Objetivos

1. Caracterización morfológica de los tumores de músculo liso de pequeñas especies
2. Caracterización histoquímica e inmunohistoquímica de los tumores de músculo liso de pequeñas especies
3. Poder brindar un pronóstico en base al hallazgo de WT-1 en los tumores

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de estudio

Los casos para este estudio fueron proporcionados del archivo de un Patólogo Veterinario de Monterrey, Nuevo León. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica y Citopatología, del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2. Información de casos

La lista consiste en 21 casos, de los cuales 20 son de caninos y 1 corresponde a un felino macho. 17 neoplasias son procedentes de hembras caninas, 13 de aparato genitourinario, 3 de zonas subcutáneas y 1 en la base del corazón, las 3 neoplasias restantes de caninos

corresponden a cavidad oral, colon y vejiga (Tabla 2) y la otra neoplasia corresponde a un paciente felino, la cual se hallaba en el intestino delgado. Estos tumores en pequeñas especies fueron diagnosticados presuntivamente como tumores de músculo liso. Las biopsias de tejido son remitidas en formol al 10 % por los clínicos veterinarios de la Zona Metropolitana de Monterrey.

4.3 Obtención y manejo de muestras

Las muestras fueron obtenidas de manera quirúrgica por parte de los veterinarios de Monterrey, NL. El criterio de los diagnósticos presuntivos por parte de estos clínicos fue con base a la sospecha de neoplasia en sus pacientes. Posteriormente, los tejidos fueron transportados al Laboratorio de Anatomía Patológica y Citopatología, HU-UANL, para ser incluidos en el proceso de H&E.

4.4 Proceso histológico de H&E

Los casetes se colocaron en el histoquinete, en el cual llevaron un proceso de deshidratación en alcoholes, posteriormente se embebieron en la cera de parafina y fueron cortados con el microtomo a 4 micrómetros de espesor para posteriormente ser desparafinados y posteriormente teñidos con las tinciones convencionales de hematoxilina y eosina.

4.4.1 Proceso de histoquímica

El proceso de la histoquímica se realiza inicialmente con el tejido ya embebido en parafina, y así ser sometido por la técnica de histoquímica de Tricrómica de Masson.

4.4.2 Proceso de inmunohistoquímica

Se utilizó el proceso de la inmunohistoquímica contra las proteínas alfa actina de músculo liso y la proteína del *WT-1* a partir de la técnica cualitativa de estreptoavidina biotina. Los anticuerpos utilizados para las inmunohistoquímicas son de origen monoclonal. Para identificar la proteína del *WT-1* se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón IgG-1 provenientes de la empresa Dako®, de un Kit comercial. Para la α -actina de músculo liso se utilizó el Kit comercial de anticuerpos monoclonales de IgG-2^a de ratón de la empresa Dako®.

4.4.3 Criterios para el diagnóstico

El diagnóstico de todos los cortes histológicos de este trabajo fue por medio de un microscopio óptico Zeiss binocular, modelo Primo Star®. Todas las neoplasias que contenían células elongadas en mantos, torrentes, fascículos o patrones entrelazados fueron sometidas a las tinciones con Tricrómica de Masson. También se incluyeron pocas neoplasias con patrones arremolinados, las cuales resultaron ser originadas del músculo liso.

4.5. Diseño estadístico

Se utilizó únicamente una relación de proporciones medidas en porcentaje.

Tabla 2. Lista de casos con la raza, edad, sexo del paciente, así como la localización anatómica de la neoplasia.

No. de caso y neoplasia	Paciente	Ubicación anatómica
Caso 1, LM	Grifón de Bruselas, 9 años, hembra	Útero
Caso 2, LM	French Poodle, 14 años, hembra	Útero
Caso 3, LM	Dálmata, 8 años, hembra	Vagina
Caso 4, LM +	Beagle, 12 años, hembra	Vagina
Caso 5, LMS	Cobrador dorado, 8 años, hembra	Vulva y zona perianal
Caso 6, LMS	Schnauzer, 8 años, macho	Cavidad oral
Caso 7, LMS	Criolla, 11 años, hembra	Tronco, subcutáneo del lado izquierdo
Caso 8, LM +	Labrador, 12 años, hembra	Cérvix
Caso 9, LMS	Bóxer, 8 años, macho	Mesenterio/colon
Caso 10, LMS +	Felino doméstico, 9 años, macho	Intestino delgado
Caso 11, FLM	French Poodle, 12 años, hembra	Vagina
Caso 12, LMS	Gigante de los pirineos, 1 año, hembra	Base del corazón
Caso 13, LMS	Whippet, S/E, hembra	Subcutáneo, miembro anterior derecho a la altura del codo medial
Caso 14, LM +	Shar pei, 10 años, hembra	Útero
Caso 15, LM	Criolla, 15 años, hembra	Vulva
Caso 16, LMS	Shih Tzu, 6 meses, macho	Vejiga
Caso 17, LMS	Shih Tzu, S/E, hembra	Vagina
Caso 18, LM	Labrador, S/E, hembra	Vulva
Caso 19, LM	Cobrador dorado, 6 años, hembra	Vulva y cérvix
Caso 20, LMS	Labrador, 10 años, hembra	Glúteo derecho, subcutáneo
Caso 21, FLM	Beagle, 12 años, hembra	Útero y cérvix

LM: Leiomioma, LMS: Leiomiosarcoma, FLM: Fibroleiomioma, +: positivo a WT-1

5. RESULTADOS

En este trabajo los 21 tumores de músculo liso fueron positivos a alfa actina de músculo liso, pero sólo 3 leiomiomas y 1 leiomiosarcoma fueron positivos a la proteína del gen WT-1. Debido a la baja positividad de las muestras se optó por usar proporciones, las cuales están resumidas en la Tabla 3 después de las figuras histológicas.

5.1 Histología de casos

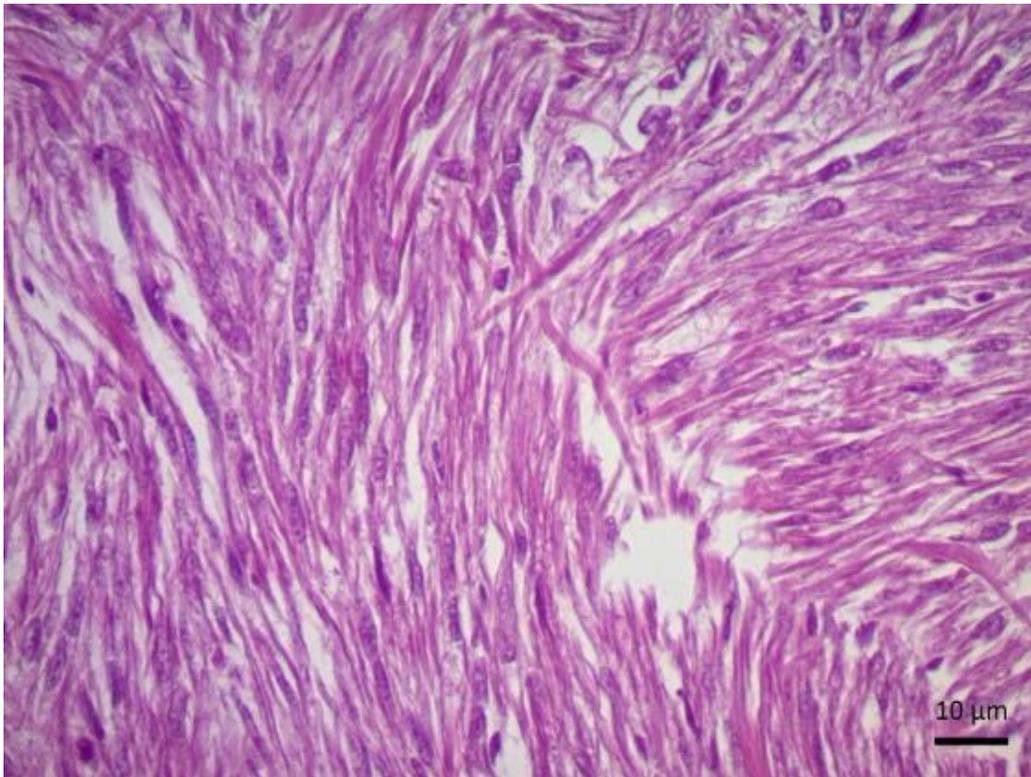


Figura 1. Caso 1, Mantos (torrentes) paralelos exhibidos por un Leiomioma. Sus citoplasmas son eosinófilos y sus núcleos romos. H&E, 40X.

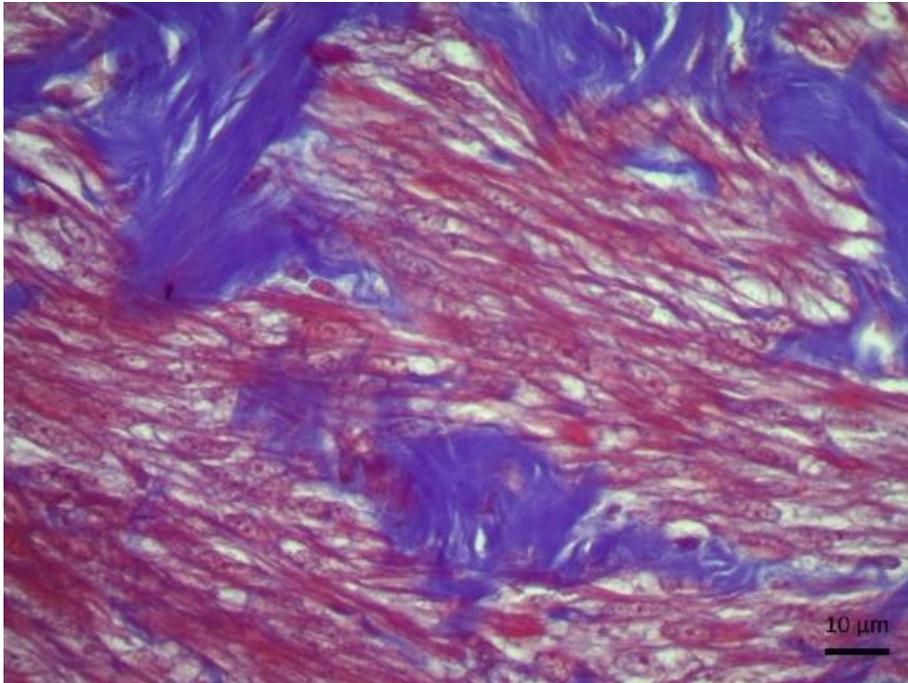


Figura 2. Caso 1, presencia de tejido muscular liso (fibras rojas) aunadas a tejido colagenoide (fibras azules), Tricrómica de Masson, 40X.

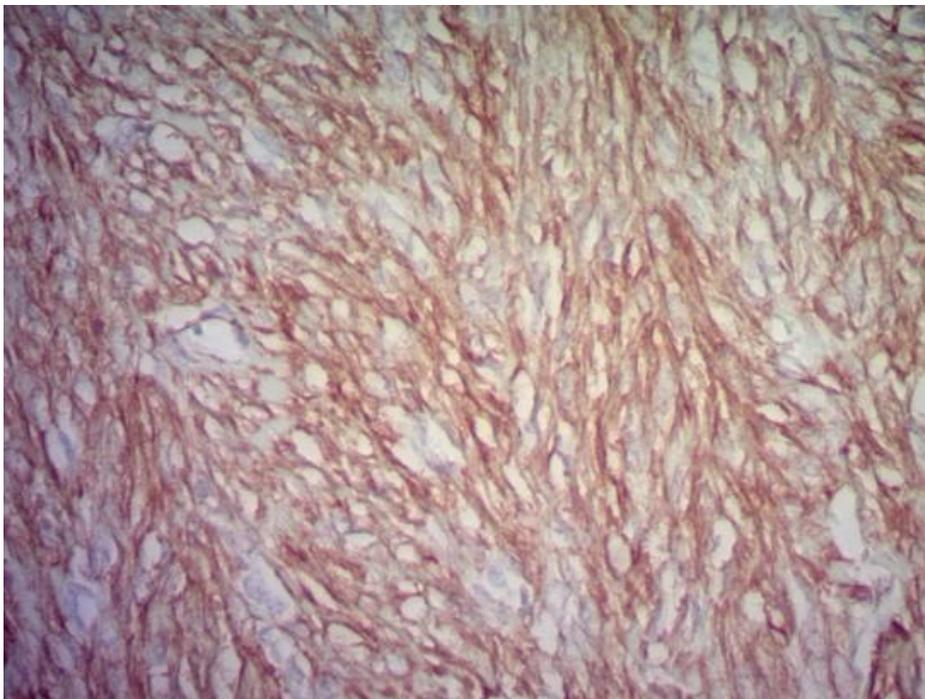


Figura 3. Caso 1. Inmunorreactividad contra actina de músculo liso. Inmunohistoquímica, 40X.

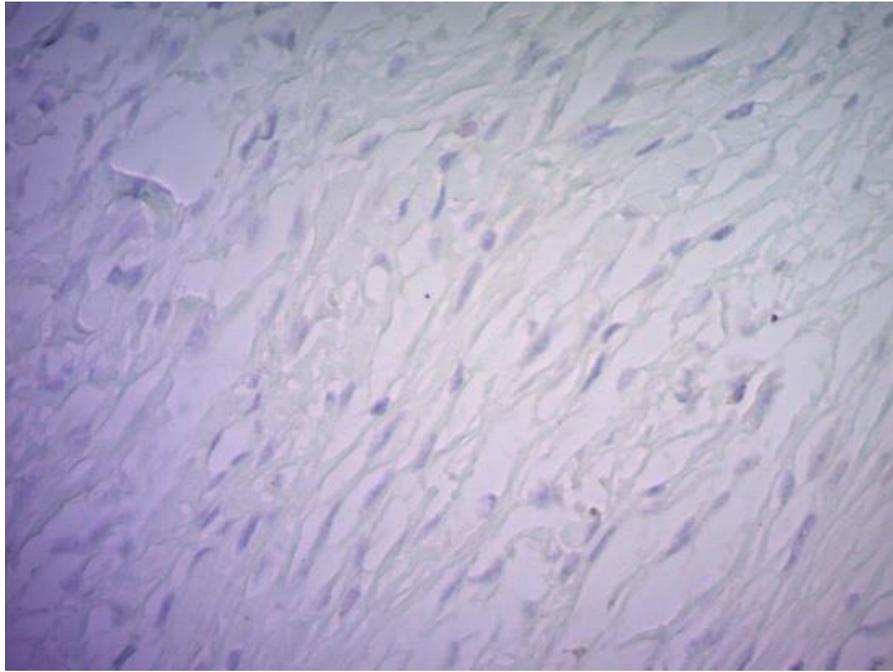


Figura 4. Caso 1. inmunorreactividad negativa para la proteína del WT-1. Inmunohistoquímica, 40X.

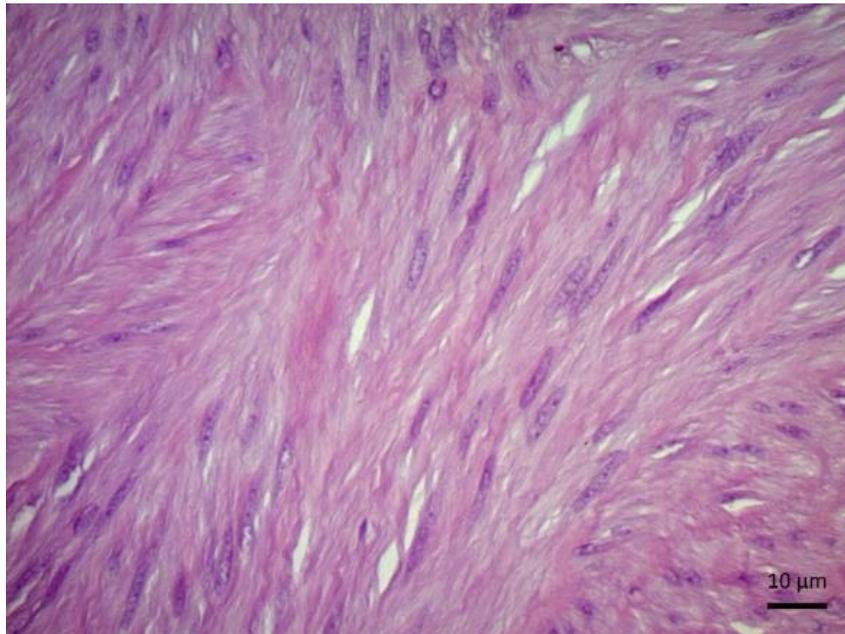


Figura 5. Caso 3, leiomioma, fascículos de células elongadas características de este tumor. H&E, 40X.

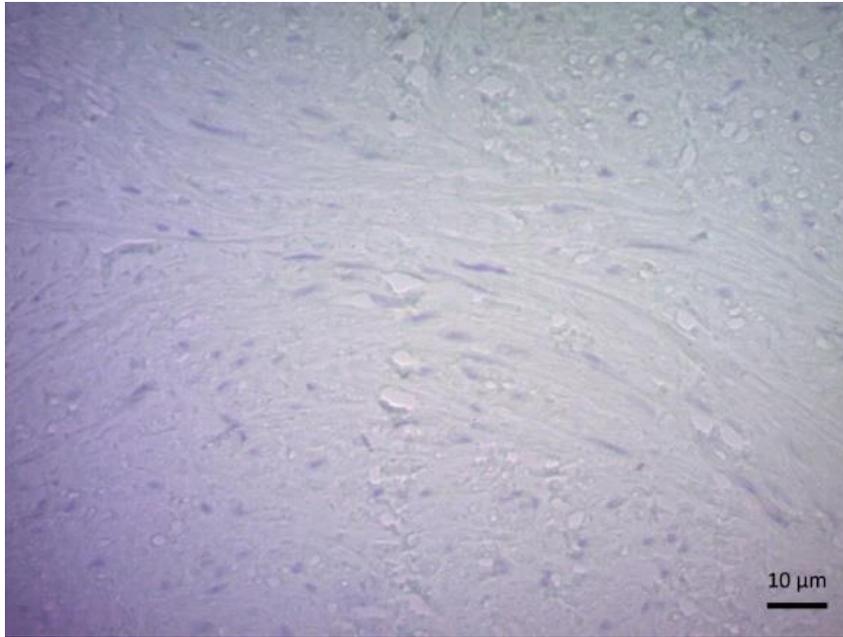


Figura 6. Caso 3, negatividad a WT-1, Inmunohistoquímica, 40X.

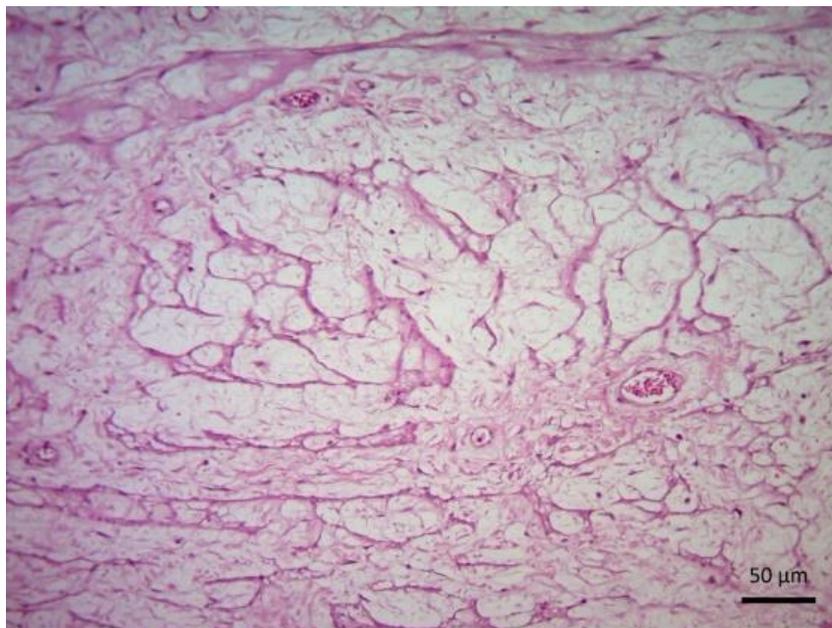


Figura 7. Caso 4, leiomioma, población hipocelular de células elongadas demostrando un patrón microquístico. Las células están inmersas en una matriz colagenoide edematosa. H&E, 10X.

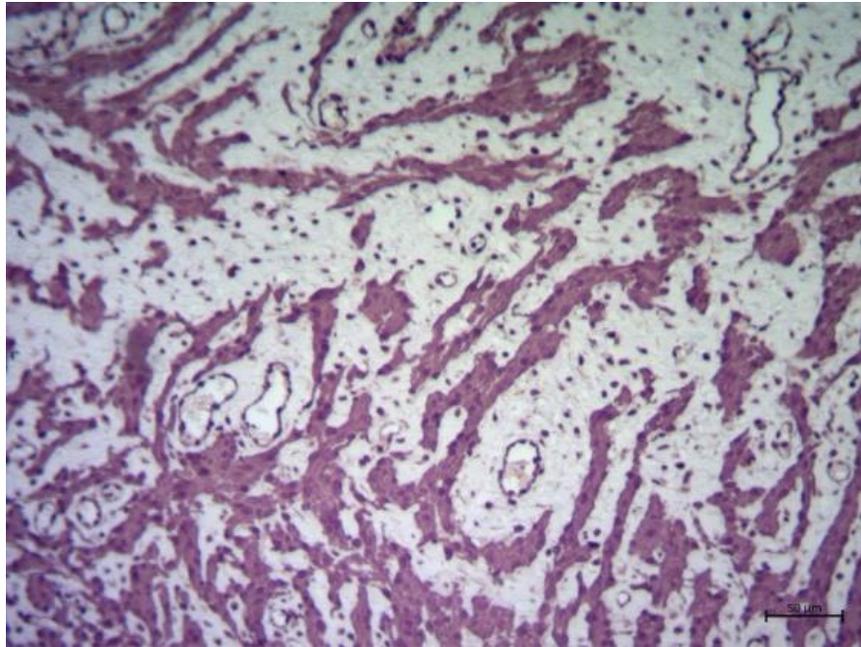


Figura 8. Caso 4, leiomioma, inmunorreactividad para la actina de músculo liso. El patrón microquístico es apreciable aún, mientras que las células se organizan en palizada dentro de una matriz edematosa, H&E 10X.

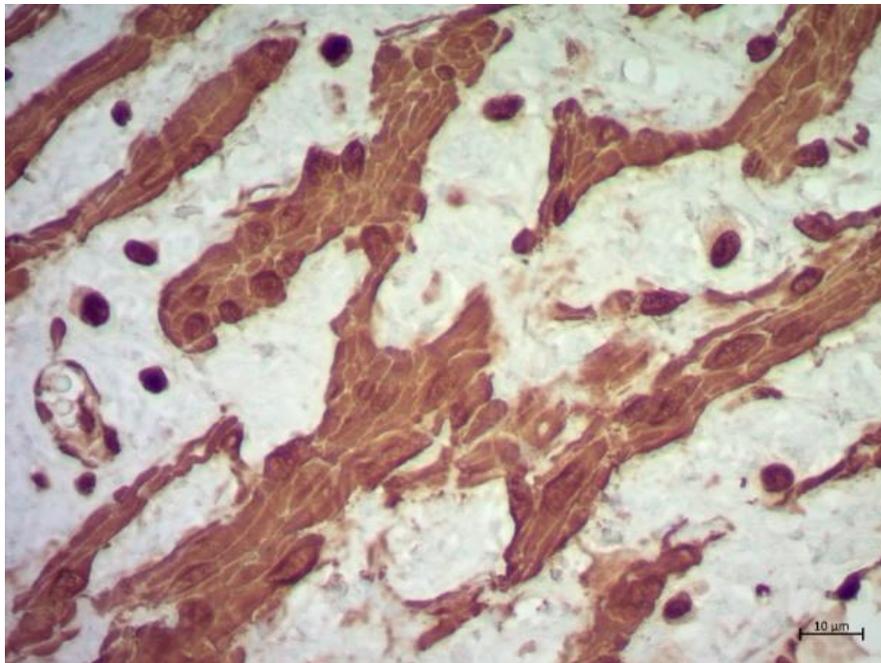


Figura 9. Caso 4, leiomioma, acercamiento de la figura 8. Inmunohistoquímica. 40X.

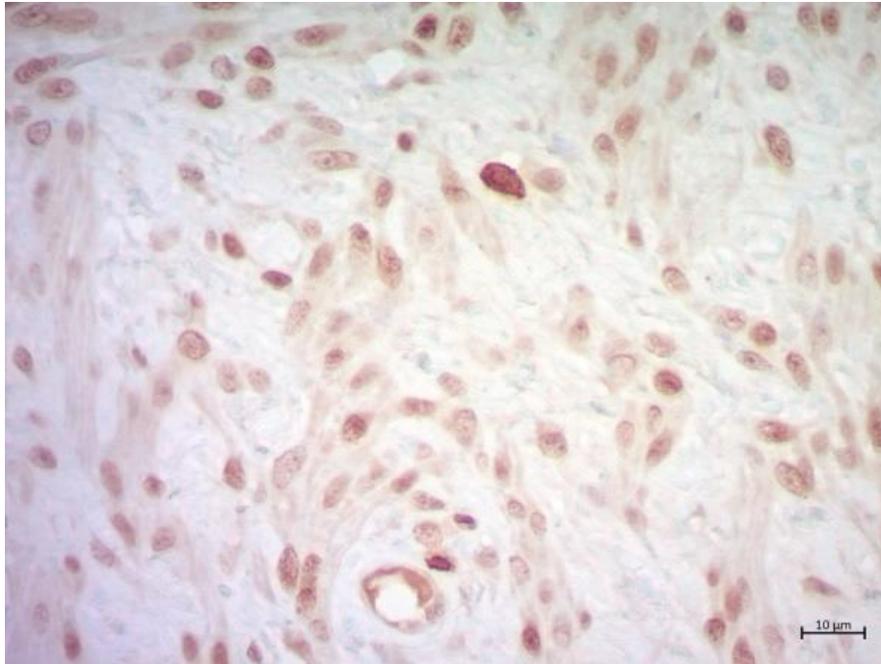


Figura 10. Caso 4, leiomioma, inmunorreactividad nuclear contra la proteína WT-1. 40X.

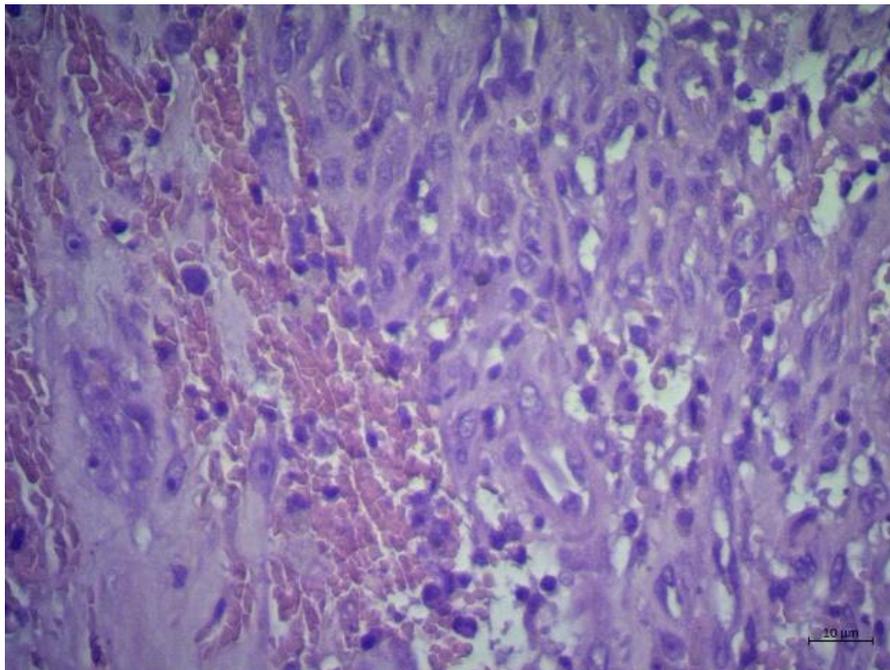


Figura 11. Caso 12. Leiomyosarcoma. Note el pleomorfismo nuclear, una característica de malignidad. H&E, 40X

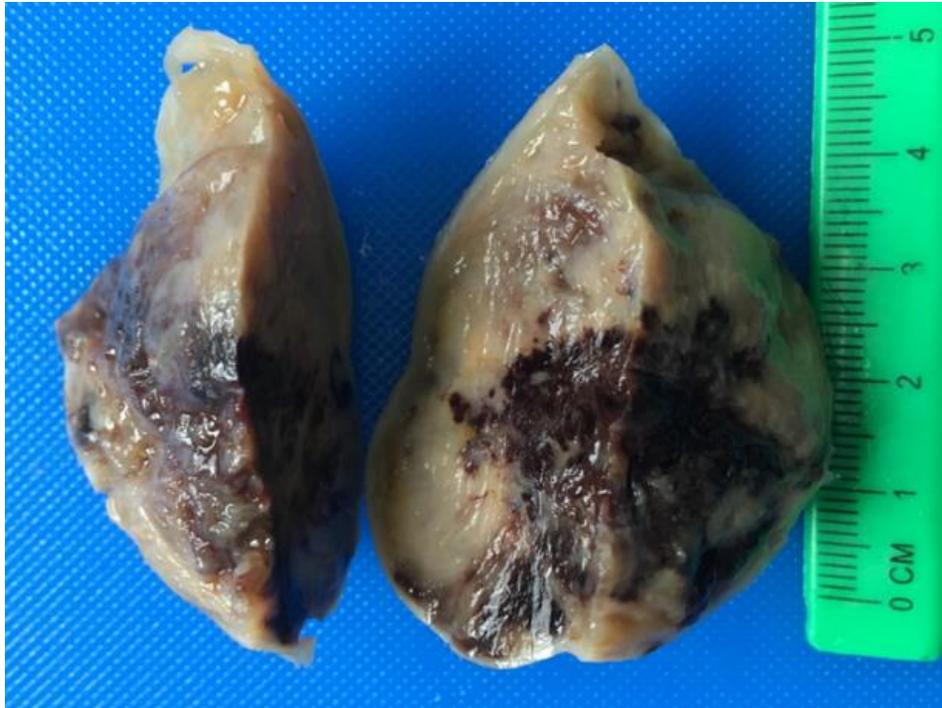


Figura 12. Aspecto macroscópico de la figura 11. Masa con detalles hemorrágicos en su superficie irregular y en su interior.

Las imágenes muestran la extensa variabilidad morfológica que existe entre este grupo de sarcomas de tejido blando. En las figuras 1 y 5 se muestra la morfología típica de los leiomiomas, misma que puede ser vista en fibromas, fibrosarcomas, tumores de la raíz nerviosa o melanomas amelánicos. La figura 12 muestra el aspecto macroscópico de un leiomioma que se originó en la base del corazón, este estaba adherido a través de un pedículo a su base. Posiblemente esta neoplasia se desarrolló de la musculatura lisa de algún vaso sanguíneo de la vasa vasorum.

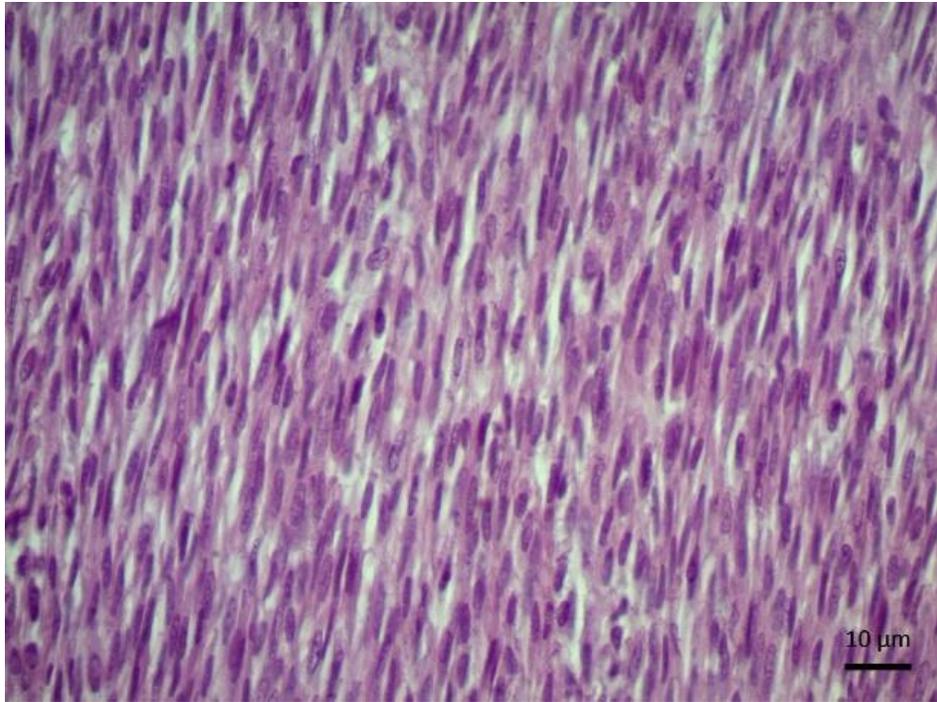


Figura 13. Caso 14. Leiomioma mostrando torrentes monomórficos paralelos sin evidencia de malignidad. H&E. 40X.

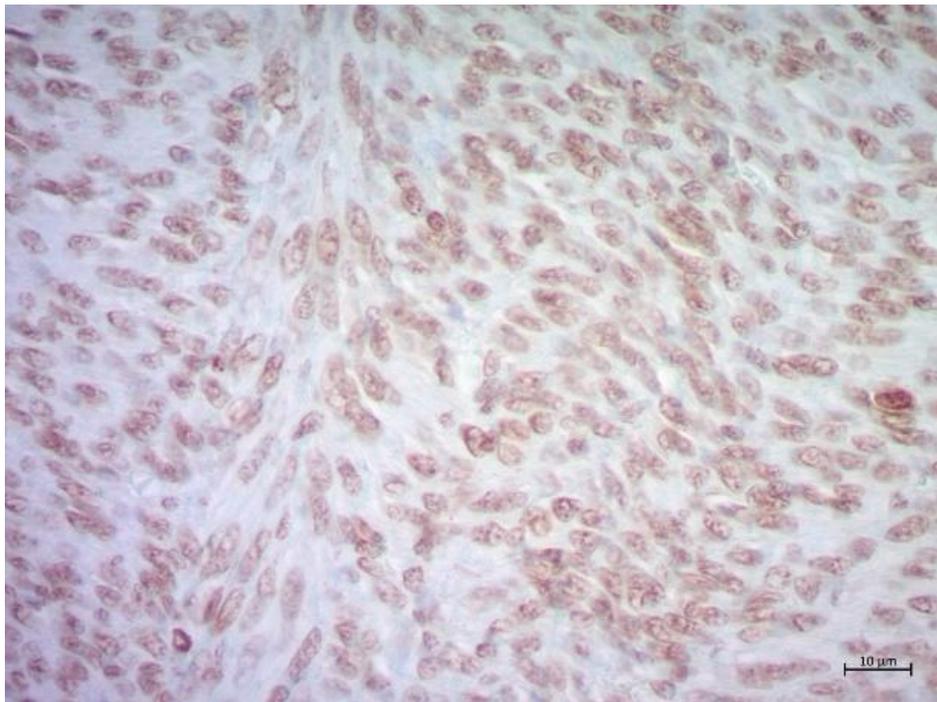


Figura 14. Caso 14. Leiomioma exhibiendo inmunorreactividad nuclear a WT-1. 40X.

Los casos positivos en este trabajo tuvieron una inmunorreactividad totalmente nuclear. Las secciones de los especímenes que eran inmunorreactivas de manera citoplásmica no fueron tomados como positivos.

Tabla 3. Resultados finales de positividad contra la proteína de WT-1

Neoplasia	Resultado de IHQ contra WT-1	
LM	3 positivos (27.27)	8 negativos (72.73)
LMS	1 positivos (10%)	9 negativos (90%)

LM: Leiomioma, LMS: Leiomiosarcoma, IHQ: Inmunohistoquímica

6. DISCUSIÓN

Es de suma importancia recalcar el uso de la Anatomía Patológica como la herramienta diagnóstica esencial para el diagnóstico de las neoplasias (Rosai, 2007). En la actualidad, algunos autores promueven el uso de pruebas de biología molecular más sofisticadas para el diagnóstico de los padecimientos neoplásicos, esto es hasta cierto punto poco práctico; esto último debido a que al momento de evaluar una neoplasia al microscopio el patólogo tomará pertinentemente un algoritmo diagnóstico que le llevará a caracterizar de manera apropiada a la neoplasia, cosa que las pruebas de biología molecular no hacen. Un claro ejemplo de esto último es tomar en cuenta la necrosis, mitosis, anaplasia e invasión linfática que estas neoplasias puedan tener y que sólo es posible interpretarlo en una sección histológica. Es importante recalcar los aspectos morfológicos de la neoplasia. La patología quirúrgica siempre irá de la mano con la morfología.

Los resultados obtenidos en este trabajo contrastan con lo descrito anteriormente por Nakatsuka *et al.*, (2006). En este trabajo se observó un 10 % de inmunorreactividad contra la proteína de WT-1, mientras que Nakatskuka *et al* reporta 67 % de inmunorreactividad usando anticuerpos contra WT-1 en los tumores de músculo liso. Así mismo, existe una sobre expresión de la proteína WT-1 en diferentes tipos de tumores que poseen diferentes estadios de diferenciación. Las neoplasias de músculo liso evaluadas por Nakatsuka provienen de zonas extra genitales, contrastando notoriamente con lo que describe Deavers en 2008 acerca de la inmunorreactividad obtenida por neoplasias de músculo liso

genitales. Deavers (2008) y Lee *et al.* (2009) reportan que todos los leiomiomas o leiomiosarcomas ginecológicos sobre expresan la proteína del gen WT-1, a diferencia de los leiomiosarcomas no ginecológicos, los cuales no lo hacen. De manera peculiar, los leiomiomas que se incluyeron en este trabajo, los cuales resultaron positivos fueron leiomiomas ubicados en alguna parte del aparato reproductor de las hembras caninas y ocasionalmente otros autores diferentes a Lee et al. describen un patrón de positividad a WT-1 en las neoplasias benignas de músculo liso (leiomiomas); estas neoplasias no están contempladas para evaluación pronóstica debido a que los leiomiomas poseen características clínico-patológicas benignas y la escisión quirúrgica resulta prácticamente curativa. Coseemans *et al.* reportó en el 2007 hasta 76% de positividad hacia la proteína de WT-1 en leiomiosarcomas con el uso de anticuerpos monoclonales, contrastando fuertemente con nuestros resultados de sólo el 10% de positividad y así mismo obtuvo resultados satisfactorios encontrando una sobre expresión nuclear de la proteína del gen WT-1, pero no logró relacionar la sobre expresión de la proteína en las inmunohistoquímicas con su comportamiento biológico; el único leiomiosarcoma que nosotros tuvimos positivo tuvo positividad nuclear, y de hecho, para este tipo de trabajos es necesario que la positividad de la proteína del gen WT-1 sea nuclear, ya que esencialmente como factor de transcripción debe de localizarse en el núcleo. En la literatura de medicina humana, el leiomioma es el tumor del aparato reproductor de la mujer más común y generalmente asienta sobre los cuernos o cuerpo del útero; el leiomiosarcoma es prácticamente raro en la mujer. En la perra al igual que en la mujer, estos tumores también asientan sobre el cuerpo, cuernos y cérvix, aunque en la mujer no son vistos saliendo de la vulva como lo hacen de manera ocasional en la perra. En nuestro trabajo logramos observar una tendencia de los tumores de músculo liso por desarrollarse en las hembras caninas. Observe la figura 9-10 y 13-14, corresponden a leiomiomas ubicados en el aparato genital de dichas hembras. Esta puede ser una analogía de los leiomiomas ginecológicos de la mujer descritos por Carvalho et al. 2009, los cuales generalmente son positivos también al ER (receptor estrogénico). La mayoría de los leiomiosarcomas que observamos en este trabajo poseían características histológicas que denotaban mucha malignidad, tales como pleomorfismo, anaplasia, índice mitótico

elevado y necrosis prominente. Aun así estos tumores malignos no mostraban una inmunorreactividad contundente en las inmunohistoquímicas.

Al menos Sotobori et al. (2007) sugiere fuertemente que en los sarcomas de tejido blando si se puede relacionar el comportamiento clínico de las neoplasias en base a la sobre expresión de WT-1; nosotros no pudimos hacer eso. El uso de los anticuerpos monoclonales anti-WT-1 no debe de tener ninguna interferencia o cualquier clase de sesgo en los resultados obtenidos en este estudio, ya que estos anticuerpos reconocen la porción amino-terminal de todas las isoformas de WT-1. De hecho, la causa de la escasa inmunorreactividad contra la proteína del WT-1 puede deberse a los sitios anatómicos de donde se obtuvieron las muestras, ya que provienen de zonas extra-genitales como lo reporta Deavers (2008) y por ende, los resultados pueden ser negativos. Algunos especímenes de este trabajo expresaban de manera moderada WT-1 en el citoplasma, estos hallazgos no fueron tomados en cuenta debido a que estos resultados pueden ser un tanto ambiguos. Ocasionalmente las células que entraban en necrosis podrían apreciarse con cierto grado de inmunorreactividad citoplásmica, de aquí yace parte de la toma de la decisión ante tal disyuntiva. Carranza y colaboradores en el 2015 buscaron la proteína WT1 en diferentes tumores de glándula mamaria en hembras caninas, la inmunorreactividad que encontraron fue solamente citoplásmica.

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo se observó que las hembras son más proclives a padecer neoplasias del músculo liso, particularmente en tracto genital, como ocurre en la mujer. No pudo establecerse que la inmunorreactividad a WT1 estuviera relacionada con las características malignas de las neoplasias del músculo liso (leiomiomas).

8. REFERENCIAS

- 1- Avallone G, Helmbold P, Caniatti M. The spectrum of canine cutaneous perivascular wall tumors: morphologic, phenotypic and clinical characterization. *Vet Pathol.* 2007;44:607 – 620.
- 2- Baba AI, Catoi C. Comparative Oncology. *The publishing house of Romanian Academy.* 2007.
- 3- Carranza M, Zamora A, Ramírez R. Análisis de la expresión del gen WT1 (Tumor de Wilm's) en tumor mamario canino y su correlación con el tipo histopatológico. [Tesis de maestría]. General Escobedo, NL: UANL; 2015.
- 4- Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:1911 – 1922.
- 5- Coosemans A, Amini NS, Caluwaerts S, et al. Upregulation of Wilms' tumour gene 1 (WT1) in uterine sarcomas. *Eur J Cancer.* 2007;43:1630 – 1637.
- 6- Cooper BJ, Valentine BA. Tumors of muscle. In: Meuten DJ, ed. *Tumors of domestic animals.* 5th ed. Iowa, USA: Academic Press; 2017:425 – 466.
- 7- Cormier, JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *Cancer J Clin.* 2004;54:94 – 109.
- 8- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A. Desmin: molecular interactions and putative functions of muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:1819 – 1830.
- 9- Deavers M. Immunohistochemistry in gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:175 – 180.
- 10- Dennis MM, McSporrán KD, Bacon NJ. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Vet Pathol.* 2011;48:73 – 84.
- 11- Di Cerbo A, Palmieri B, De Vico G. Onco-epidemiology of domestic animals and targeted therapeutic attempts: perspectives on human oncology. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014;140:1807 – 1814.

- 12- Goldschmidt MH, Goldschmidt KH. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: Meuten DJ, ed. *Tumors of domestic animals*, 5th ed. Iowa, USA: Academic Press; 2017:88 – 141.
- 13- Hendrick MJ. Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ, ed. *Tumors of domestic animals*, 5th ed. Iowa, USA: Academic Press; 2017:142 – 175.
- 14- Higgins RJ, Bollen AW, Dickinson PJ. Tumors of the central nervous system. In: Meuten DJ, ed. *Tumors of domestic animals*, 5th ed. Iowa, USA: Academic Press; 2017: 834 – 891.
- 15- Newkirk KM, Brannick EM, Kusewitt DF. Neoplasia and tumor biology. In: Zachary JF, ed. *Pathologic basis of veterinary disease*. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017:286 – 319.
- 16- Fisher C. Atlas of soft tissue tumor pathology. New York: Springer; 2013.
- 17- Gunst S, Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol*. 2008;295:576 – 587.
- 18- Holst V, Junkins-Hopkins J, Elenitsas R. Cutaneous smooth muscle neoplasms: Clinical features, histologic findings, and treatment options. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46:477 – 490.
- 19- Katenkamp K, Katenkamp D. Soft Tissue Tumors. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(39):632 – 636.
- 20- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM. WT-1 is required for early kidney development. *Cell*. 1993;74:679 – 691.
- 21- Lee CH, Kweon OK. Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *J Vet Sci*. 2002;3:321 – 325.
- 22- Lee CH, Turbin DA, Sung YC, et al. A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors. *Modern Pathology*. 2009;22:1519 – 1531.
- 23- Lin F, Liu H. Immunohistochemistry in undifferentiated neoplasm/tumor of uncertain origin. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:1583 – 1610.

- 24- Liu SM, Mikaelian I. Cutaneous smooth muscle tumors in the dog and cat. *Vet Pathol.* 2003;40:685 – 692.
- 25- Machida N, Katsuda S, Yamamura H. Myocardial hamartoma of the right atrium in a dog. *J Comp Path.* 2002;127:297 – 300.
- 26- Miettinen M, Fetsch JF. Evaluation of biological potential of smooth muscle tumors. *Histopathology.* 2006;48:97 – 105.
- 27- Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Research.* 2002;8:1167 – 1171.
- 28- Mohseny AB, Hogendoorn PC. Concise review: Mesenchymal tumors: When stem cells go mad. *Stem Cells.* 2011;29:397 – 403.
- 29- Mrowka C, Schedl A. Wilms' tumor suppressor gene WT1: From structure to renal pathophysiologic features. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:106 – 115.
- 30- Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology.* 2006;19:804 – 814.
- 31- Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, et al. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:194 – 204.
- 32- Rauscher FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J.* 1993;7:896 – 903.
- 33- Rosai J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Laboratory Investigation.* 2007;87:403 – 408.
- 34- Russell KN, Mehler EJ, Skorupski KA. Clinical and immunohistochemical differentiation of gastrointestinal stromal tumors from leiomyosarcomas in dogs: 42 cases (1990 – 2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2007;230:1329 – 1333.

- 35- Schulman FY, Johnson TO, Facemire PR. Feline peripheral nerve sheath tumors: histologic, immunohistochemical, and clinicopathologic correlation (59 tumors in 53 cats). *Vet Pathol.* 2009;46:1166 – 1180.
- 36- Scholz H, Krischner KM. A role for the wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology.* 2005;20:54 – 59.
- 37- Small JV, Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand.* 1998;164:341 – 328.
- 38- Sotobori T, Ueda T, Oji Y, et al. Prognostic significance of wilms tumor gene (WT1) mRNA expression in soft tissue sarcoma. *CA Cancer J Clin.* 2006;106:2233 – 2240.
- 39- Stromberg PC, Meuten DJ. Trimming tumors for diagnosis and prognosis. In: Meuten DJ, ed. *Tumors of domestic animals*, 5th ed. Iowa, USA: Academic Press; 2017: 27 – 43.
- 40- Ueda T, Oji Y, Naka N, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci.* 2003;94:271 – 276.
- 41- Weiss SW. *Histological typing of soft tissue tumours*. Berlin, Heidelberg, WHO; 1994.