

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



**ISOFORMAS β/δ Y γ DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR
PROLIFERACIÓN DEL PEROXISOMA (PPAR) EQUINO: EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN PIEL NORMAL Y MELANOMA EN CABALLOS CON
DIFERENTES NIVELES DE ACONDICIONAMIENTO FÍSICO.**

Tesis presentada por:

MVZ. LEONARDO TAFUR GIRÓN

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Monterrey, NL. A 15 de agosto del 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



ISOFORMAS β/δ Y γ DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR
PROLIFERACIÓN DEL PEROXISOMA (PPAR) EQUINO: EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN PIEL NORMAL Y MELANOMA EN CABALLOS CON
DIFERENTES NIVELES DE ACONDICIONAMIENTO FÍSICO.

Aprobación de tesis por el comité particular de:

MVZ. LEONARDO TAFUR GIRÓN

Comité de Tesis



Dr. Gustavo Hernández Vidal

Director de Tesis



Co-Directora

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



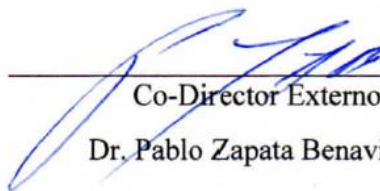
Co-Director

Dr. Gustavo Moreno Degollado



Co-Director

Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar



Co-Director Externo

Dr. Pablo Zapata Benavides

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



ISOFORMAS β/δ Y γ DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR
PROLIFERACIÓN DEL PEROXISOMA (PPAR) EQUINO: EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN PIEL NORMAL Y MELANOMA EN CABALLOS CON
DIFERENTES NIVELES DE ACONDICIONAMIENTO FÍSICO.

Aprobación de tesis por el comité particular de:

MVZ. LEONARDO TAFUR GIRÓN

Dirección de Tesis


Dr. Gustavo Hernández Vidal

Director de Tesis


Co-Directora

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila


Co-Director

Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar


Co-Director

Dr. Gustavo Moreno Degollado


Co-Director Externo

Dr. Pablo Zapata Benavides

LUGAR DE TRABAJO

El trabajo presentado a continuación 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 Hospital de Grandes Especies, todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Gustavo Hernández Vidal, la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, el Dr. Pablo Zapata Benavides, el Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar y el Dr. Gustavo Moreno Degollado.

FINANCIACIÓN DEL PROYECTO

Este trabajo de investigación ha sido financiado por medio de diferentes métodos:

*Beca nacional otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para estudios de posgrado (Maestría en ciencia Animal), convocatoria 2019.

*Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología (PAICyT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, convocatoria 2019.

*Recursos propios y facilidades de la administración de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, les extiendo mi mayor agradecimiento por acompañar mi recorrido durante la realización de este trabajo.

*Al Dr. Gustavo Hernández Vidal, mi director de tesis, quien permitió la materialización de esta y también la posibilidad de exponerla en varios ámbitos científicos. Le agradezco su guía durante este recorrido de la maestría. Sus consejos y recomendaciones sobre la vida profesional los llevo conmigo y espero colaborar con él en futuros proyectos.

*A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila por haberme confiado en conjunto con el doctor Vidal, este trabajo y haberme apoyado durante el desarrollo de este. Una doctora de grandes conocimientos que supo brindármelos desde las clases que recibí durante la maestría hasta las reuniones en las que discutíamos asuntos de la tesis, le agradezco mucho todo lo enseñado y que me ayudará en mi formación como investigador.

*Al Dr. Uziel Castillo Velázquez, por haberme apoyado en uno de los momentos más difíciles que tuve que transitar durante mi trabajo experimental. El doctor Uziel fue uno de los mejores maestros que me crucé durante este par de años y le agradezco profundamente su apoyo y comprensión durante la realización de mi tesis. Es un doctor ejemplar cuyo interés y compromiso por la investigación es admirable y de emular. Mil gracias por todo.

* A mi co-asesor, el Dr. Pablo Zapata Benavides, investigador de una gran trayectoria y de quien pude aprender mucho durante la clase de doctorado a la que me invitó como oyente; doctor que también me brindó en su momento, valiosos consejos para el desarrollo de este trabajo y con quien espero colaborar en futuros proyectos de investigación.

* A la técnica de laboratorio, Cynthia Marisol Padrón Carrillo, quien fue de gran ayuda durante todo mi trabajo experimental, me apoyó en muchas etapas y evitó que me desanimara cuando los experimentos no salían, hasta que al final salieron, muchas gracias, Cynthia.

* A la técnica de laboratorio, Leslee Nayelly de la Rosa Contreras, quien me brindó sus conocimientos y ayuda en varias etapas de mi trabajo experimental; admiro su trabajo y le agradezco su apoyo.

* A mi amigo y compañero de maestría Kevin Antonio Cárdenas Noriega, quien fue de gran ayuda en múltiples aspectos de este recorrido. Un investigador con muchísimo potencial, con el cual espero colaborar en muchos proyectos futuros. También debo resaltar que “Kevs”, fue una fuente inagotable de risas cada vez que el estrés de la maestría era demasiado y sé lo importante y lo mucho que aprecié esos momentos a la hora de amenizar el caos que en ocasiones se vive realizando un posgrado.

*A mi co-asesor, el Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar, que me brindó en varias ocasiones su gran conocimiento y con el que también tuve el privilegio de cursar una clase que me ayudó en varios aspectos de mi tesis. Una persona que expele conocimiento en cada frase que nos decía durante clases o reuniones, ejemplar investigador. Muchas gracias.

*A mi co-asesor, el Dr. Gustavo Moreno Degollado por hacer parte de este proyecto de investigación y apoyar su progreso y finalización.

* A mis compañeros de maestría, la mayoría de ellos me brindaron su amistad y apoyo con el cual se aligeraban varios aspectos del día a día en la maestría. Conviví con muchos de ellos durante mi trabajo experimental y nos dábamos ánimos mutuamente para que cada uno pudiera completar sus cometidos, siendo una experiencia agradable y grata.

* A mi compañero de maestría, Axel Marín Valbuena, que al compartir temas de tesis similares e incluso muestras, pudimos apoyarnos mutuamente en diferentes aspectos y etapas de nuestro trabajo experimental.

* Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por todo el apoyo económico que recibí y que hizo posible la realización de este proyecto de investigación.

* Al posgrado en conjunto Agronomía-Veterinaria por haberme recibido y apoyado durante mis estudios de maestría.

* A todos los maestros que tuve durante estos dos años y que me ofrecieron una adecuada formación académica y varios consejos útiles que me llevaré para el futuro de mi carrera profesional.

* Para finalizar, a todas las personas que directa o indirectamente me ayudaron a realizar y materializar este trabajo, son incontables las personas que de una u otra manera ponen su grano de

arena en un trabajo de investigación, espero sepan lo agradecido que me siento por haber recibido ese apoyo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, quienes son mi constante guía en la vida y a quienes acredito la persona en la que me he convertido. No me cansaré de expresar el infinito amor, respeto y admiración que tengo por ellos, Patricia Girón Otálvaro y Richard Arturo Tafur Sandoval. La vida me premió con dos seres tan maravillosos como lo son ambos y espero sepan lo afortunado que me siento de decirle al mundo que ustedes son mis padres. No me encontraría aquí de no ser por ellos y los llevo en mi mente a cada paso que doy en mi camino profesional y personal. Muchas gracias por todo, papá y mamá; mis logros, y lo que llevo de mi recorrido, es para ustedes.

A mi hermano, Fabio Morales Girón, un constante apoyo durante mi vida, pasando de etapas escolares y juveniles, a lo que es ahora mi etapa y vida profesional. Espero que siempre tenga presente la gran admiración que le tengo y lo mucho que me enorgullece ser su hermano menor. Una de las personas más inteligentes que conozco y un gran ejemplo a seguir, que me inspira seguir mejorando y superarme en mi vida profesional. Mi hermano, lo recorrido y conseguido hasta ahora, también es para vos.

A mi pareja, Lorena Leticia Vázquez Ávila, una persona que fue testigo de todas las adversidades que tuve que sobrellevar durante la maestría y me brindó un apoyo constante e incondicional durante grandes tramos de mi trabajo estos dos años. Agradezco a la vida por haberla cruzado en mi camino y espero sepa que estoy profundamente agradecido y que mucho de este trabajo no hubiera sido materializado sin su ayuda.

Y, por último, a todas y cada una de las personas que, de una manera u otra, me apoyaron en el recorrido de mi maestría e hicieron ameno y agradable mi trayecto; doctores, maestros, técnicos, familia, amigos. Mil gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-------|
| LUGAR DE TRABAJO | i |
| FINANCIACIÓN DEL PROYECTO | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| DEDICATORIA | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xii |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xiv |
| RESUMEN | xvi |
| ABSTRACT | xviii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. HIPÓTESIS | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 4 |
| 3.1. OBJETIVO GENERAL..... | 4 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 4 |
| 4. ANTECEDENTES | 5 |
| 4.1 Aspectos generales del cáncer..... | 5 |
| 4.2. Factores genéticos en cáncer..... | 6 |
| 4.2.1. Neoplasias y cáncer en equinos..... | 7 |
| 4.2.2. Melanoma en equinos..... | 8 |
| 4.3. Genes asociados a los melanomas equinos..... | 12 |
| 4.4. PPAR en cáncer..... | 12 |
| 4.4.1. Receptor activado por proliferación del peroxisoma alfa (PPAR α)..... | 16 |
| 4.4.2. Receptor activado por proliferación del peroxisoma gamma (PPAR γ)..... | 16 |
| 4.4.2.1. Receptor activado por proliferación del peroxisoma gamma (PPAR γ) en la carcinogénesis..... | 17 |
| 4.4.3. Receptor activado por proliferación del peroxisoma Beta/Delta (PPAR β/δ)... | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5. Estudios de los PPAR y el acondicionamiento físico en equinos..... | 20 |
| 4.6. Estudios de la actividad de PPAR β/δ como inhibidor de la proliferación celular del melanoma..... | 21 |
| 5. JUSTIFICACIÓN..... | 24 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 25 |
| 6.1. Diseño experimental..... | 25 |
| 6.2. Recolección de muestras..... | 26 |
| 6.2.1. Animales de estudio..... | 26 |
| 6.2.2. Proceso de muestreo..... | 26 |
| 6.3. Análisis histológico de las muestras de piel sana e histopatológico de las muestras de Melanoma de equino, mediante la tinción convencional de H&E..... | 27 |
| 6.3.1. Toma de la muestra..... | 27 |
| 6.3.2. Fijación de las muestras..... | 27 |
| 6.3.3. Inclusión de las muestras..... | 27 |
| 6.3.4. Microtomía..... | 29 |
| 6.4. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)..... | 29 |
| 6.4.1. Coloración o tinción..... | 29 |
| 6.4.2. Montaje de las muestras..... | 30 |
| 6.4.3. Observación al microscopio..... | 31 |
| 6.5. PCR en tiempo real..... | 31 |
| 6.5.1. Flujograma del experimento..... | 31 |
| 6.5.2. Técnica de extracción de ARN por el método Trizol..... | 32 |
| 6.5.3. Cuantificación del ARN extraído..... | 33 |
| 6.5.4. Síntesis del ADN complementario (ADNc)..... | 34 |
| 6.5.5. Extracción de ADN a partir de sangre..... | 34 |
| 6.5.6. Análisis de la PCR en tiempo real..... | 35 |
| 6.5.7. Análisis de la expresión..... | 37 |
| 6.5.8. Análisis estadístico..... | 37 |
| 7. RESULTADOS..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1. Análisis histológico de los tejidos de piel sana y análisis histopatológico de las muestras de melanoma por la técnica de tinción convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E)..... | 38 |
| 7.1.1 Piel sana..... | 38 |
| 7.1.2. Melanoma..... | 39 |
| 7.2. Resultados porcentuales de las muestras recolectadas..... | 43 |
| 7.3. PCR punto final para β -actina y expresión génica de PPAR β/δ y PPAR γ | 45 |
| 7.3.1. RT-qPCR para β -actina y expresión génica de PPAR β/δ y PPAR γ | 47 |
| 7.3.1.1. PPAR β/δ en piel sana..... | 47 |
| 7.3.1.2. PPAR β/δ en piel sana y melanoma..... | 49 |
| 7.3.1.3. PPAR β/δ en piel sana y melanoma en caballos sin acondicionamiento físico..... | 50 |
| 7.3.1.4. PPAR γ en piel sana en caballos con y sin acondicionamiento físico..... | 51 |
| 7.3.1.5. PPAR γ en piel sana y melanoma de caballos sin acondicionamiento físico..... | 52 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 53 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 56 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 57 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 58 |
| 12. ANEXOS..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Aspecto clínico de un paciente equino con melanoma maligno..... | 8 |
| Figura 2. Melanoma equino..... | 9 |
| Figura 3. Corte histológico teñido con Hematoxilina y Eosina del melanoma equino..... | 10 |
| Figura 4. Sitio de extracción de una masa tumoral de melanoma de paciente equino..... | 11 |
| Figura 5. Esquematización del mecanismo de acción básico de los receptores activados por proliferación de peroxisoma..... | 13 |
| Figura 6. Estructura proteica de los receptores activados por proliferación del peroxisoma... | 13 |
| Figura 7. Estructura proteica de las 3 isoformas de los receptores activados por proliferación del peroxisoma en humanos..... | 14 |
| Figura 8. Mecanismos de acción anticancerígenos teorizados de los PPARs..... | 15 |
| Figura 9. Activación farmacológica de PPAR γ en líneas celulares de melanoma de origen humano A375..... | 17 |
| Figura 10. Comparación de la secuencia de aminoácidos de PPAR en diferentes especies.... | 19 |
| Figura 11. Análisis de la expresión de PPAR β/δ antes y después del ejercicio en músculo esquelético y leucocitos..... | 20 |
| Figura 12. Activación farmacológica de PPAR β/δ en líneas celulares de melanoma de origen humano y murino A375 (humano) y B16F0 (ratón)..... | 22 |
| Figura 13. Etapas de la técnica de qPCR..... | 32 |
| Figura 14. Proceso de extracción del ARN Por el método Trizol..... | 33 |
| Figura 15. Modelo matemático para realizar el cálculo $2\Delta\Delta Ct$ | 37 |
| Figura 16. Fotomicrografía de la histología de piel sana de equino de 8 años, raza Frisón, prieto, sin acondicionamiento físico..... | 38 |
| Figura 17. Fotomicrografía de la histología de piel sana de equino de 18 años, raza cuarto de milla, bayo, sin acondicionamiento físico..... | 39 |
| Figura 18. Fotomicrografía de la histopatología de melanoma en base de la cola de yegua de 16 años, raza cuarto de milla, color de capa tordilla, sin acondicionamiento físico..... | 40 |
| Figura 19. Fotomicrografía de la histopatología de melanoma en base de la cola de yegua de 12 años, raza cuarto de milla, color de capa tordilla, sin acondicionamiento físico..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 20. Fotomicrografía comparativa de una muestra de piel sana en contraste a una muestra de melanoma..... | 42 |
| Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para β -actina y PPAR β/δ | 46 |
| Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, muestras procesadas por PCR punto final de 5 muestras de melanoma equino..... | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Genes que actúan como supresores tumorales..... | 7 |
| Tabla 2. Deshidratadores de los Tejidos..... | 28 |
| Tabla 3. Aclaradores de los Tejidos..... | 28 |
| Tabla 4. Líquidos de pre-inclusión de los Tejidos..... | 28 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Muestras recolectadas de melanoma por rangos de edad..... | 43 |
| Gráfica 2. Muestras recolectadas de melanoma por color de capa..... | 44 |
| Gráfica 3. Razas de caballos muestreados con melanoma..... | 45 |
| Gráfica 4. Análisis de PPAR β/δ en tejidos de piel sana de caballos con y sin acondicionamiento físico..... | 47 |
| Gráfica 5. Análisis de PPAR β/δ en tejidos de piel sana de caballos con y sin acondicionamiento físico..... | 48 |
| Gráfica 6. Análisis de PPAR β/δ en tejidos de piel y melanomas..... | 49 |
| Gráfica 7. Diferencia de expresión de PPAR β/δ en piel sana y melanoma de caballos sin acondicionamiento físico..... | 50 |
| Gráfica 8. Diferencia de expresión de PPAR γ en piel sana de los grupos con y sin acondicionamiento físico..... | 51 |
| Gráfica 9. Diferencia de expresión de PPAR γ en piel sana y melanoma de los grupos sin acondicionamiento físico..... | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS

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 .

WT1: Tumor de Wilms.

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

IHQ: Inmunohistoquímica.

H&E: Hematoxilina y Eosina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT: Retrotranscripción.

qPCR: PCR en tiempo real.

UR: Unidades de expresión relativa.

RXR: Receptor Retinoide X.

μm : Micras.

μl : Microlitros.

mm: Milímetros.

cm: Centímetros.

ml: Mililitros.

g: Gramos.

mg: Miligramos.

°C: Grados Centígrados

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: ARN mensajero.

Pb: Pares de bases.

pH: Potencial de Hidrógeno.

Ac: Ácido.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno.

s: Segundos.

Min.: Minutos.

Hr: Hora.

RESUMEN

El melanoma equino es una neoplasia de alta frecuencia de presentación en los caballos, esta frecuencia ha aumentado en el último par de décadas, presuntamente debido al aumento de la longevidad de los caballos actualmente, sumado a la sobreexposición a los rayos ultravioleta (UV). Existen muchos factores genéticos asociados a la presentación de esta neoplasia, factores que promueven el desarrollo del tejido y factores que reducen la proliferación celular de la neoplasia. Los receptores activados por proliferador del peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción que pertenecen a la super familia de receptores nucleares hormonales, estos intervienen en múltiples procesos, desde metabólicos hasta intervención en la inflamación y control represor de procesos tumorales. Anteriormente, estos roles que juegan en el desarrollo tumoral se han estudiado en humanos y ratones, la capacidad que tienen los receptores activados por proliferación del peroxisoma (PPAR) de reducir la proliferación, metástasis y angiogénesis del tejido tumoral. Se han reconocido las interacciones entre los PPARs y factores carcinogénicos en el melanoma, como el gen del tumor de Wilms (WT1). Los PPARs juegan un papel fundamental en la evolución del melanoma, puesto que presentan una acción represora de gen WT1, el cual posee características carcinogénicas en el desarrollo de múltiples neoplasias como el melanoma.

El acondicionamiento físico de los caballos también ha demostrado ser un factor relacionado con el nivel de expresión de los PPAR, específicamente la isoforma PPAR β/δ , sin embargo, no se han realizado estudios que analicen la expresión de los PPAR en relación con el nivel de acondicionamiento físico de los caballos. El objetivo del siguiente trabajo fue analizar la expresión génica las isoformas de PPAR β/δ y PPAR γ en piel sana y melanoma equino por medio de PCR en tiempo real y determinar su asociación con el nivel de acondicionamiento físico, utilizando como análisis estadístico la prueba T de Student no pareada con corrección de Welch y test de Tukey para comparaciones intragrupo. Se recolectaron 10 muestras de piel sana de 10 caballos, 27 muestras de melanoma de 10 caballos. No se obtuvieron muestras de caballos de alto rendimiento con melanoma. Inicialmente se realizó la caracterización histopatológica, para tener el diagnóstico confirmatorio las muestras de melanoma cutáneo. Posterior a esto se prosiguió al análisis de expresión génica de las muestras ya caracterizadas como melanoma y las caracterizadas como piel sana. Al análisis del muestreo, se observó que la mayoría (7/10, 70%) de las muestras de melanoma pertenecían a caballos

de edad avanzada (>11 años). De las muestras de melanoma, la mayoría (80%, 8/10) pertenecían a caballos de color de capa tordilla. Al análisis de la expresión génica realizada por PCR en tiempo real, comparando la expresión en piel sana, los caballos con acondicionamiento físico mostraron un nivel de expresión bastante significativo de ARNm PPAR β/δ ($p \leq 0.001$) lo cual está sugiriendo que el acondicionamiento físico eleva los niveles de expresión de PPAR β/δ . Comparando los grupos sin acondicionamiento físico, se mostró un aumento de expresión significativo de ARNm PPAR β/δ ($p \leq 0.05$) en melanoma. El acondicionamiento físico mostró diferencia numérica (0.749 U.R.), pero no estadística en la expresión del ARNm PPAR γ . Y la presencia de melanoma mostró diferencias numéricas (1.265 U.R.) pero tampoco mostró diferencias estadísticas en la expresión del ARNm PPAR γ . Estos datos sugieren un rol biológico importante de PPAR β/δ y posiblemente de PPAR γ en la carcinogénesis del melanoma que deben seguirse estudiando ya que pueden ofrecer alternativas terapéuticas o adyuvantes para la especie equina.

ABSTRACT

Equine melanoma is a neoplasm with a high frequency of presentation in horses, this frequency has increased in the last couple of decades, presumably due to the increased longevity of horses today, added to overexposure to ultraviolet (UV) rays. There are many genetic factors associated with the presentation of this neoplasm, factors that promote tissue development and factors that reduce the cell proliferation of the neoplasm. The peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) are transcription factors that belong to the super family of hormonal nuclear receptors, these intervene in multiple processes, from metabolic to intervention in inflammation and repressive control of tumor processes. Previously, these roles played in tumor development have been studied in humans and mice, the ability of peroxisome proliferation-activated receptors (PPARs) to reduce the proliferation, metastasis and angiogenesis of tumor tissue. Interactions between PPARs and carcinogenic factors in melanoma, such as the Wilms tumor gene (WT1), have been recognized. PPARs play a fundamental role in the evolution of melanoma, since they present a repressive action of the WT1 gene, which has carcinogenic characteristics in the development of multiple neoplasms such as melanoma.

The physical conditioning of horses has also been shown to be a factor related to the level of expression of PPARs, specifically the PPAR β / δ isoform, however, no studies have been carried out that analyze the expression of PPARs in relation to the level of physical conditioning of horses. The objective of the following work was to analyze the gene expression of the PPAR β / δ and PPAR γ isoforms in healthy skin and equine melanoma by means of real-time PCR and to determine their association with the level of physical conditioning, using the T test of Unpaired Student with Welch's correction and Tukey's test for intragroup comparisons. 10 healthy skin samples were collected from 10 horses, 27 melanoma samples from 10 horses. No samples were obtained from high-performance horses with melanoma. Initially, the histopathological characterization was carried out, to have the confirmatory diagnosis of the cutaneous melanoma samples. After this, the gene expression analysis of the samples already characterized as melanoma and those characterized as healthy skin was continued. Upon analysis of the sampling, it was observed that the majority (7/10, 70%) of the melanoma samples belonged to elderly horses (> 11 years). Of the melanoma samples, the majority (80%, 8/10) belonged to gray-coat colored horses. When analyzing the gene expression carried out

by real-time PCR, comparing the expression in healthy skin, the horses with physical conditioning showed a fairly significant expression level of PPAR β / δ mRNA ($p \leq 0.001$) which is suggesting that physical conditioning increases the expression levels of PPAR β / δ . Comparing the groups without physical conditioning, a significant increase in the expression of PPAR β / δ mRNA ($p \leq 0.05$) was shown in melanoma. Physical conditioning showed a numerical difference (0.749 U.R.), but not a statistical difference in the expression of PPAR γ mRNA. And the presence of melanoma showed numerical differences (1,265 U.R.) but neither did it show statistical differences in the expression of PPAR γ mRNA. These data suggest an important biological role of PPAR β / δ and possibly PPAR γ in melanoma carcinogenesis, which should be further studied since they may offer therapeutic alternatives or adjuvants for the equine species.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los estudios en torno a la salud equina han venido en aumento, esto debido a sus componentes de interés económico, en los caballos deportivos o los intereses afectivos con los caballos de propósito recreativo. Entre las múltiples causas que pueden afectar la salud de los equinos se encuentran las neoplasias, estas se conocen como un crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales pueden tener características malignas (metastásicas). Existen múltiples tipos de neoplasias, una de ellas son los melanomas, una patología frecuente en equinos de grandes complicaciones clínicas que van desde reducción de la calidad de vida, hasta ocasionar la muerte.

Las incidencias de melanoma maligno en la especie equina han incrementado en los últimos años, probablemente debido a la sobreexposición de los animales al sol o el hecho de que los caballos ahora alcanzan mayor tiempo de vida, lo cual facilita el desarrollo de patologías neoplásicas. Los melanomas son una tumoración cutánea que se desarrolla a partir de melanocitos, células productoras de melanina. Esta una neoplasia que puede cursar de comportamiento benigno a maligno, teniendo la capacidad de hacer metástasis a otros tejidos del organismo. Este proceso patológico tiene muchos componentes moleculares y genéticos asociados a su desarrollo.

Los receptores activados por proliferación del peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción que juegan papeles fundamentales en aspectos fisiológicos como lo son la diferenciación celular, la biogénesis mitocondrial, regulación de la beta oxidación, entre otros. Entre estas funciones, también participan en los procesos de carcinogénesis cutánea.

Los PPAR tienen 3 isoformas (PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ) encargadas de múltiples funciones, entre ellas, se han reportado algunos mecanismos de acción que pueden combatir la carcinogénesis. En el tejido humano se tiene determinado que la isoforma PPAR γ reduce la proliferación celular del melanoma. Recientemente se demostró que la tercera isoforma, PPAR β/δ , está expresada en melanoma humano y actúa como represor del gen del tumor de Wilms (WT1), un gen ya conocido por desempeñar un papel importante en la proliferación del melanoma.

A pesar de los estudios relacionados que se tienen acerca de las isoformas de PPAR en otras especies, y un estudio del comportamiento de PPAR β/δ antes y después del ejercicio en equinos, faltan análisis a profundidad acerca del papel que juegan los PPAR en el melanoma equino, sus

niveles de expresión y que relación se presenta con los caballos dependiendo su acondicionamiento físico. Basándose en lo anteriormente dicho, el objetivo del siguiente trabajo fue analizar la expresión génica de las isoformas de PPAR β/δ y PPAR γ en piel sana y melanoma equino y determinar su asociación con el nivel de acondicionamiento físico.

2. HIPÓTESIS

La expresión de las isoformas de los PPARs (β/δ y γ) será mayor en melanoma en comparación con piel sana en equinos y esta expresión mostrará una relación directamente proporcional con el nivel de acondicionamiento físico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de las isoformas de PPAR β/δ y PPAR γ en piel sana, melanoma equino y su relación con el nivel de acondicionamiento físico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Analizar histopatológicamente las muestras de piel sana y melanoma de equinos mediante la tinción convencional de Hematoxilina y Eosina.
- 2- Analizar la expresión de ARNm de PPAR β/δ y PPAR γ en piel sana y melanoma equino mediante qPCR.
- 3- Determinar la asociación entre el nivel de acondicionamiento físico y la expresión de PPAR β/δ y PPAR γ en piel sana y en melanoma.

4. ANTECEDENTES

4.1. Aspectos generales del cáncer

El cáncer se define como un crecimiento celular descontrolado, producido por una alteración del funcionamiento replicativo de las células y llegando a formar grandes masas de células defectuosas; estas masas o tumoraciones no ejercen ninguna funcionalidad al organismo y carecen de una disposición ordenada. En cuanto a la etiología solo se han demostrado algunas específicas para algunos tipos de tumores en perros, debido a que en su mayoría son multifactoriales en gran parte, desconocidos. Los más referenciados y conocidos hasta ahora son los factores físicos y genéticos (Alberts et al., 2010; Scott & Miller 2011; Zachary, 2017).

La patogénesis del cáncer se lleva a cabo debido a la supervivencia de estas células degeneradas, evadiendo mecanismos de apoptosis y el sistema inmunitario, encargado de la eliminación de células dañadas. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos hacen referencia a las masas de crecimiento lento y delimitado, generalmente recubiertos por una membrana que evita su propagación a otros órganos y tejidos. Mientras que los tumores malignos, son de crecimiento acelerado, consumen muchos recursos del organismo y pueden viajar por vía linfática o sanguínea a otros órganos, generando tumores secundarios o metastásicos. Existen más de 200 tipos de cáncer, generalmente, cada uno recibe el nombre de órgano, tejido, o células específicas que lo forman (Mendelsohn et al., 2008).

Los modelos de diferentes tipos de cáncer siguen siendo hasta la fecha una gran herramienta para el entendimiento de las causas detonantes de la neoplasia, estos modelos se estudian en animales mediante tumores experimentalmente inducidos o tumores naturalmente desarrollados en el animal. En modelos de cáncer inducidos experimentalmente, la administración de sustancias carcinogénicas o trasplante de células cancerígenas de origen humano resulta en la generación (neo o novo) del cáncer en los animales experimentales (Anaïs Prouteau, 2019; Zachary, 2017).

Se pueden categorizar de acuerdo con el tipo de célula que afecta. El carcinoma, es el tipo más común, iniciando en las células epiteliales, formando capas sobrepuestas de tejido. Otro tipo común es el sarcoma, formado en el tejido conjuntivo como hueso o cartílago, musculatura o vasos sanguíneos; el linfoma, generado a partir de los linfocitos, que son células blancas pertenecientes al

sistema inmunitario. Por último, el melanoma, comenzado en las células productoras de melanina, los melanocitos, encargados de proteger el contenido genético de la célula de los rayos UV y provee el color de la piel, ojos y pelo (Yang et al., 2020). La detección temprana de cualquier tipo de cáncer puede ser efectivamente tratado por medio de cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia génica (Carneiro & El-Deiry 2020; Spugnini et al., 2011).

4.2. Factores genéticos en cáncer

Una característica básica de las células cancerígenas es la inestabilidad genética, por lo tanto, en el transcurso de la división de estas células degeneradas, es común que sufran múltiples mutaciones (Read et al., 2015). Estas mutaciones oncogénicas ocurren fundamentalmente en 4 clases de genes: genes promotores del crecimiento (protoncogenes) como la beta Catenina o la K-Ras, genes supresores de tumores como es el caso de p53 (Tabla 1), genes involucrados en la reparación de ADN que promueven el mantenimiento del genoma y genes proapoptóticos como la survivina (Hawkes et al., 2016). Estos genes ya se han reseñado como marcadores moleculares y actualmente, muchos de ellos son utilizados para el diagnóstico de la evolución de un tipo de cáncer o la presencia del varios tipos de cáncer (Van der Weyden et al., 2020).

Si bien existen factores genéticos que favorecen el crecimiento y desarrollo del tejido tumoral y el cáncer, también existen factores genéticos que ayudan a prevenir o reprimir el crecimiento descontrolado de la neoplasia, actuando como supresores de este desarrollo maligno. Genes que codificarán proteínas que favorecerán la inhibición del crecimiento tumoral o bien la estimulación de la muerte celular del tejido neoplásico (Tabla 1).

| Gen | Locus | Neoplasia |
|------------------|--------------|---|
| Rb1 | 13q14 | Retinoblastoma, Osteosarcoma y Pulmón |
| P53 | 17q12-13.3 | Astrocitoma Osteosarcoma |
| WT1 | 12p13 | Tumor de Wilms |
| DCC | 18q21 | Carcinoma de colon |
| NF-1 | 17q11.2 | Neurofibromatosis tipo 1 |
| APC y MCC | 5q21-22 | Carcinoma de colon |
| MEN-1 | 11q13 | Páncreas, Paratiroides, Hipófisis y Corteza adrenal |
| MEN-2 | 10q11 | Carcinoma papilar de tiroides |
| BRCA-1 | 17q21 | Cáncer de ovario |

Tabla 1. Genes que actúan como supresores tumorales. Adaptado de:(Rangel-Sánchez et al., 2021).

4.2.1. Neoplasias y cáncer en equinos

En cuanto a la especie equina, la prevalencia de neoplasias es considerablemente baja, dato poco actualizado, pero su incidencia se estima 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. Su incidencia en comparación a otras especies domésticas también es considerablemente baja. La razón por la cual la especie equina tiene esta aparente resistencia al desarrollo de neoplasias malignas y benignas aún se desconoce, no obstante, se tienen conceptualizadas algunas teorías genéticas, de acondicionamiento y nutricionales que se han propuesto (Davis & Rush 2013; Edge et al., 2015; Michiels et al., 2010). Cabe resaltar que

factores como la edad y el color de capa del caballo, aumentan considerablemente la predisposición de ellos a desarrollar esta patología (Figura 1) (Burden, 2011).



Figura 1. Aspecto clínico de un paciente equino con melanoma maligno. Se aprecian tumoraciones multifocales en un grado avanzado de evolución en la región perianal y el maslo de la cola. Foto tomada de un paciente equino remitido al Hospital de Grandes Especies de la UANL. Fuente: Autor.

4.2.2. Melanoma en equinos

El melanoma es una neoplasia caracterizada por el crecimiento descontrolado de las células productoras de melanina, los melanocitos (Figura 1) (Edition, 2010; Phillips & Lembcke, 2013). Dependiendo de su nivel de proliferación estos pueden ser suaves o sólidos a la palpación. El melanoma equino puede proliferar de manera aislada en un tejido o puede estar agrupado a otras

masas tumorales, comúnmente con el carcinoma de células escamosas. La masa tumoral suele ser de color gris a negro intenso, aunque algunos de estos pueden carecer de color, en el caso del melanoma amelanocítico (Alonso et al., 2019; Busato et al., 2017). Se diferencian entre tumores benignos o malignos, no poseen clasificaciones oficiales por estadios como el melanoma en humanos (Figura 2 y 3) (Burden, 2011; Fossati, 2010; Knottenbelt et al., 2015). Sin embargo, se han podido reportar 4 diferentes formas de tumores melanocíticos equinos; el nevus melanocítico, melanoma dermal, melanocitosis dermal y melanoma anaplásico maligno (Burden 2011; Read et al., 2015; Valentine 1995; Van der Weyden et al., 2020).



Figura 2. Melanoma equino. Gran confluencia de melanomas nodulares y en forma de placa en la base de la cola y el perineo con ulceración y comienzos de invasión en la cavidad perianal. Foto tomada de un paciente equino remitido al Hospital de Grandes Especies de la UANL. Fuente: Autor.

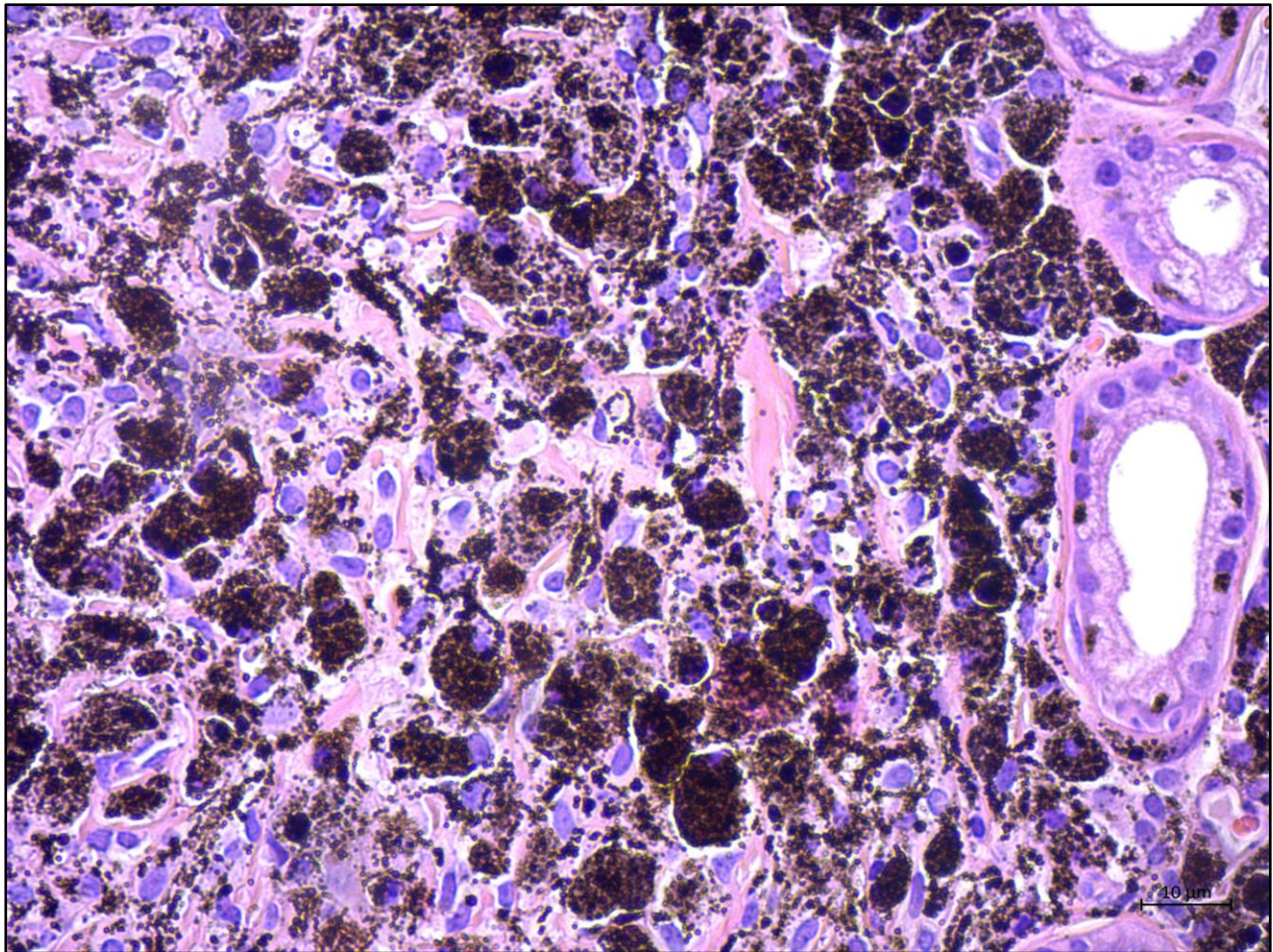


Figura 3. Corte histológico teñido con Hematoxilina y Eosina del melanoma equino. Se muestra células neoplásicas pleomórficas y pigmentadas de forma variable que se infiltran en el tejido conectivo y distorsionan toda la arquitectura de la piel. Fuente: autor. Microscopía de luz en aumento 40x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 10μm. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

En cuanto a tratamientos para los melanomas, si bien se han probado muchas terapias, no existe un tratamiento ampliamente aceptado para esta patología (Domingues et al., 2018; Pelster & Amaria 2019). Un número limitado de tumores malignos en etapa temprana ubicados en la cola o en la región perineal se extirparon quirúrgicamente con aparente éxito. Sin embargo, la escisión quirúrgica no es una opción realista en muchos casos avanzados, particularmente aquellos con invasión local significativa de tumores en áreas, como la glándula salival parotídea, que presentan un enfoque quirúrgico más complicado. También es importante tener en cuenta que la escisión

localizada no previene la progresión de la enfermedad (Figura 4) (Phillips & Lembecke, 2013; J. F. Zachary, 2017). La cimetidina, un antagonista del receptor de histamina tipo II, se ha utilizado como agente terapéutico para melanoma (Moore et al., 2013; Seltenhammer et al., 2003).



Figura 4. Sitio de extracción de una masa tumoral de melanoma de paciente equino. Se resalta una ubicación anatomopatológica poco común de un melanoma. Foto tomada de un paciente equino remitido al Hospital de Grandes Especies de la UANL. Fuente: Autor.

Se han propuesto varios mecanismos de acción para la cimetidina, incluida la inactivación selectiva de las células T supresoras, una mayor actividad de las células asesinas naturales, el antagonismo de los receptores de histamina tipo II y los efectos antiinflamatorios, pero su importancia con respecto al tratamiento del melanoma equino aún no se ha establecido (Domingues et al. 2018). Los resultados inconsistentes han convertido a la cimetidina en una opción de tratamiento poco confiable para los caballos con el melanoma equino. Algunos proponen que estas inconsistencias pueden estar relacionadas con la variabilidad dentro del melanoma equino en sí, lo que sugiere que las variaciones en el metabolismo celular, la diferenciación o la activación del receptor pueden ser responsables, pero no hay evidencia para corroborar esta teoría (Domingues et al., 2018; Dummer et al., 2020; Grahovac et al., 2019; Leonardi et al., 2018).

4.3. Genes asociados a los melanomas equinos

En las últimas décadas se ha reconocido una conexión entre el color de la capa gris y el melanoma equino, debido a que este color de capa (tordillo) es el más frecuente en los caballos que desarrollan esta patología. Se ha propuesto un rasgo autosómico completamente dominante controlado por una mutación reguladora, más específicamente una duplicación de 4,6 kb en el intrón 6 de la sintaxina-17, como el vínculo genético probable entre el color del pelaje gris y la EMM. La mutación está asociada con 4 genes: NR4A3 (subfamilia de receptores nucleares hormonales 4, grupo A, miembro 3), STX17 (sintaxina 17), TXNDC4 (dominio tioredoxina-contiene-4 ') e INVS (inversina), con niveles notablemente más altos de STX17 y NR4A3 presentan melanomas. Los caballos que eran homocigotos para la mutación se encontraron de color gris más rápidamente y también eran más homogéneamente blancos con menos manchas que los heterocigotos. También se descubrió que los homocigotos exhiben una incidencia significativamente mayor de melanoma (Sánchez-Guerrero et al., 2019; Schott II & Peterson 2005).

4.4. PPAR en cáncer

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) son factores de transcripción activados por ligando. Las tres isoformas de PPAR, PPAR α , PPAR β/δ (también conocidas como PPAR β o PPAR δ) y PPAR γ , se encuentran en todas las especies de mamíferos que se han examinado hasta la fecha (Berger et al., 2005; Hastie, 2017). Desde la identificación de la familia PPAR hace más de 20 años, numerosos estudios han revelado que los PPAR influyen en muchas funciones biológicas importantes, como la inflamación, la supervivencia celular y la diferenciación (Dubois et al., 2017; Han et al., 2017). Su mecanismo de acción suele estar acompañado de cofactores de activación o represión como en Receptor Retinoide X (RXR), el cual, por medio de un ligando endógeno o exógeno activa la región de transcripción, dando como resultado una represión o activación génica (Figura 5 y 6).

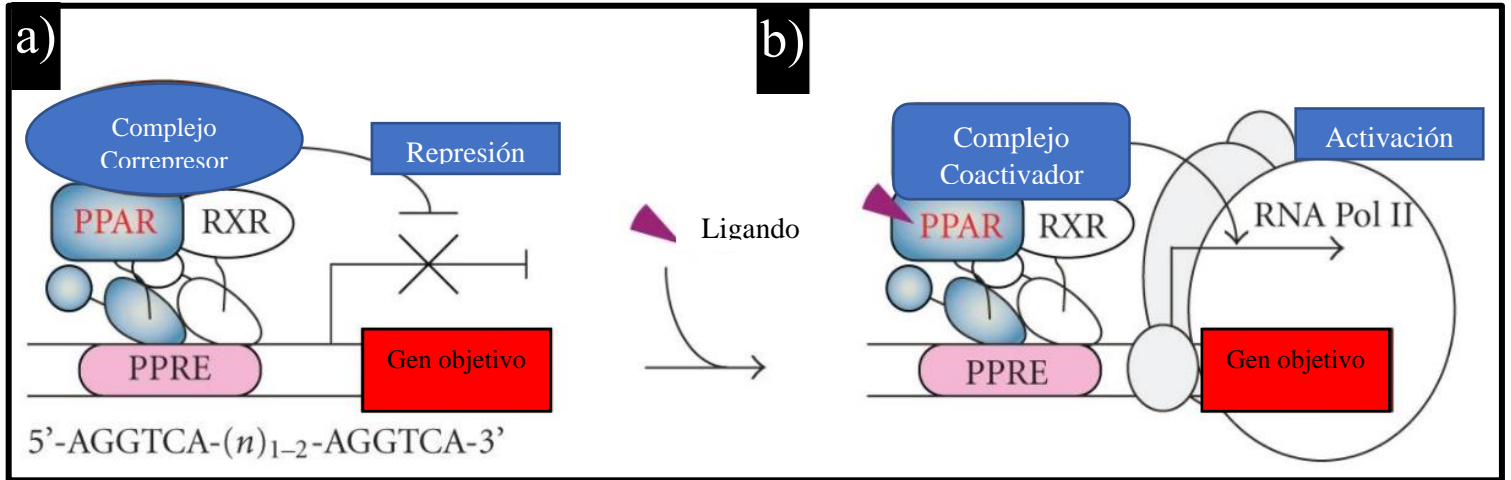


Figura 5. Esquematación del mecanismo de acción básico de los receptores activados por proliferación de peroxisoma. a) Mecanismo de activación del PPAR en conjunto con el RXR y ligandos específicos para generar el complejo correpresor (circulo marrón). b) Mecanismo de activación del PPAR en conjunto con el RXR y ligandos específicos para generar el complejo coactivador (circulo amarillo). Adaptado de: (Zoete et al., 2007).



Figura 6. Estructura proteica de los receptores activados por proliferación del peroxisoma. Se pueden apreciar los 4 dominios proteicos, señalando la ubicación de los dedos de zinc y las regiones activadores de la transcripción, AF1 y AF2. Adaptado de: (Zoete et al., 2007).

Sus características particulares entre cada una de las isoformas están otorgadas basándose en los dominios proteicos específicos de cada una de ellas, junto con su ubicación en cada célula y su disposición tridimensional (Figura 7) (Kersten et al., 2000; Mendelsohn et al., 2008; Tachibana et al., 2008).

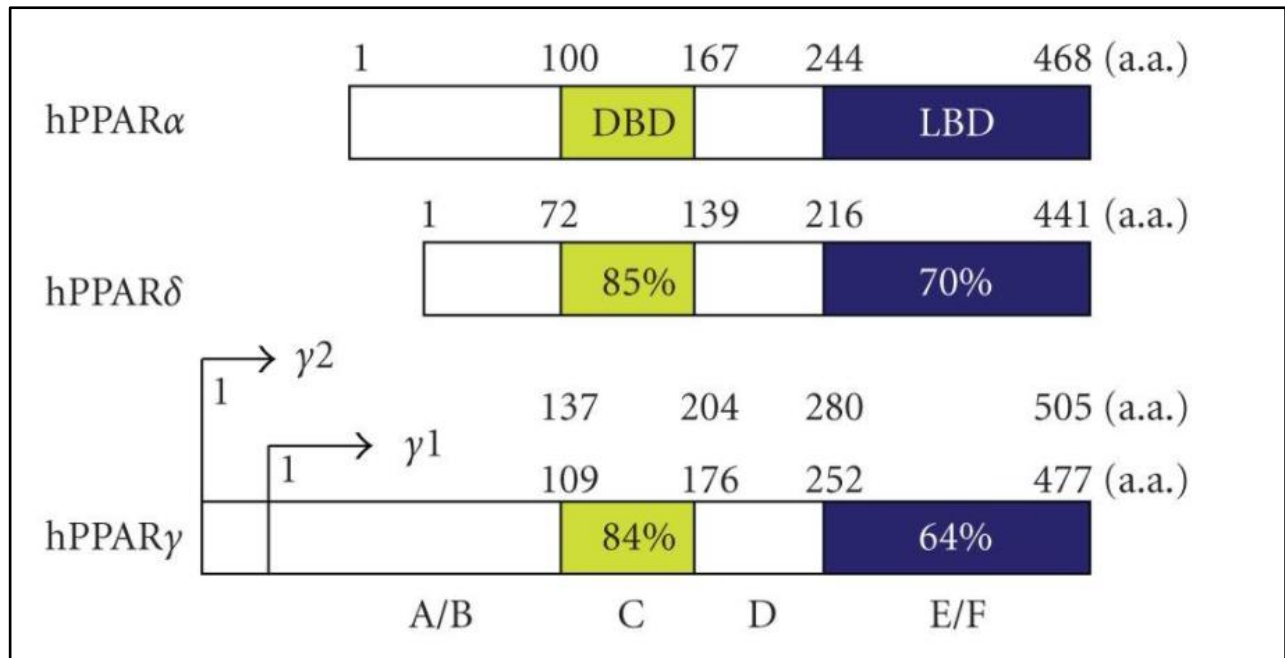


Figura 7. Estructura proteica de las 3 isoformas de los receptores activados por proliferación del peroxisoma en humanos. Se pueden apreciar las diferencias entre las tres isoformas, destacando la cantidad de aminoácidos en cada uno de los dominios (A/B, C, D y E/F). Adaptado de: (Tachibana et al., 2008).

Los PPARs son activados por ligandos endógenos que se derivan del metabolismo de los ácidos grasos y otros compuestos que se encuentran en la dieta, lo que es consistente con el hecho de que los PPARs regulan la expresión de muchos genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. A través de este mecanismo, la homeostasis celular se mantiene durante los períodos de alimentación y hambre. Las drogas y otros xenobióticos también pueden modular de manera diferencial las actividades reguladoras de PPAR. Aún no está claro si los PPAR funcionan como supresores de tumores o como oncogenes en el cáncer. La complejidad de las vías que están reguladas por los PPAR, y la propensión de estas vías a ser alteradas en el cáncer, ofrece alguna explicación para las funciones dispares de los PPAR en diferentes tipos de tumores (Müller, 2017; Peters et al., 2015). Sin embargo, ya se han reconocidos mecanismos específicos del funcionamiento de algunos ligandos de los PPARs, que han demostrado tener funciones específicamente

anticancerígenas como es el aumento de la adhesión celular en la masa tumoral y la reducción de la angiogénesis hacia la formación neoplásica (Figura 8).

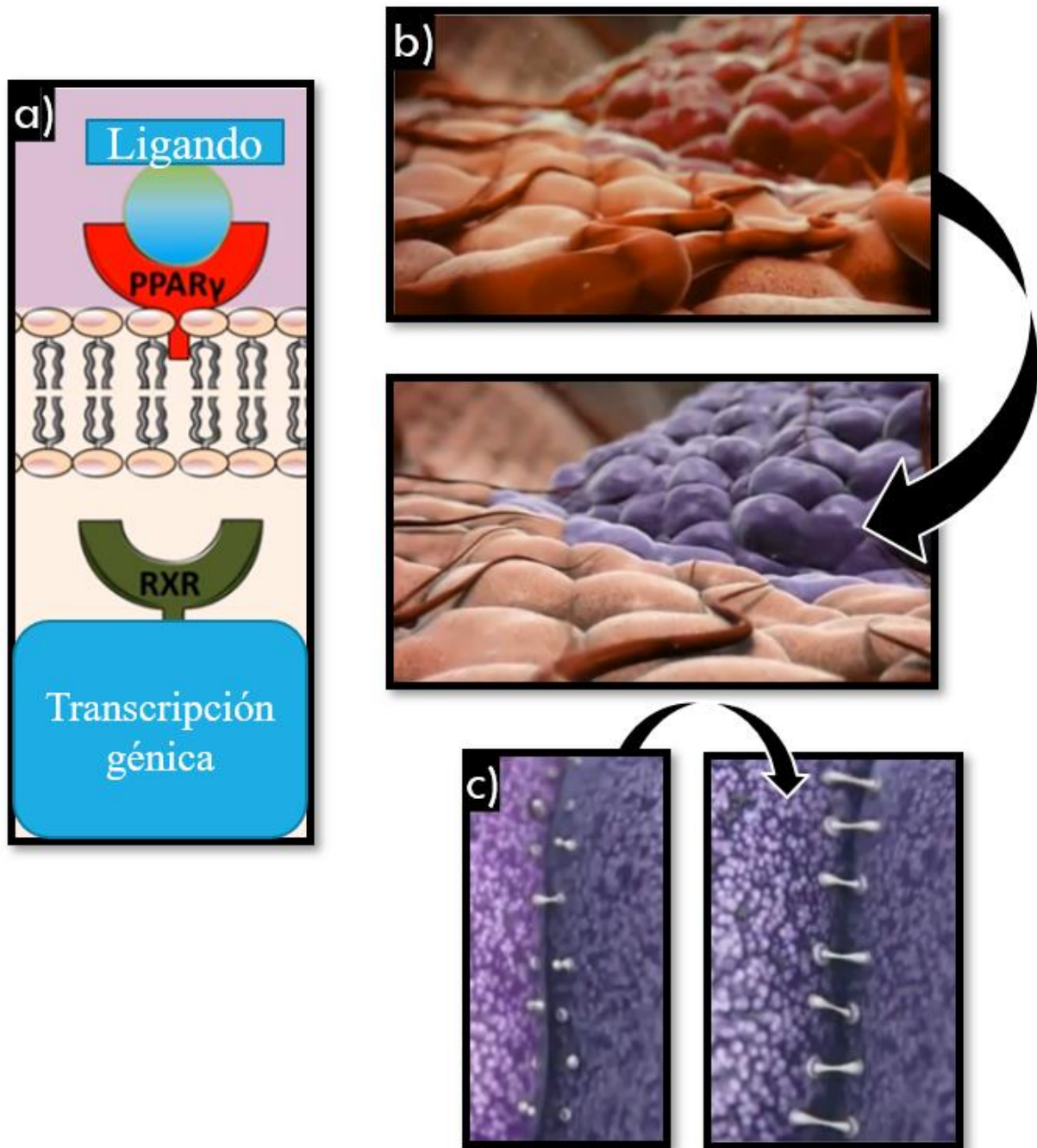


Figura 8. Mecanismos de acción anticancerígenos teorizados de los PPARs. a) Unión del ligando específico de la isoforma de PPAR a ser activada. b) Reducción de la angiogénesis generada hacia la masa tumoral. c) Aumento de la adhesión celular para evitar masas tumorales secundarias o metastásicas.

Elaboración: Autor. Adaptado de: (Balignasay, 2016; Gupta et al., 2015).

4.4.1. Receptor activado por proliferación del peroxisoma alfa (PPAR α)

PPAR α , que fue el primer PPAR en ser identificado, se expresa en muchos tejidos, particularmente aquellos que requieren oxidación de ácidos grasos como fuente de energía. PPAR α es central para el mantenimiento de la homeóstasis lipídica: una función principal de PPAR α es aumentar la capacidad celular para movilizar y catabolizar los ácidos grasos, particularmente en el hígado durante la inanición, donde la oxidación de los ácidos grasos es esencial para la producción de energía. En estas condiciones, PPAR α probablemente se activa por ácidos grasos endógenos y derivados de ácidos grasos. PPAR α es también el objetivo molecular de los fibratos, que son fármacos ampliamente utilizados que reducen los lípidos séricos a través del aumento de la oxidación de los lípidos (Ferri et al., 2017; Jørgensen et al., 2018).

El número de genes a los que PPAR α afecta de manera directa es grande y se ha revisado en otro lugar, pero incluye muchos que codifican enzimas que están involucradas en el metabolismo de glucosa, lípidos y aminoácidos. PPAR α también puede mejorar la resistencia a la insulina en modelos de diabetes con alto contenido de grasa y genéticos a través de cambios pleiotrópicos en la expresión génica que evitan el aumento de peso y la adiposidad (Cheng et al., 2019; Harmon et al., 2011; Zieleniak et al., 2008).

4.4.2. Receptor activado por proliferación del peroxisoma gamma (PPAR γ)

Los efectos fisiológicos de la activación de PPAR γ están mediados principalmente por PPAR γ 1 y PPAR γ 2, que se derivan de cuatro ARNm diferentes (PPARG1, PPARG2, PPARG3 y PPARG4). Todavía no se han determinado patrones de expresión cuantitativos completos de PPAR γ a nivel de proteína en ninguna especie, pero la expresión de PPAR γ se ha demostrado en muchos tipos de células. Se encuentra una inmunoreactividad inespecífica significativa con algunos anticuerpos dirigidos a PPAR γ , lo que probablemente afecta la interpretación de los resultados de los estudios que examinan la expresión de PPAR γ (Paulitschke et al., 2012; Sakharkar et al., 2013). Los ácidos grasos poliinsaturados, los derivados de ácidos grasos como 15-desoxi- Δ -12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2), ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE), 13-HODE y ácidos grasos nitrados pueden activar PPAR γ y pueden ser ligandos endógenos. PPAR γ es crucial para el desarrollo, en particular de la placenta y el corazón, y también es esencial para la adipogénesis y

almacenamiento de grasa. El tejido adiposo blanco es el objetivo principal de los agonistas de PPAR γ , las tiazolidinedionas, que disminuyen los lípidos séricos al aumentar la adipogénesis y el almacenamiento de lípidos, y que aumentan la expresión de diversas adipocinas, como la adiponectina y la resistencia, que aumentan colectivamente la sensibilidad a la insulina (Peters et al., 2012).

4.4.2.1. Receptor activado por proliferación del peroxisoma gamma (PPAR γ) en la carcinogénesis

PPAR γ está estrechamente vinculado con los ligandos activadores como 15-desoxi- Δ -12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2), un ligando endógeno y las tiazolidinedionas, ligandos exógenos; y en el último par de décadas, ligandos sintéticos y no sintéticos han sido estudiados por su capacidad de inhibir la agresiva proliferación de las células del melanoma (Figura 9) (Hihi et al., 2002; Núñez et al., 2006).

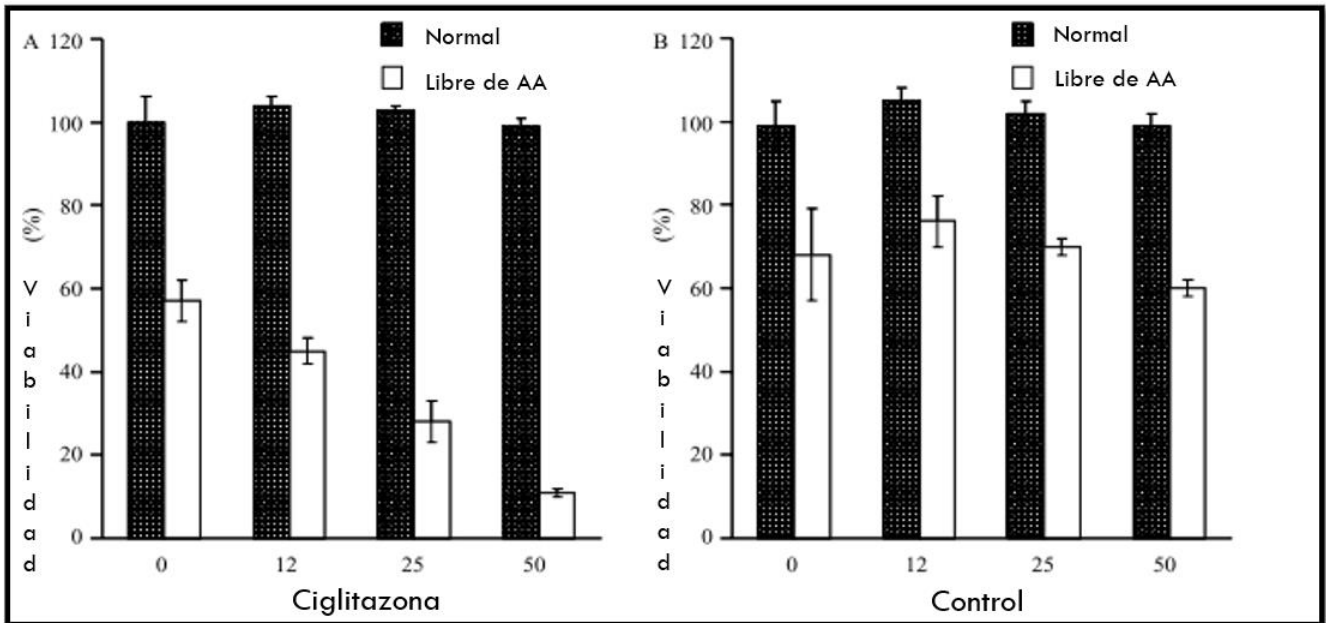


Figura 9. Activación farmacológica de PPAR γ en líneas celulares de melanoma de origen humano A375. Se observa como la Ciglitazona en combinación con la privación de los aminoácidos Tirosina y Fenilalanina (AA en la figura) inhibe la proliferación de la línea celular A375 del melanoma. Adaptado de:(Núñez et al., 2006).

4.4.3. Receptor activado por proliferación del peroxisoma Beta/Delta (PPAR β/δ)

El receptor activado por proliferador del peroxisoma beta/delta (PPAR β/δ) es un receptor nuclear hormonal que funciona como un factor de transcripción controlado por ligando en diversos procesos biológicos. Si bien se conoce bien su papel en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, su función en la inflamación es compleja y no se ha aclarado por completo. PPAR β/δ generalmente se asocia con efectos antiinflamatorios, pero su activación también puede promover distintas funciones de estimulación inmunológica. PPAR β/δ también regula la glucosa y la homeostasis lipídica. PPAR β/δ se expresa en la mayoría de los tejidos en roedores y humanos, y la expresión de PPAR β/δ parece ser el más alto en los epitelios del intestino, colon y piel. En el cual un estudio ha demostrado que se localiza con RXR en el núcleo. Los ligandos que activan PPAR β/δ aumentan los niveles séricos de colesterol de lipoproteínas de alta densidad en ratas, primates no-humanos y humanos. Esto probablemente esté mediado por la expresión dependiente de PPAR β/δ del transportador inverso de colesterol ATP que se une al casete A1 y por un aumento del flujo de colesterol específico de apolipoproteína A1 (Mackenzie & Lione 2013; Peters et al., 2012).

La activación del ligando de PPAR β/δ también puede disminuir los triglicéridos séricos, prevenir la obesidad inducida por la dieta alta en grasas, aumentar la sensibilidad a la insulina y mejorar los síntomas asociados con el síndrome metabólico a través de la regulación de genes que codifican enzimas metabolizadoras de ácidos grasos en el músculo esquelético y genes que codifican proteínas lipogénicas en el hígado. PPAR β/δ también inhibe la inflamación hepática causada por estímulos genéticos, dietéticos y químicos, en parte por la transrepresión de la señalización dependiente de NF- κ B, lo que resulta en una expresión reducida de citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6. La activación de PPAR β/δ también puede promover la diferenciación terminal en queratinocitos, epitelio intestinal, oligodendrocitos y osteoblastos, y esta función podría tener consecuencias importantes para el desarrollo del tumor (Desvergne et al., 2019; Ignacio-Garza, 2015; Müller, 2017; Peters et al., 2012).

Su secuencia proteica de aminoácidos en comparación a las de otras especies muestra una composición de regiones conservadas (Figura 10) (Cho et al., 2015; Katarzyna Ropka-Molik et al., 2017; Zoete et al., 2007).

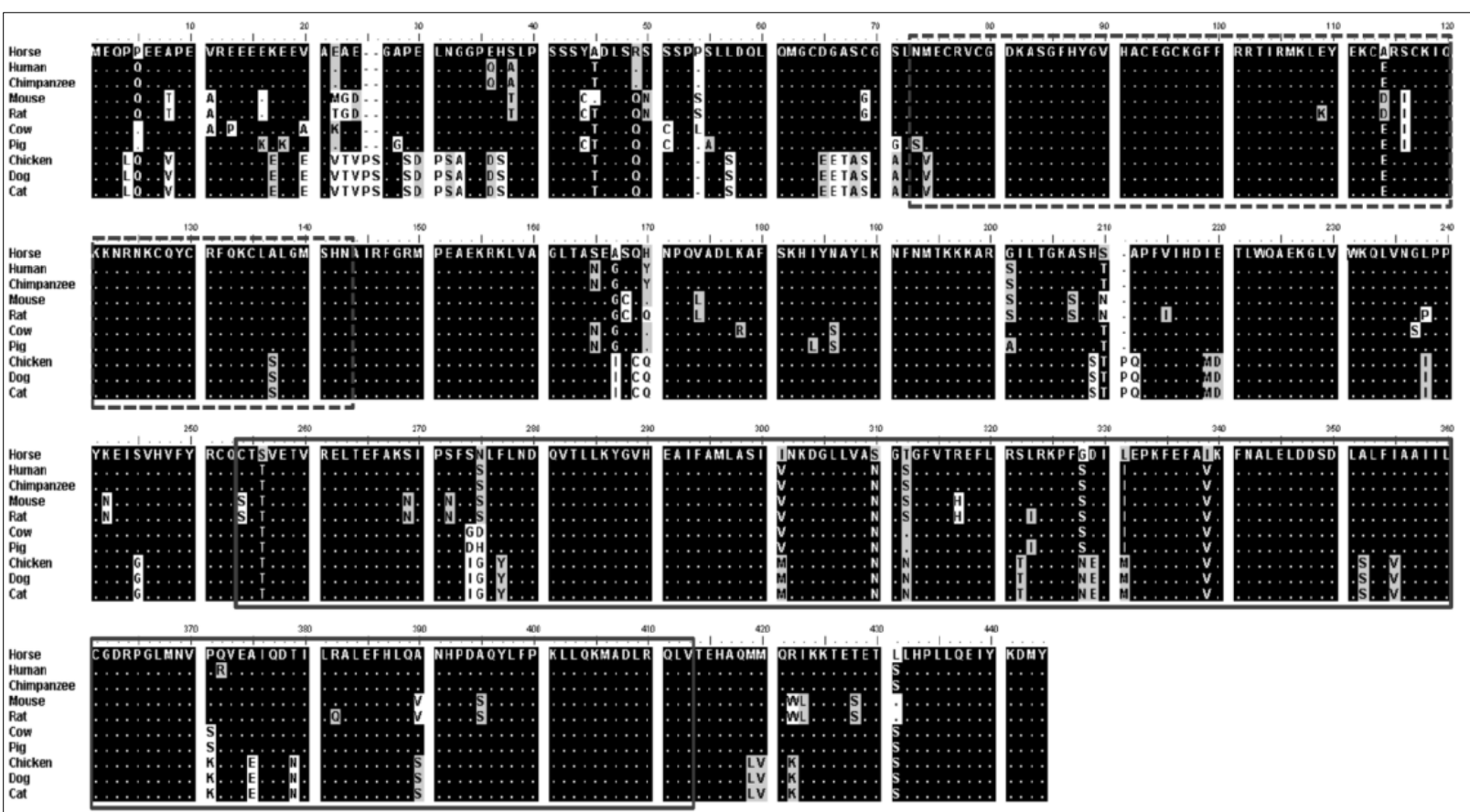


Figura 10. Comparación de la secuencia de aminoácidos de PPAR en diferentes especies. Se puede apreciar regiones conservadas en la especie equina, como los dedos de zinc C4 (recuadro superior de línea punteada) y los ligandos de unión (recuadro inferior). Ambos dominios denotan regiones conservadas de este receptor nuclear hormonal. Adaptado de (Cho et al., 2015).

4.5. Estudios de los PPAR y el acondicionamiento físico en equinos

La relación entre PPAR β/δ y el acondicionamiento físico se tenía conceptualizada por el papel que juegan los receptores nucleares PPARs en procesos metabólicos como la beta oxidación, PPAR β/δ particularmente desempeña roles en el metabolismo muscular a través de la oxidación de ácidos grasos en músculo (K Ropka-Molik et al., 2017).

Recientemente se ha realizado un estudio que media la expresión de PPAR β/δ antes y después del ejercicio, para determinar que tanto variaba la expresión de este factor de transcripción. En el análisis por RT-PCR se demostró que los niveles de expresión de PPAR β/δ musculoesquelético aumentaban considerablemente después de una exposición del organismo a ejercicio físico (Figura 11).

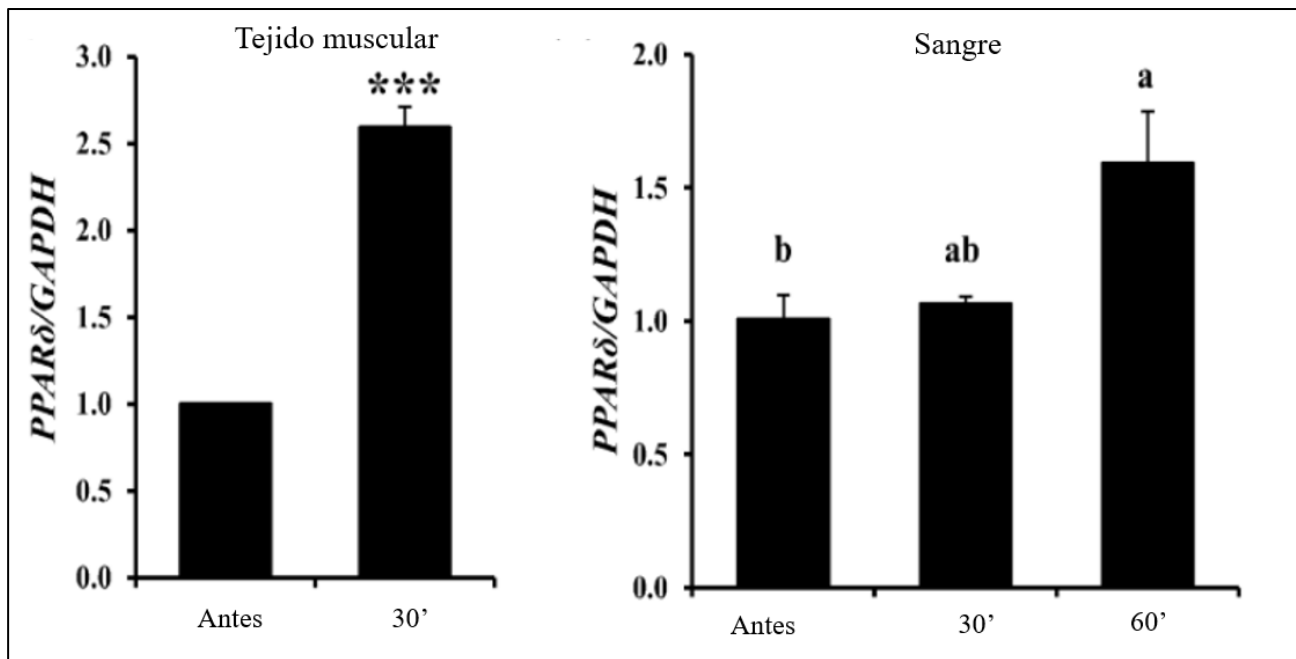


Figura 11. Análisis de la expresión de PPAR β/δ antes y después del ejercicio en músculo esquelético y leucocitos. (A) Nivel de expresión de PPAR β/δ antes y 30 minutos después del ejercicio en músculo esquelético de equino. Se aprecia que la expresión de PPAR β/δ aumentó cerca de 2.5 veces al cabo de los 30 minutos después del ejercicio en tejido musculoesquelético. (B) Análisis de expresión del PPAR β/δ equino antes y después del ejercicio en leucocitos. Los niveles de expresión de PPAR β/δ aumentaron significativamente luego de 60 minutos después del ejercicio en comparación a los niveles expresados antes del ejercicio (Cho et al., 2015).

4.6. Estudios de la actividad de PPAR β/δ como inhibidor de la proliferación celular del melanoma

Interacciones moleculares que existen entre los PPARs y el melanoma maligno cutáneo ya se han estudiado en humanos y ratones. Se conoce que la activación de la isoforma PPAR α inhibe el potencial metastásico del melanoma y que la isoforma PPAR γ reduce la proliferación celular de la neoplasia. En el siguiente estudio realizado en la universidad Nice-Sophia Antipolis, en Francia, se demostró que PPAR β/δ reprime a WT1, evitando de esta manera su actividad carcinogénica (Figura 12)(Michiels et al., 2010).

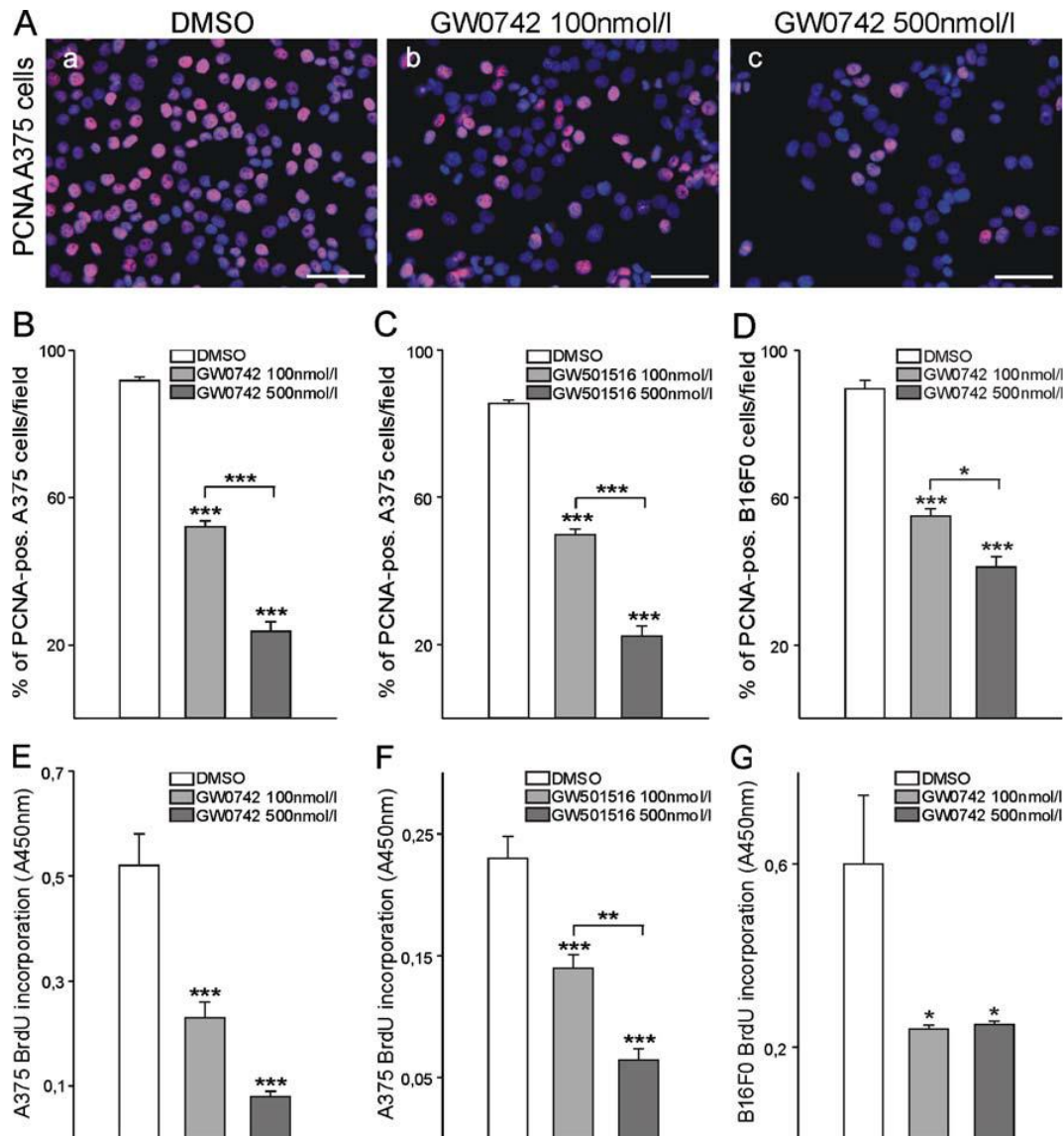


Figura 12. Activación farmacológica de PPAR β/δ en líneas celulares de melanoma de origen humano y murino A375 (humano) y B16F0 (ratón). Las células de melanoma fueron tratadas con diferentes concentraciones de dos Agonistas de PPAR β/δ , GW0742 o GW501516, durante 24 h. 1 activación de PPAR β/δ inhibe la proliferación celular del melanoma. Las células tratadas con agonista de PPAR β/δ fueron inmunotintado con un antígeno nuclear celular antiproliferativo (PCNA) anticuerpo y contratintado con DAPI (a (a – c)). Celdas en siete campos ópticos aleatorios se contaron y el porcentaje de PCNA positivo células determinadas (b – d; para cada línea celular y cada agonista, n = 3, P <0,001). Alternativamente (e – g), las células se incubaron con 5-bromodeoxiuridina (BrdU) seguida de detección inmunológica de la BrdU incorporada (para cada línea celular y cada agonista, n = 4, P = <0,001 para celdas A375 y, P = <0,05 para celdas B16F0). Adaptado de (Michiels et al. 2010).

Se demostró que la activación farmacológica de PPAR β/δ reducía los niveles proteicos de nestina y zyxina, proteínas que desempeñan roles esenciales en la patogénesis y la angiogénesis de múltiples neoplasias, como el melanoma (Bernal & Arranz, 2018; Van der Gaag et al., 2002; Kotb et al., 2018; Matsuda et al., 2013). Se supo también que las isoformas de WT1 están relacionadas con el nivel de agresividad del tumor y que PPAR β no tiene la capacidad de reprimir todas las isoformas de WT1 (Michiels et al., 2010).

5. JUSTIFICACIÓN

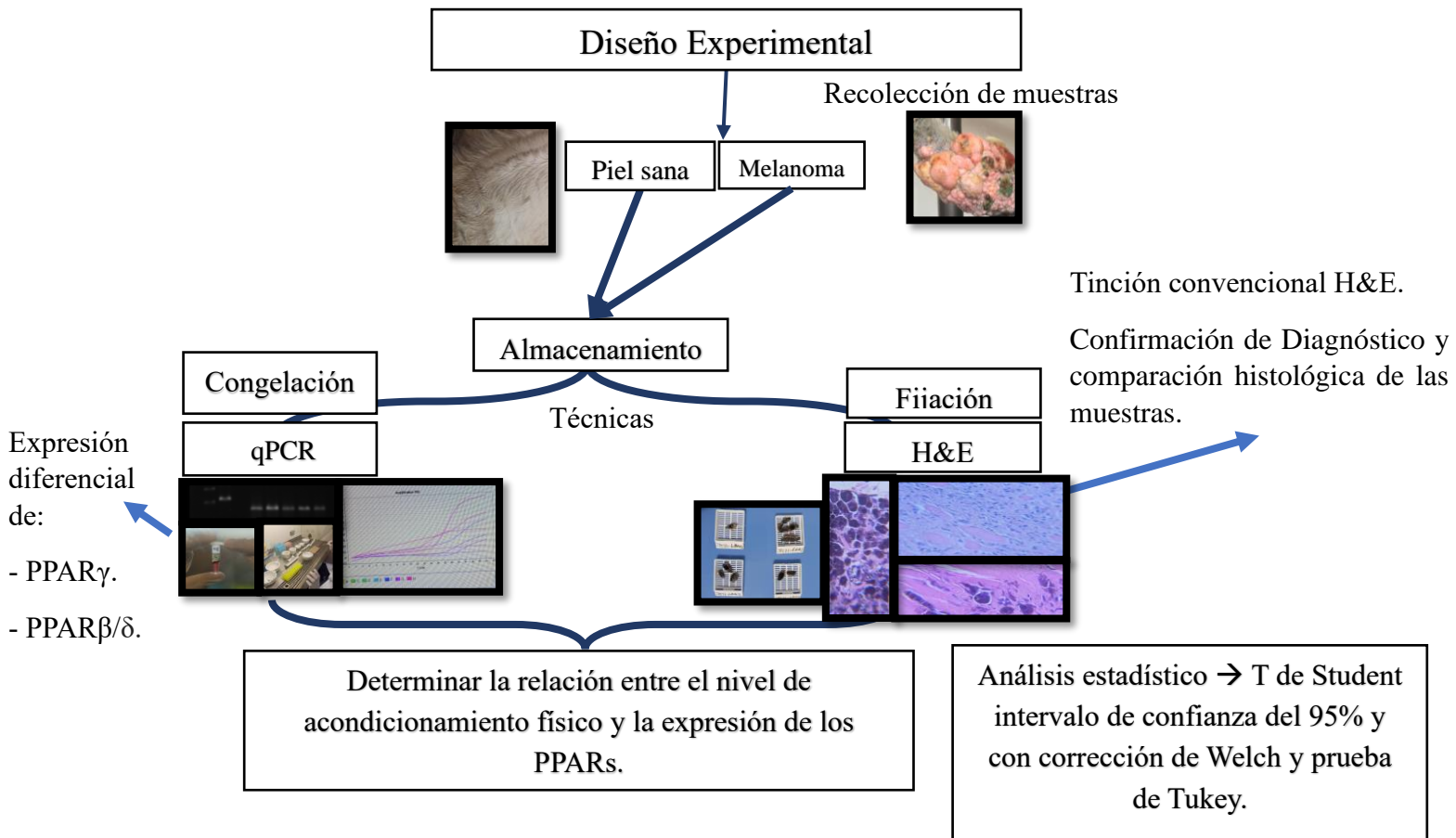
La salud equina es un tópico de alto interés para la medicina veterinaria debido a los componentes económicos, recreativos y afectivos que representan estos animales en la actualidad. Las neoplasias son un problema de salud bastante recurrente en caballos, entre estas, las neoplasias cutáneas. Las neoplasias cutáneas tienen múltiples presentaciones y etiologías, siendo el melanoma una de las más frecuentes. Los melanomas tienen diferentes grados de malignidad, presentaciones clínicas y morfológicas con diferentes tiempos de evolución. Por estas razones es fundamental poder reconocer los componentes moleculares que juegan un papel importante en el desarrollo de las células neoplásicas.

Anteriormente se ha estudiado en humanos y ratones, la capacidad que tienen los receptores activados por proliferación del peroxisoma (PPARs) de reducir la proliferación, metástasis y angiogénesis del tejido tumoral. Se han reconocido las interacciones entre los PPARs y factores carcinogénicos en el melanoma, como el gen del tumor de Wilms (WT1). Los PPARs juegan un papel fundamental en la evolución del melanoma, puesto que presentan una acción represora de gen WT1, el cual presenta características carcinogénicas en los melanomas, sin embargo, estos estudios aún no han sido realizados en caballos, por lo que se desconoce si su comportamiento molecular es similar, igual o diferente en esta especie.

Determinar las isoformas de PPARs que actúan en mayor cantidad en los melanomas malignos cutáneos en equinos y sus interacciones moleculares será de gran ayuda para reconocer factores de riesgo que nos ayuden a predecir la resolución de un melanoma y de esta manera poder actuar con medicina preventiva en las etapas iniciales de la patología.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño experimental:



6.2. Recolección de muestras:

6.2.1. Animales de estudio

Como criterio de inclusión para nuestros grupos se tuvo en cuenta el acondicionamiento físico de los animales (de alto rendimiento y de bajo rendimiento), basándose en su función zootécnica (salto, carreras, charrería, exposición, recreación); se tomaron muestras de caballos de clubes hípicas del área metropolitana de Monterrey o caballos que fuesen remitidos al Hospital de Grandes Especies de la Universidad Autónoma de Nuevo León. De estos caballos se recolectaron muestras de piel sana y tumoraciones sospechosas de melanoma. Sobre la base de los criterios de inclusión se tuvieron los grupos de alto acondicionamiento físico y bajo acondicionamiento físico, teniendo como variable adicional la presencia de melanoma en ambos grupos.

6.2.2. Proceso de muestreo

Se recolectaron 10 muestras de piel sana y 27 muestras de melanomas de los caballos muestreados. Para la toma de muestra se realizó la asepsia correspondiente para la obtención de las muestras de piel sana y melanoma de regiones del maslo de la cola y la región perianal. Se realizó inducción de anestesia con dosis de 1.1 mg/kg Xilacina al 10 % (Procin®Equus-PiSA farmacéutica Agropecuaria, DF, México) y dosis de 0.01 mg/kg de Detomidine (Domosedan®-Pfizer AG, Zurich, Switzerland) a través de vena yugular, posteriormente se rasuró y se desinfectó el área de recolección de muestra. Se anestesió con 10ml de Lidocaína al 2 % (Pisacaina®-PiSA farmacéutica Agropecuaria, DF, México) en el perímetro del tumor. El tejido se retiró con técnica de extracción quirúrgica estándar. También se tuvo en cuenta que el caballo no hubiese realizado ejercicio en las horas previas a la extracción de las muestras para reducir sesgos en el experimento.

Las muestras fueron guardadas en bolsas plásticas rotuladas con los datos generales del caballo muestreado y la fecha de recolección, las muestras fueron transportadas en cajas de material aislante térmico para mantener la cadena de frío de los tejidos recolectados durante su transporte. Posteriormente, las muestras fueron resguardadas a -20°C en el congelador del departamento de genética, departamento perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ).

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

6.3.1. Toma de la muestra:

La muestra ya previamente fijada (piel sana y melanoma), se lavó con agua directa de la llave y se cortó empleando una hoja de bisturí realizando la mínima presión en el tejido, para evitar distorsionar sus estructuras microscópicas, 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. El resto de cada tejido se volvió a almacenar en los recipientes con formalina al 10%.

6.3.2. Fijación de las muestras:

Una vez cortados, los tejidos se colocaron en un casete 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 rápidamente el tejido fijando y confiriendo cierta dureza para mantenerse intactos durante todo el proceso de la técnica.

6.3.3. Inclusión de las muestras:

Pasadas las 48 horas se sacaron los casetes y se lavaron con agua corriente, se pasaron al Histoquinete en donde se guardaron durante un día.

Procedimiento:

I. Se deshidrataron las muestras para extraer el agua de los tejidos y que el solvente actúe correctamente.

| 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. |

Tabla 2. Deshidratadores de los Tejidos.

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

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

Tabla 3. Aclaradores de los Tejidos.

III. Por último se incluyeron en baños de parafina.

| Pre-inclusiones | Tiempo de duración de las muestras en c/u |
|-----------------|---|
| Parafina I | 1:30 (hora y media) |
| Parafina II | 1:30 (hora y media) |

Tabla 4. Líquidos de pre-inclusión de los tejidos.

Nota: Cada una de las soluciones esta vertida en una jarra que forma parte del histoquinete y por medio del mecanismo giratorio automático va cambiando las muestras de solución en solución después del tiempo establecido anteriormente, los tejidos siempre permanecieron cada uno en su casete individual.

Una vez terminado el proceso en el histoquinete, los tejidos fueron extraídos del casete y se pasaron a la inclusión final para formar los bloques de donde se extraerán 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 hagan líquidos. 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 solidifiquen 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.

6.3.4. Microtomía:

Antes de realizar los cortes en el microtomo, los bloques se metieron al congelador para que las secciones del tejido estén uniformes. Posteriormente se realizaron los cortes a 4µm. Se desprendieron del micrófono con un estilete y 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 de Hematoxilina y Eosina.

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

6.4.1. Coloración o tinción de las muestras:

En una gradilla metálica se colocaron las laminillas que van a contener la piel sana y melanoma 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 en el siguiente orden:
 - 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 la coloración de 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.
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.
 - Alcohol/xilol por 2 minutos.
13. Se pasaron a un baño de xilol por 2 minutos.
14. Finalmente se realizó el montaje.

6.4.2. Montaje:

Cada laminilla se sacó del xilol y se le 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 cubreobjetos con especial cuidado para evitar la formación de burbujas sobre el tejido al momento de la adhesión del cubreobjetos con la laminilla para la observación de los tejidos al microscopio.

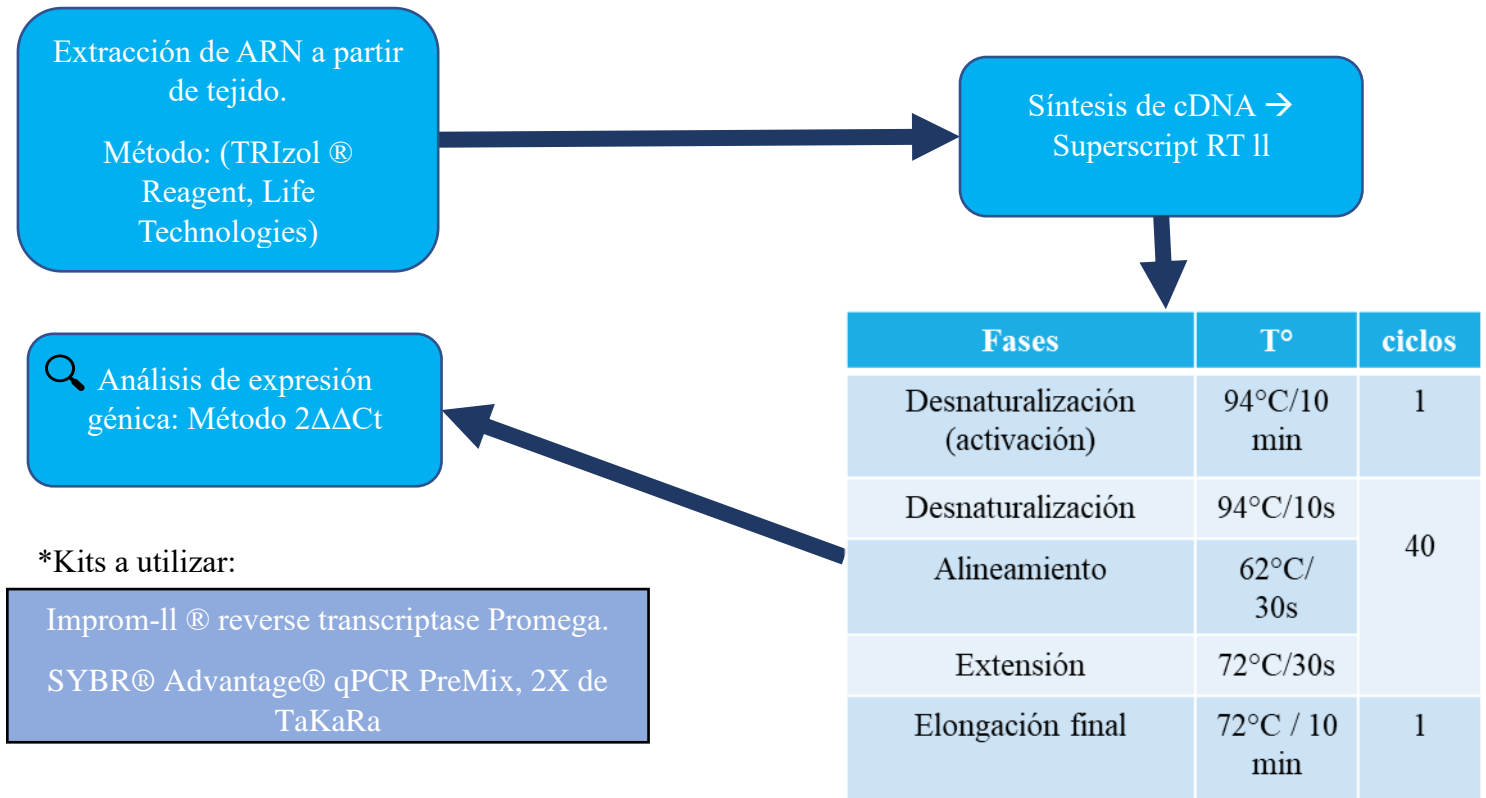
Una vez realizado el montaje se dejaron secar por un día, posteriormente se procedió con su análisis.

6.4.3. 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.

6.5. PCR en tiempo real

6.5.1 Flujograma del experimento



Para la realización de la técnica de PCR en tiempo real se llevaron a cabo las siguientes etapas basados en la bibliografía consultada y bajo la supervisión del técnico a cargo del laboratorio de genética de la FMVZ de la UANL.

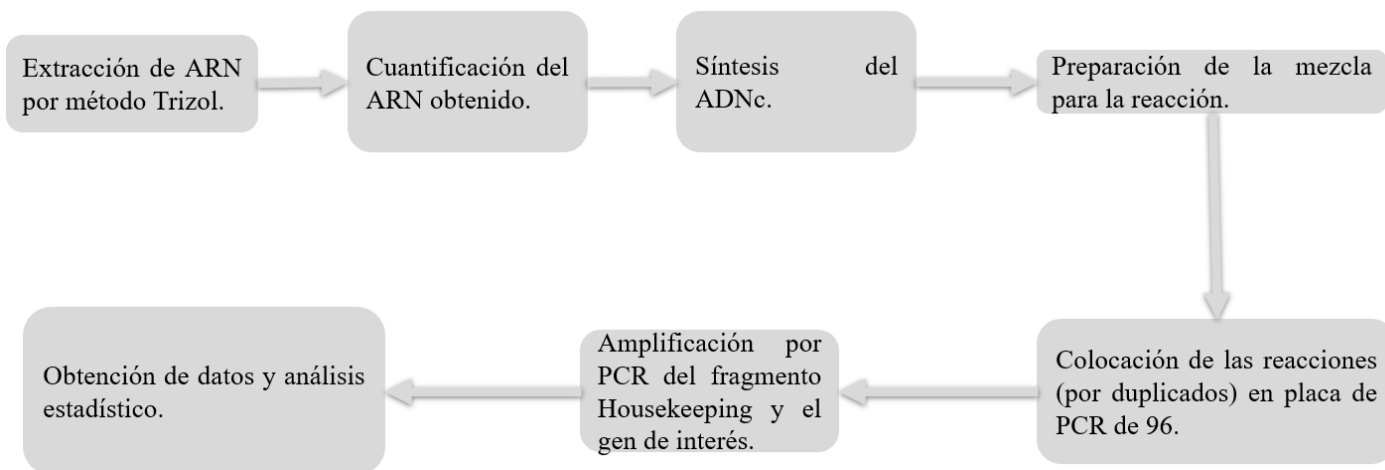


Figura 13. Etapas de la técnica de qPCR. Adaptado de: (Aguilera et al., 2012).

6.5.2. Técnica de extracción de ARN por el método Trizol

Se pesaron 100mg de tejido, el cual se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido (Figura 14), se agregó 1ml de Trizol (TRIZol® Reagent, Life Technologies) hasta que se generó la uniformidad de la mezcla y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la adición del Trizol, se efectuó nuevamente el proceso de maceración para favorecer más óptimamente la separación de los componentes celulares.

Después se pasó a un tubo eppendorf de 2ml y posteriormente se adicionaron 200µl de cloroformo y se les dió vortex (agitación vigorosa) por 15 segundos, se incubó la muestra por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 5 minutos a 4°C. Después de centrifugar la muestra, ésta se separa en 3 fases: una acuosa o superior la cual contiene el ARN, una interfase o fase media que contiene las proteínas y una fase inferior roja que corresponde a la fase orgánica que contiene el ADN. La fase acuosa o superior se colocó en un tubo nuevo y se adicionaron 500µl de Isopropanol, posteriormente se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó por 10 minutos a 4°C a 12000g, se decantó el Isopropanol y se le agregó 1ml de etanol al 80%, se le dió vortex por 3 segundos y se centrifugó a 12000g por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente se decantó el etanol y se

dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el ARN con 20 μ l de H₂O DEPC y se incubó a 55°C por 10 minutos para posteriormente leer su concentración a 260nm. El ARN se almacenó a -70°C.



Figura 14. Proceso de extracción del ARN por el método Trizol. Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.5.3. Cuantificación del ARN extraído:

Para el análisis de purificación del material extraído, se utilizó el método de espectrofotometría, utilizando el EPOCHTM del laboratorio de Reproducción, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UANL. Con la pipeta de 2 μ l se colocó la muestra en la plataforma, y el software analizó con diferentes espectros de absorbancia, los componentes que se encuentran en la muestra. Las muestras cuyo cociente 260/280 y 260/230 fueran menor a 2, fueron sometidas a una segunda extracción para evitar presencia abundante de detritos celulares como proteínas, alcoholes o Trizol.

6.5.4. Síntesis del ADN complementario (ADNc):

Se adicionaron en un tubo Eppendorf un volumen correspondiente a 5µg de ARN, 1µl de oligo desoxitimidina (oligo dT 0.5mg/µl) y 1µl de una mezcla de dNTPs 10mM y se llevó a un volumen de 12µl con agua DEPC, se calentó a 65°C por 5 minutos, después se adicionó 4µl de Buffer First Strand 5x, 2µl de Dithiothreitol (DTT) 0.1M y 1µl de Inhibidor de ribonucleasa, se mezcló y se incubó las muestras a 42°C por 2 minutos; posteriormente se adicionó 1µl de Superscript RT (1U/µl) a cada muestra y se mezcló por pipeteo, se incubó a 42°C por 50 minutos y se inactivó la reacción calentándola a 70°C por 15 minutos.

Para la obtención del control positivo del gen constitutivo o housekeeping correspondiente, β-actina, se tomó una muestra de sangre de un caballo de propiedad del Hospital de Grandes Especies de la FMVZ, de la UANL.

6.5.5. Extracción de ADN a partir de sangre:

Con el uso del kit Wizard Genomic DNA Purification Kit se procedió a realizar la extracción en las siguientes etapas especificadas por el kit:

- En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregó 300 µl.
- Posterior a esto se agregó 900µl de la solución de lisis celular.
- Se mezcló por inversión de 5-6 veces.
- Se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente
- Se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto.
- Se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet.
- Adición de 300µl de solución Nuclear Lysis.
- Se incubó a 37°C por 1h.
- Se le adicionó 1.5 µl de RNasa y fue mezclado por inversión 10 veces.
- Incubación a 37°C por 15 minutos.
- Enfriamiento a temperatura ambiente y adición de 100 µl de solución salina.
- Se mezcló por vortex durante 25 s luego centrifugado a máxima velocidad durante 3 minutos.
- El sobrenadante fue transferido a otro tubo eppendorf de 1.5 µl.

- Adición de 300 µl de isopropanol y centrifugación a 13000 rpm durante un minuto.
- Adición de 300 µl de Etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto.
- Se decantaron los alcoholes dejando los tubos secándose a 37°C por 30 minutos.

Posterior a esto fue rehidratado con 100 µl de la solución rehidratante del kit Wizard e incubados a 65°C por una hora. Para finalizar y corroborar la integridad del producto, este fue corrido por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y por último fue almacenado a -20°C.

Nota: Para la obtención del control positivo de las isoformas PPAR β/δ y PPAR γ se utilizaron los amplicones generados de PCR realizadas previamente en tesis anteriores del grupo de trabajo del Laboratorio de Genética de la FMVZ de la UANL.

6.5.6. Análisis de la PCR en tiempo real

Para la medición de la fluorescencia en tiempo real se utilizó la química SYBR Green. Se utilizó una única muestra de ADNc para analizar la expresión de las isoformas de PPAR β/δ y PPAR γ en tubos separados y por duplicados. Se utilizó la Beta actina (β -actina) como un gen de referencia de mantenimiento endógeno o Housekeeping.

Los primers a utilizar para el gen Housekeeping están reseñados a continuación:

| Gen | Secuencia | Producto (Amplicón) |
|-----------------|--|---------------------|
| Housekeeping | | |
| β -actina | Primer Forward: TAA GGA CCT GTA CGC CAA CAC AGT Primer Reverse: ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT | 104 pb |

Nota: Los primers de β -actina fueron diseñados con el uso del programa de libre acceso PrimerQuest® Tool de Integrated DNA Technologies (IDT).

Las condiciones de amplificación para β -actina fueron: 50 °C durante 2 min (preincubación), seguidas de 40 ciclos de 95 °C durante 10 min (desnaturalización), 95 °C durante 15 s (recocido) y 62 °C durante 1 h (extensión).

Los primers utilizados para la isoforma PPAR β/δ y PPAR γ fueron los siguientes:

| Gen | Secuencia | Producto (Amplicón) |
|---|---|----------------------------|
| PPAR β/δ (Cho <i>et al.</i> 2015) | Primer Forward: AGCAACCTCTTCCTCAACGA Primer Reverse: GAG GCTGCGTAGGAACTCAC | 150 pb |
| PPAR γ | Primer Forward: TAGCTCCCATCGCTTAGGTT Primer Reverse: CCAAATGGCATCTCCGTGT | 107 pb |

Nota: Los primers de la isoforma gamma (PPAR γ) fueron diseñados con el uso del programa de libre acceso PrimerQuest® Tool de Integrated DNA Technologies (IDT).

Las condiciones de amplificación para PPAR β/δ fueron: 50 ° C durante 2 min (preincubación), seguidas de 40 ciclos de 95 ° C durante 10 min (desnaturalización), 95 ° C durante 15 s y 62 ° C durante 1 h (extensión). Las condiciones de amplificación para PPAR γ fueron: 50 ° C durante 2 min (preincubación), seguidas de 40 ciclos de 95 ° C durante 10 min (desnaturalización), 95 ° C durante 15 s y 60 ° C durante 1 h (extensión).

La composición del ensayo fue la siguiente:

Cada mezcla de PCR de 20 μ l consiste en una mezcla maestra (máster mix) disponible comercialmente (SYBR® Advantage® qPCR PReMix, 2X de TaKaRa) de la cual fueron adicionadas 10 μ l por reacción, 0.5 μ l del primer F y 0.5 μ l del primer R por reacción, 7 μ l de H₂O libre de nucleasas en cada reacción y, por último, 2 μ l del ADNc por reacción y a una concentración de 150ng/ μ l.

6.5.7. Análisis de la expresión

Los resultados de la expresión génica se analizaron de acuerdo con el método comparativo delta delta Ct ($2\Delta\Delta Ct$), obteniendo el resultado de que genes (ARNm) estaban sobreexpresados o subexpresados entre los grupos de muestreo (Figura 15).

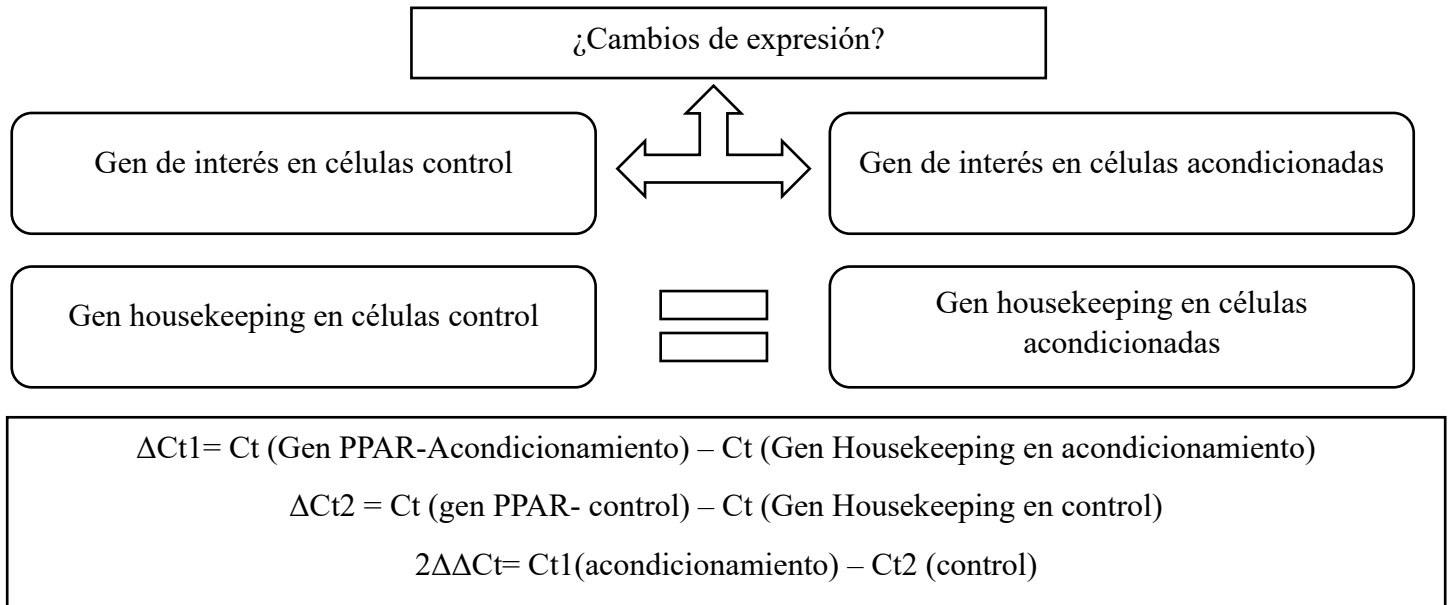


Figura 15. Modelo matemático para realizar el cálculo $2\Delta\Delta Ct$. Adaptado de (Livak & Schmittgen, 2001).

6.5.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de las PCR en tiempo real fue llevado a cabo por medio del paquete estadístico GraphPad Prism 4, basándose en los resultados arrojados por el $2\Delta\Delta Ct$. Se llevó a cabo la prueba T de Student no pareada para la comparación de los 2 grupos de piel sana (Con y sin acondicionamiento), posterior a esto se realizó una prueba F de varianzas, y una vez confirmado que las varianzas entre los grupos son distintas, se procedió a hacer una T de Student con corrección de Welch. Para comparaciones intragrupo, se llevó a cabo la prueba de Tukey.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis histológico de los tejidos de piel sana y análisis histopatológico de las muestras de melanoma por la técnica de tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E):

7.1.1 Piel sana:

Al analizar el tejido de piel sana tomado de regiones clínicamente sanas, se denotan las diferentes estructuras que la conforman y como éstas poseen la arquitectura correspondiente, se puede observar en la (Figura 16 y 17).

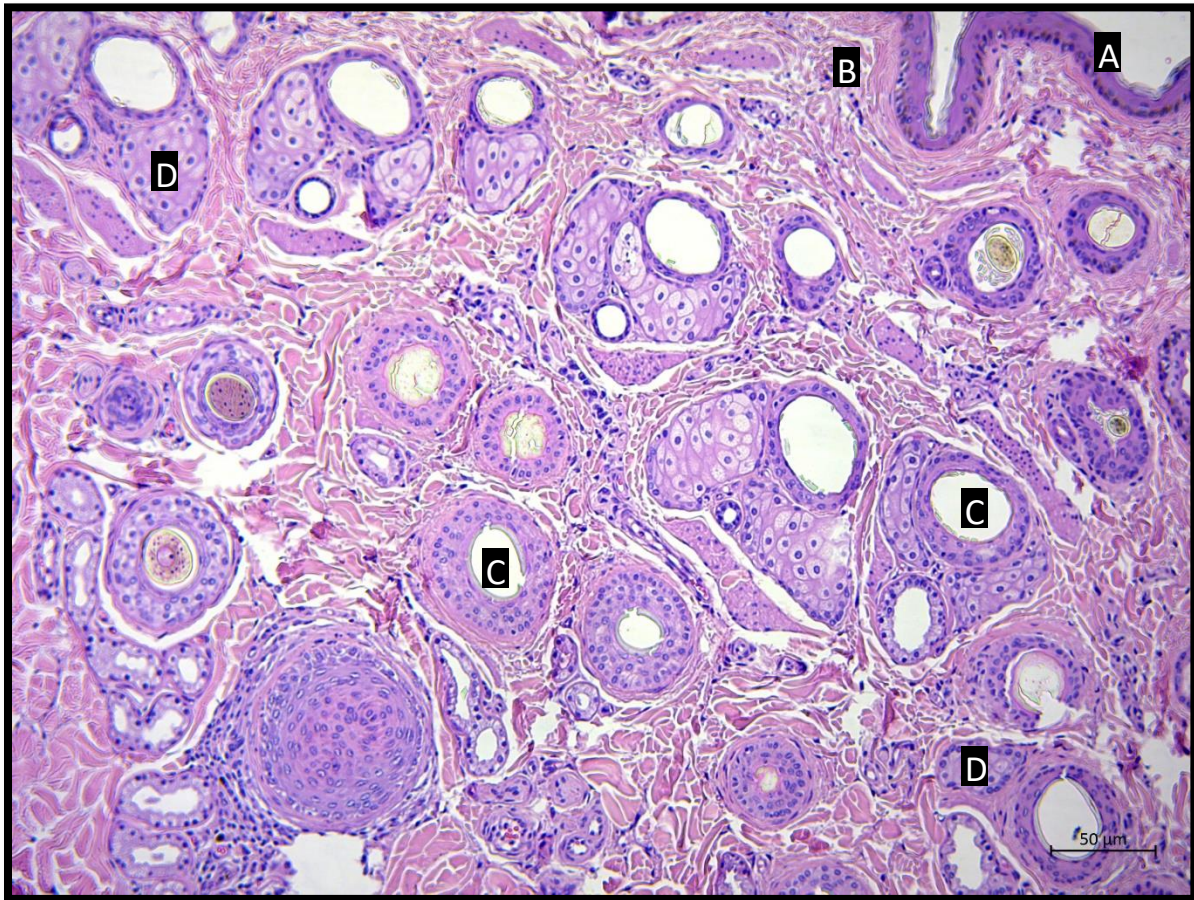


Figura 16. Fotomicrografía de la histología de piel sana de equino de 8 años, raza Frisónn, prieto, sin acondicionamiento físico. Se observa la arquitectura normal de una muestra de piel sana, pudiendo observar estructuras que la conforman. (A) epidermis (B) dermis (C) Folículo piloso (D) glándula sebácea. Microscopía de luz en aumento 10x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 50µm. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

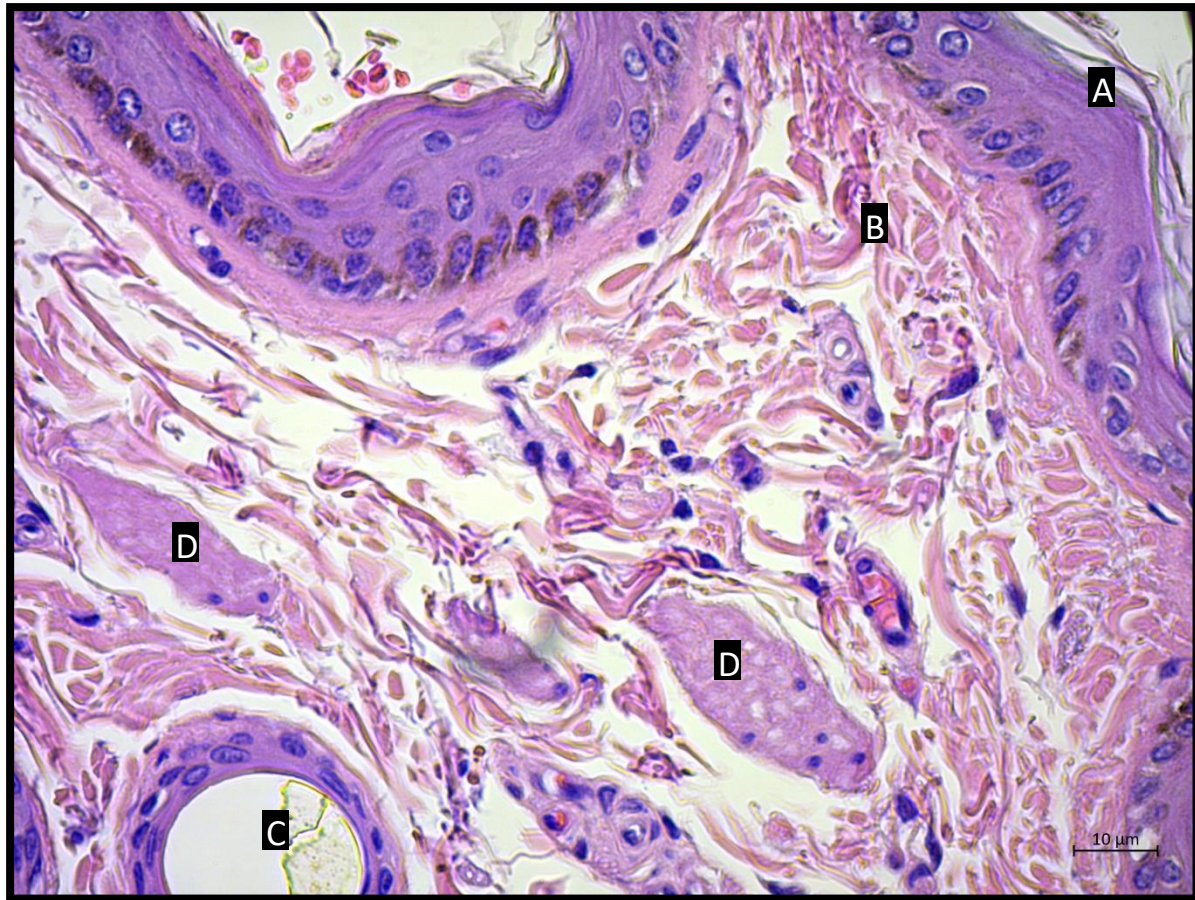


Figura 17. Fotomicrografía de la histología de piel sana de equino de 18 años, raza cuarto de milla, bayo, sin acondicionamiento físico. (A) epidermis (B) dermis (C) Folículo piloso (D) glándula sebácea. Microscopía de luz en aumento 40x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 10µm. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

7.1.2. Melanoma:

Todas las muestras presuntivas de melanoma cutáneo recolectadas fueron procesadas en bloques de parafina para su posterior corte y análisis por tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Se analizaron las secciones histológicas y su arquitectura, donde se denotaron focos de células tumorales y melanosomas de diferentes tamaños. Con las apreciaciones realizadas de estos cortes histopatológicos se confirmó el diagnóstico presuntivo de la patología de melanoma para la inclusión de estos tejidos en el estudio y análisis de expresión génica (Figura 18, 19 y 20).

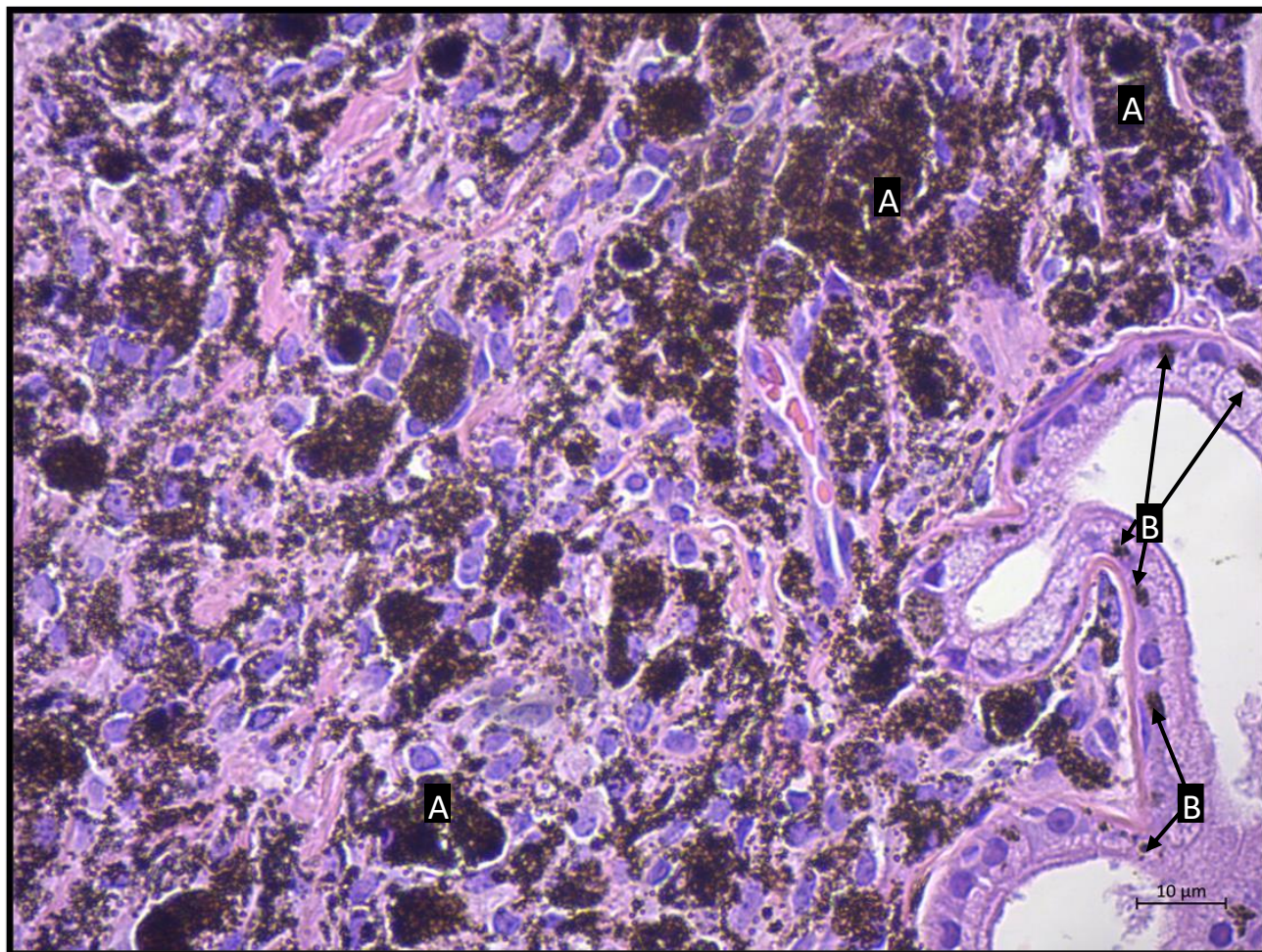


Figura 18. Fotomicrografía de la histopatología de melanoma en base de la cola de yegua de 16 años, raza cuarto de milla, color de capa tordilla, sin acondicionamiento físico. Se puede observar cómo los diversos focos de células tumorales (**A**) distorsionan la arquitectura natural del tejido, con múltiples inclusiones de melanosomas de diferentes tamaños (**B**). Microscopía de luz en aumento 10x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 50µm. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

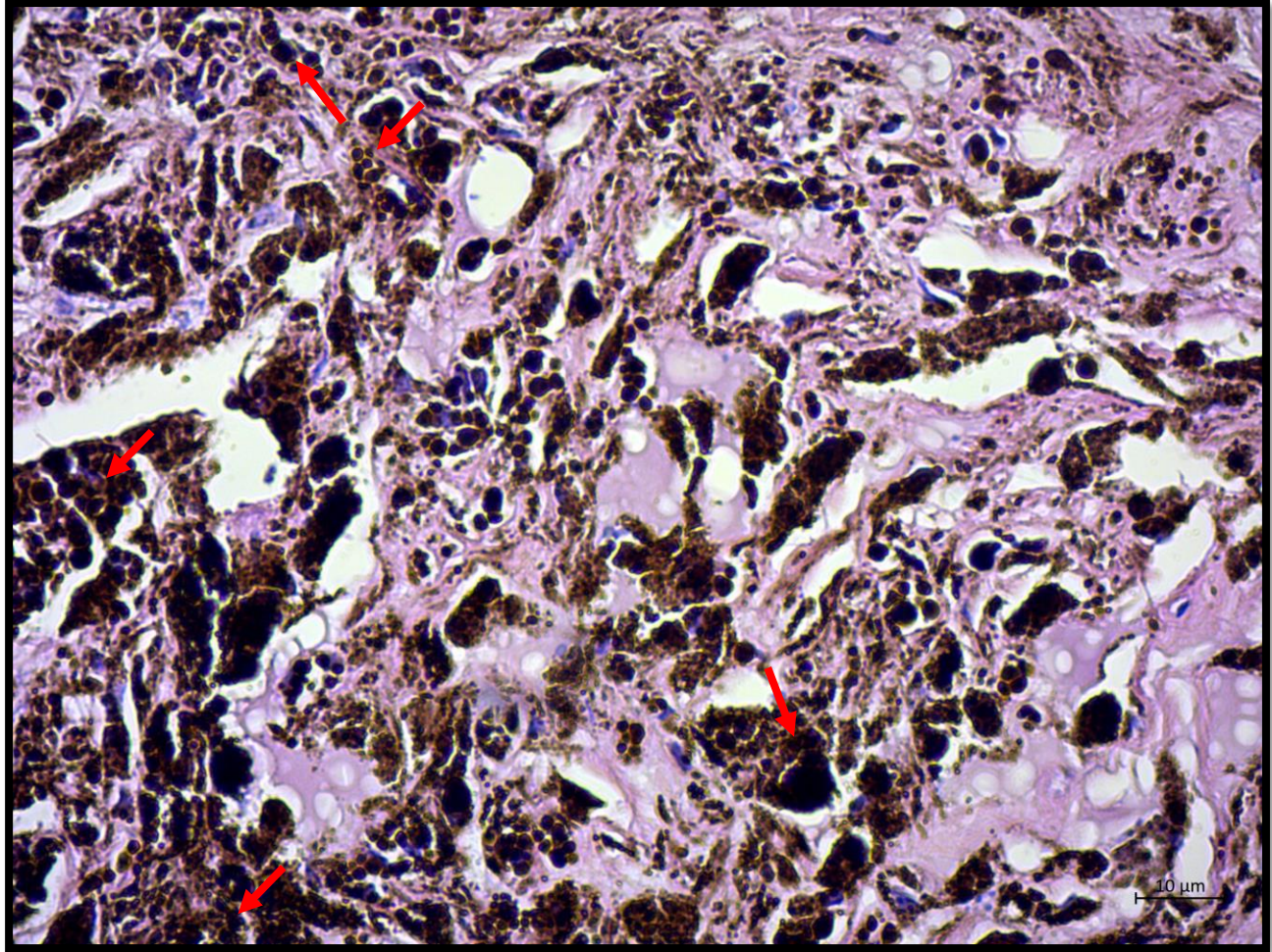


Figura 19. Fotomicrografía de la histopatología de melanoma en base de la cola de yegua de 12 años, raza cuarto de milla, color de capa tordilla, sin acondicionamiento físico. Se pueden observar diversos focos de células tumorales (flechas). Microscopía de luz en aumento 10x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 50 μ m. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

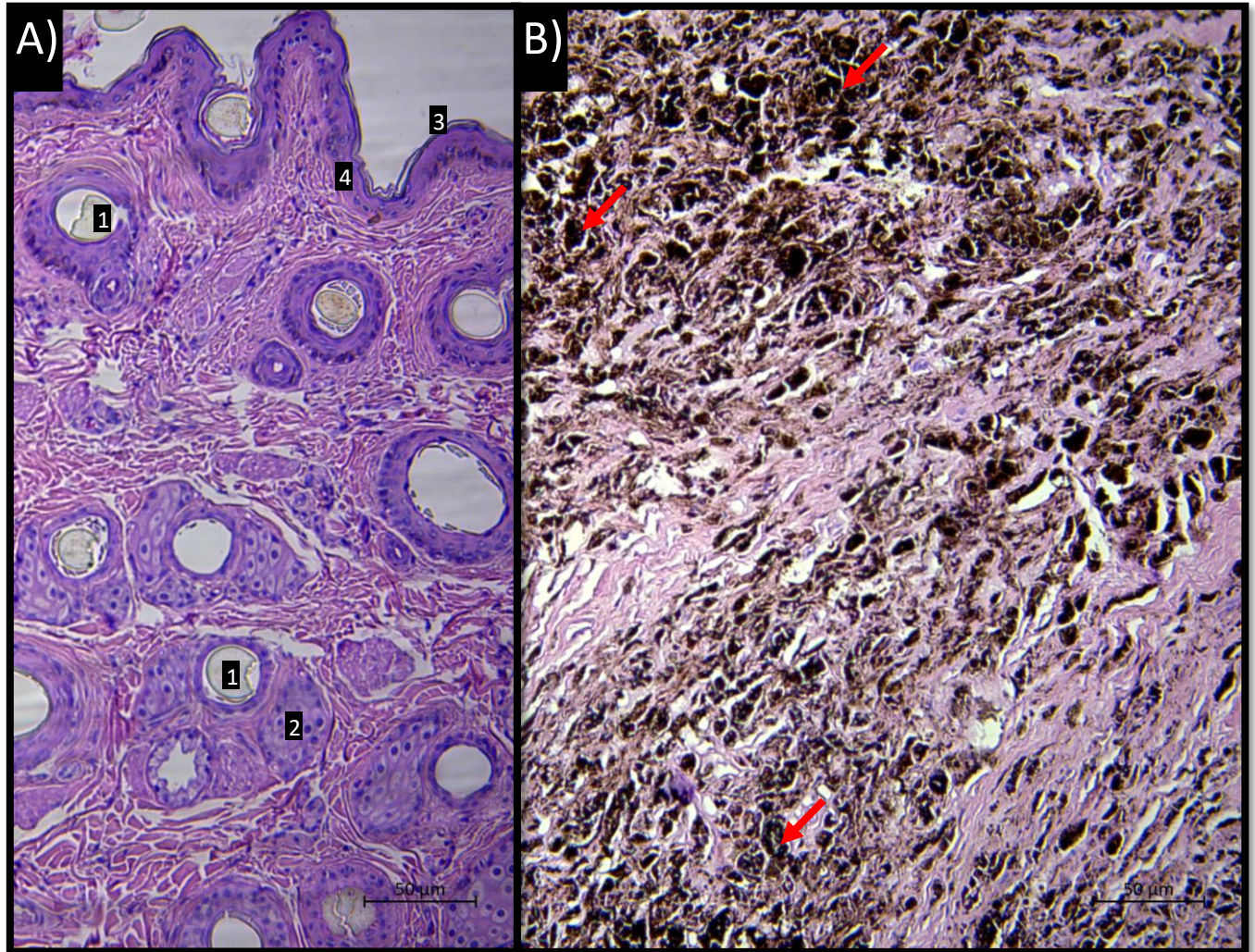
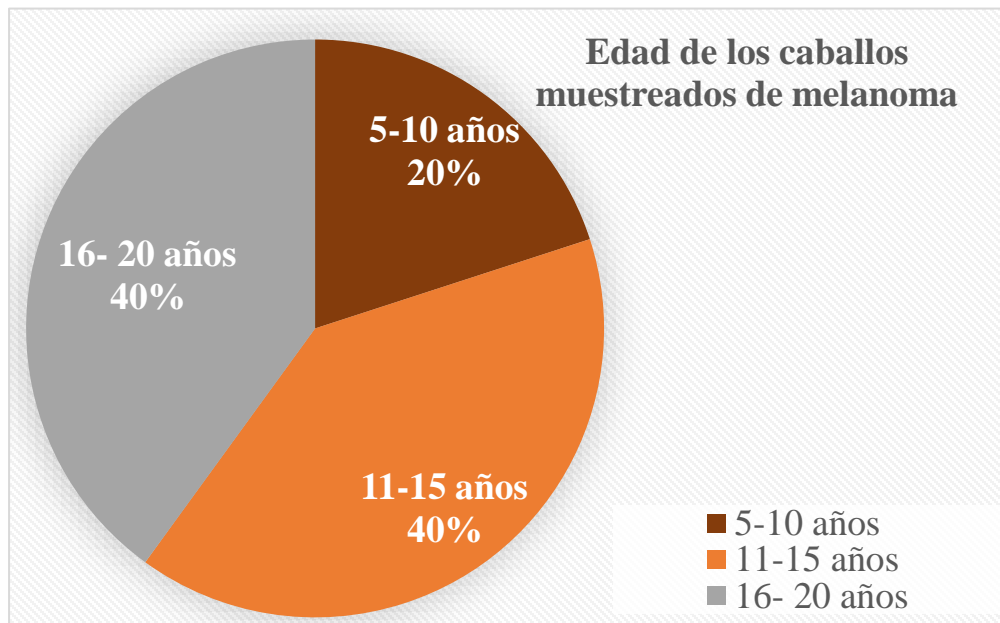


Figura 20. Fotomicrografía comparativa de una muestra de piel sana en contraste a una muestra de melanoma. Se puede apreciar cómo el infiltrado focos de células tumorales (flechas) distorsionan toda la arquitectura de la piel (B), en comparación con el corte de piel sana (A), donde fácilmente se pueden apreciar las estructuras como folículos pilosos (1), glándulas sebáceas (2), epidermis (3) y dermis (4). Microscopía de luz en aumento 40x. Inclusión en parafina. (H&E). Barra de escala: 50µm. Fotos tomadas con cámara AxioCam ERc 5s en utilización del software ZEN 3.2 Lite.

7.2. Resultados porcentuales de las muestras recolectadas

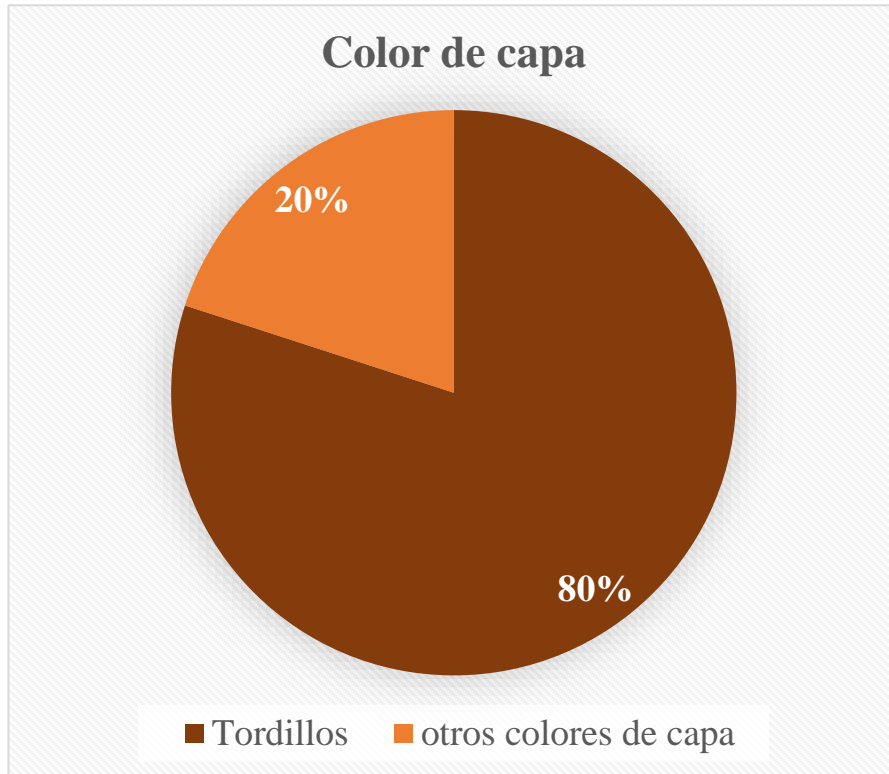
Como parte del estudio, se reportó y reseñó las características de cada muestra recolectada y de los caballos muestreados (edad, sexo, raza, ubicación del tumor, color de capa, etc.) con el fin de ser utilizado en futuros estudios meta-analíticos o de revisión.

De las muestras recolectadas de caballos con melanoma, se pudo observar que la gran mayoría (80%) pertenecían a caballos mayores a 11 años (Gráfica 1). El género de los caballos no mostró alguna tendencia relevante, pero se encuentra reportado en el (Anexo 2). La ubicación de las neoplasias fue en maslo de la cola, región perianal, escápula parte superior, cola y base de la cola, mostrado en el (Anexo 2).



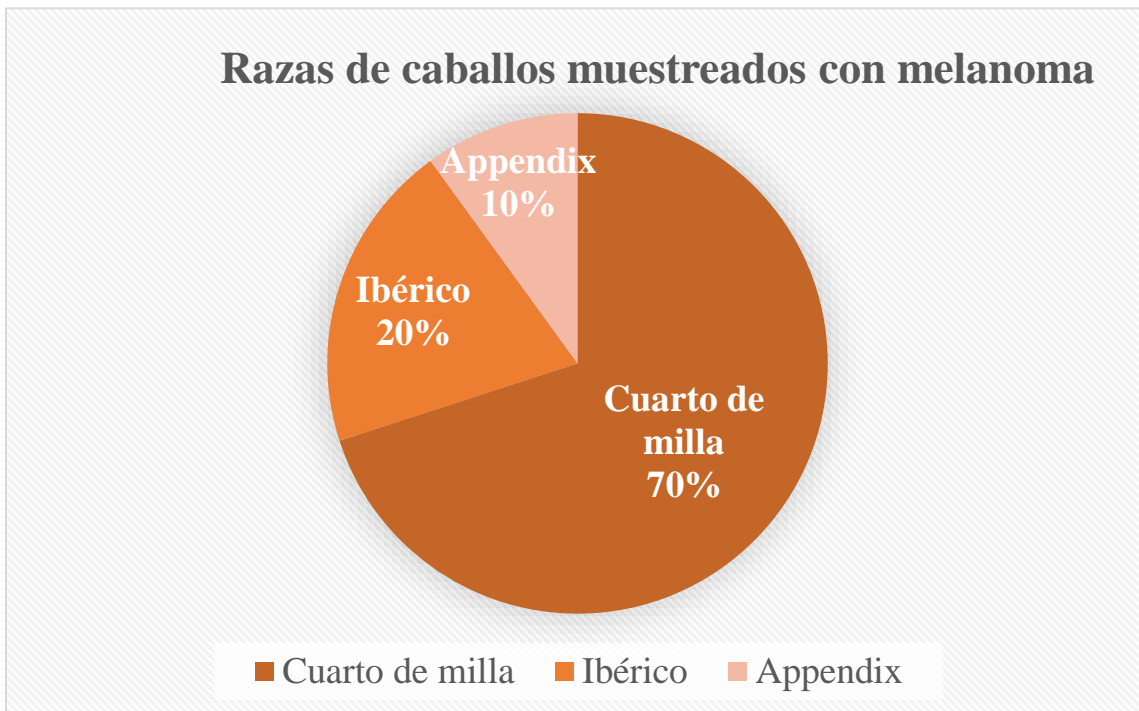
Gráfica 1. Muestras recolectadas de melanoma por rangos de edad. Rangos de edad de 5-10 años (2/10, 20%), 11-15 años (4/10, 40%) y 16-20 años (4/10, 40%).

De los caballos muestreados con melanoma se pudo observar que la mayoría (80%) de las muestras recolectadas pertenecían a caballos del color de capa tordillo (Gráfica 2). Todas las muestras recolectadas de melanoma pertenecían a caballos de bajo rendimiento físico.



Gráfica 2. Muestras recolectadas de melanoma por color de capa. Color de capa tordillo (8/10, 80%) y otros colores de capa (2/10, 20%). Los otros colores de capa presentes fueron albino y cremello, descritos en el (Anexo 2).

De los caballos muestreados con melanoma, se pudo observar que la mayoría (70%) eran de la raza cuarto de milla, aspecto reseñable para futuros estudios de prevalencia o metaanálisis, sin embargo, se asume que esta mayoría de raza cuarto de milla se debe a que es una raza bastante común en el área geográfica de muestreo, el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. (Gráfica 3).



Gráfica 3. Razas de caballos muestreados con melanoma. Cuarto de milla (70%, 7/10), Ibérico (20%, 2/10) y Appendix (10%, 1/10).

7.3. PCR punto final para β -actina y expresión génica de PPAR β/δ y PPAR γ :

Luego de realizar las correspondientes extracciones de RNA por el método Trizol y su subsecuente cuantificación por medio de espectrofotometría (Anexo x) de las muestras de piel sana y melanoma, se inició la estandarización de la técnica por medio de PCR punto final. Con utilización del Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific y añadiendo un gradiente de temperatura se determinó la temperatura de alineamiento adecuada para el experimento. Luego de correr el experimento se confirmó la adecuada amplificación de la banda esperada para la isoforma de β -actina y PPAR β/δ (Figura 21 y 22).

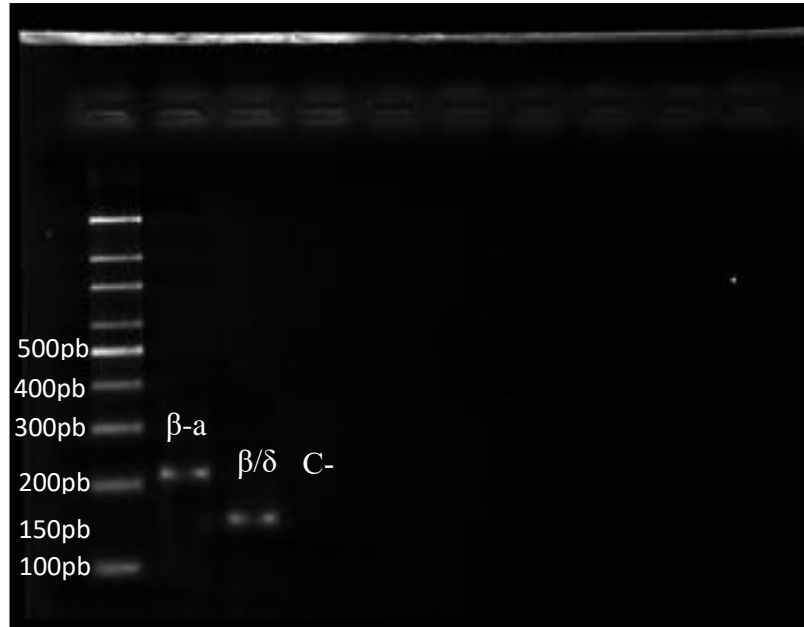


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para β -actina y PPAR β/δ . Muestras procesadas por PCR punto final de 5 muestras de melanoma equino. Se observa el producto esperado, correspondiente al fragmento de 150pb de PPAR β/δ .

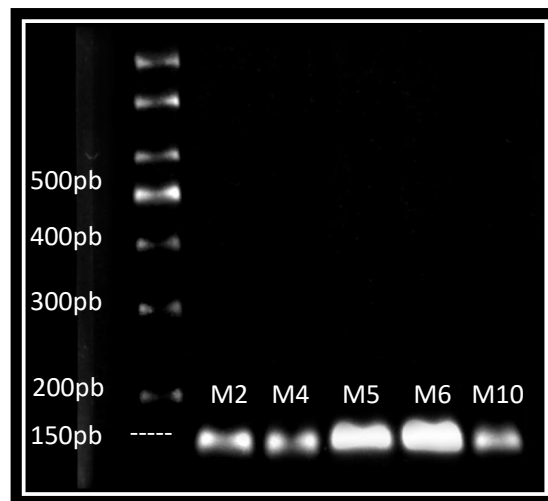


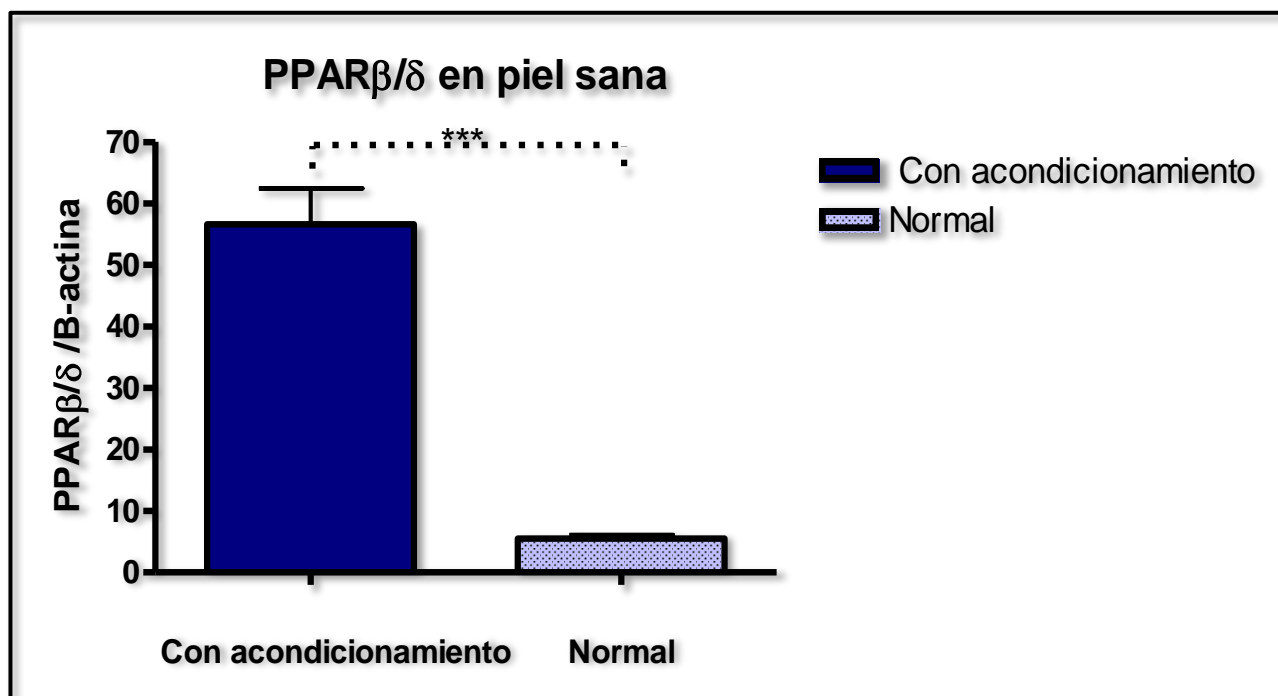
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, muestras procesadas por PCR punto final de 5 muestras de melanoma equino. Se observa el producto esperado, correspondiente al fragmento de 150pb de PPAR β/δ (M2, M4, M5, M6, M10).

7.3.1. RT-qPCR para β -actina y expresión génica de PPAR β/δ y PPAR γ :

Para el experimento de PCR en tiempo real se realizó la corrida de todas las muestras de B-actina, PPAR β/δ y PPAR γ individualmente debido a su diferente temperatura de alineamiento, para posteriormente realizar el análisis $2\Delta\Delta C_t$.

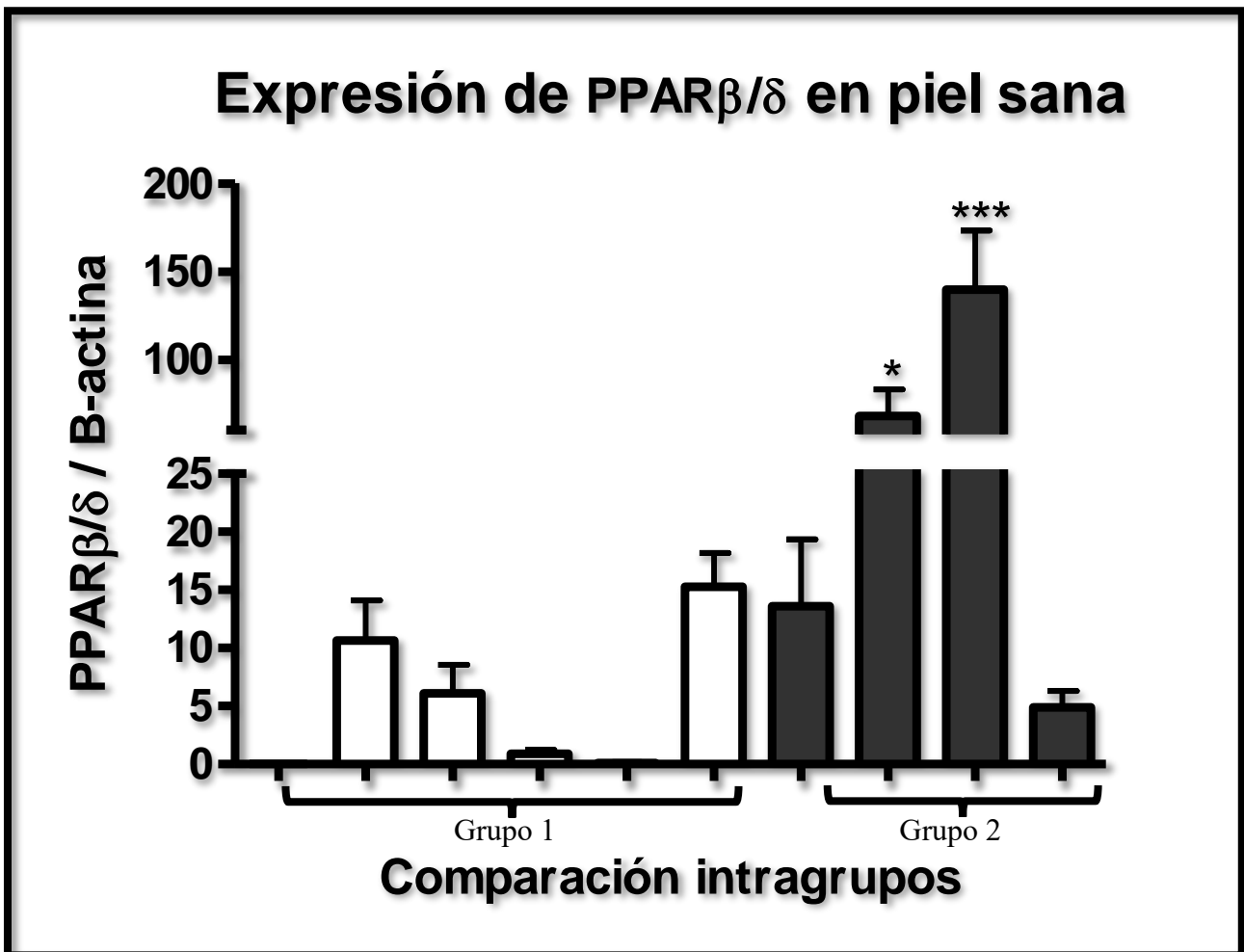
7.3.1.1. PPAR β/δ en piel sana.

Se pudo observar una diferencia de expresión estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$) entre los caballos con acondicionamiento físico, en comparación con los caballos sin acondicionamiento físico, presentando una diferencia de 50 unidades relativas de expresión (Gráfica 4).



Gráfica 4. Análisis de PPAR β/δ en tejidos de piel sana de caballos con y sin acondicionamiento físico. β -actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. Diferencia de expresión de PPAR β/δ en piel sana de los grupos con y sin acondicionamiento físico por el método $2\Delta\Delta C_t$. *** \rightarrow prueba T de Student no pareada con corrección de Welch ($p \leq 0.001$). Prueba F de varianza \rightarrow *** ($p \leq 0.001$). Medidas de desviación estándar presentadas en la figura.

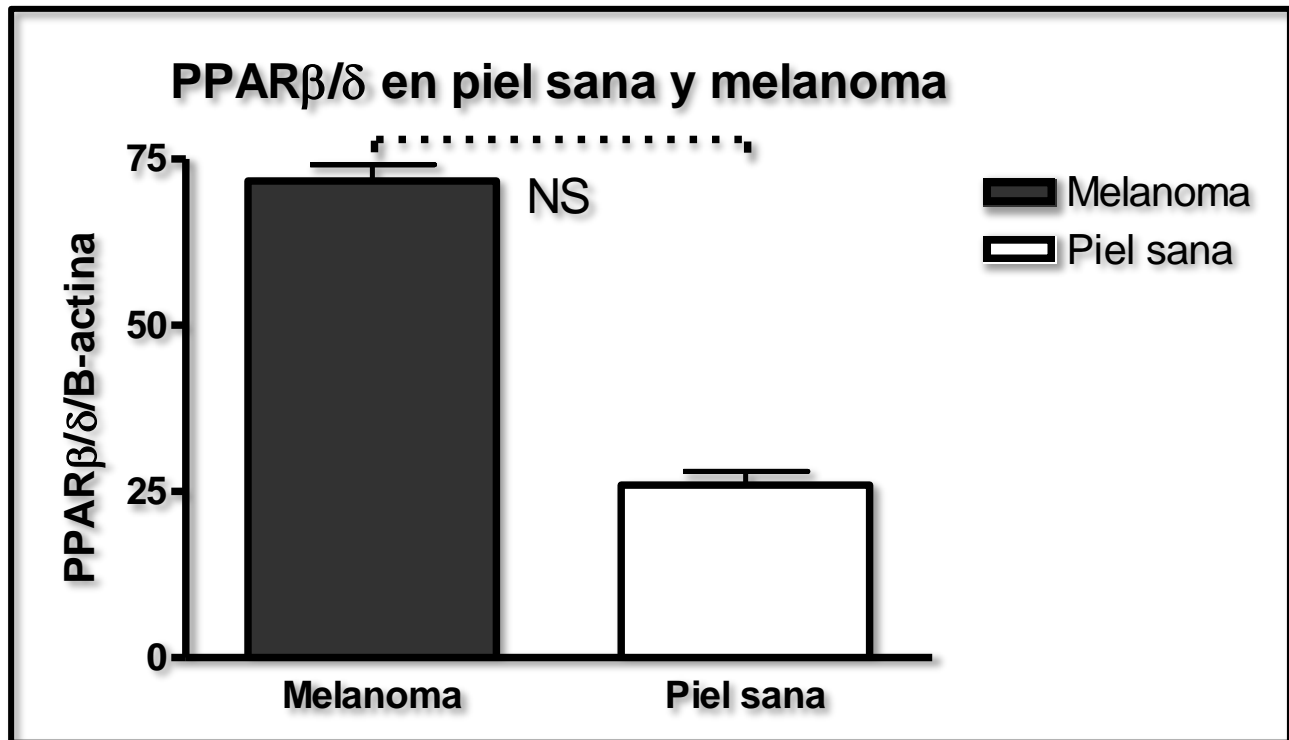
Adicionalmente se realizó la comparación intragrupo, determinando las diferencias de expresión entre los individuos de cada grupo, tomando las réplicas (duplicados) realizadas de cada una de las muestras (Gráfica 5). Se pudo observar que no todos los individuos con acondicionamiento físico presentaban una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo 1 (sin acondicionamiento). Sin embargo, la mayoría presentaban una diferencia numérica y dos caballos presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.05$)



Gráfica 5. Análisis de PPARβ/δ en tejidos de piel sana de caballos con y sin acondicionamiento físico. β-actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. Diferencia de expresión intragrupo de PPARβ/δ en piel sana de los grupos con y sin acondicionamiento físico por el método $2\Delta\Delta Ct$. *** → prueba Test de Tukey. Prueba F de varianza → *** ($p \leq 0.001$). medidas de desviación estándar presentadas en la figura.

7.3.1.2. PPAR β/δ en piel sana y melanoma.

Inicialmente se compararon todas las muestras de piel sana contra todas las muestras de melanoma, donde no se denotó una diferencia significativa entre los grupos (Gráfica 6).

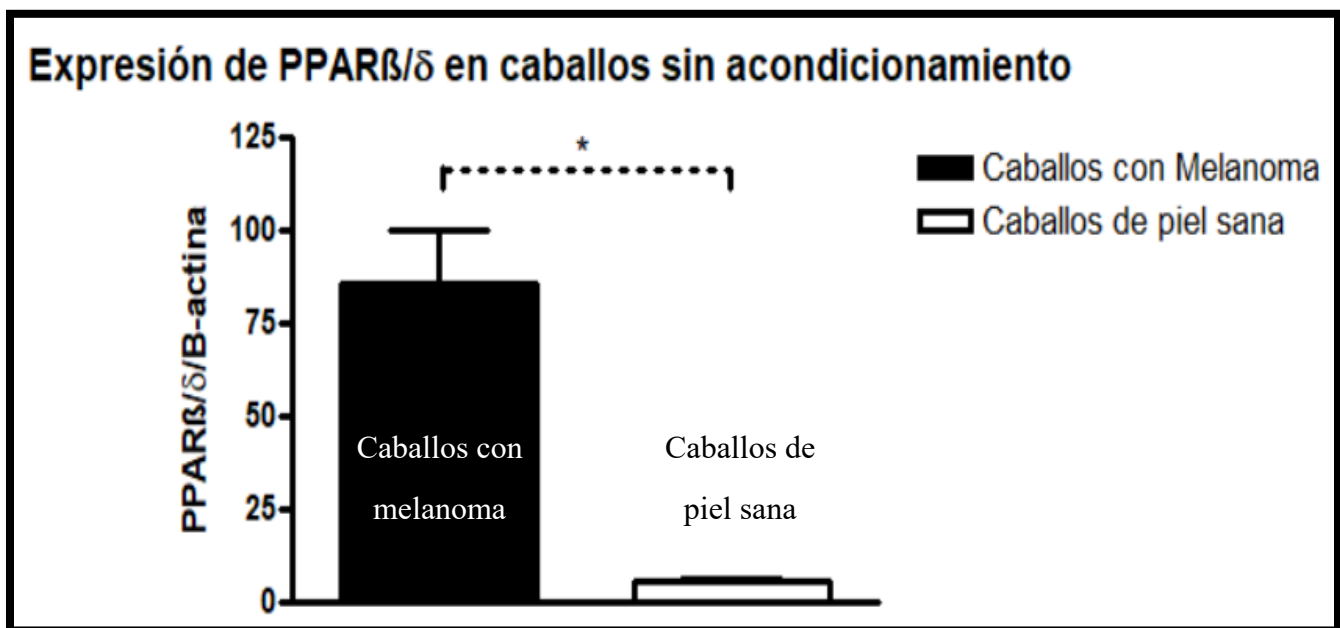


Gráfica 6. Análisis de PPAR β/δ en tejidos de piel y melanomas. β -actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. Diferencia de expresión intragrupo de PPAR β/δ en piel sana de los grupos con y sin acondicionamiento físico por el método $2\Delta\Delta Ct$. NS \rightarrow prueba T de Student no pareada con corrección de Welch. medidas de desviación estándar presentadas en la figura.

Nota: En esta figura se comparó las muestras de piel sana (con y sin acondicionamiento deportivo) contra las muestras de melanoma (de caballos con acondicionamiento físico), para denotar si se observase alguna diferencia estadísticamente significativa.

7.3.1.3. PPAR β/δ en piel sana y melanoma en caballos sin acondicionamiento físico.

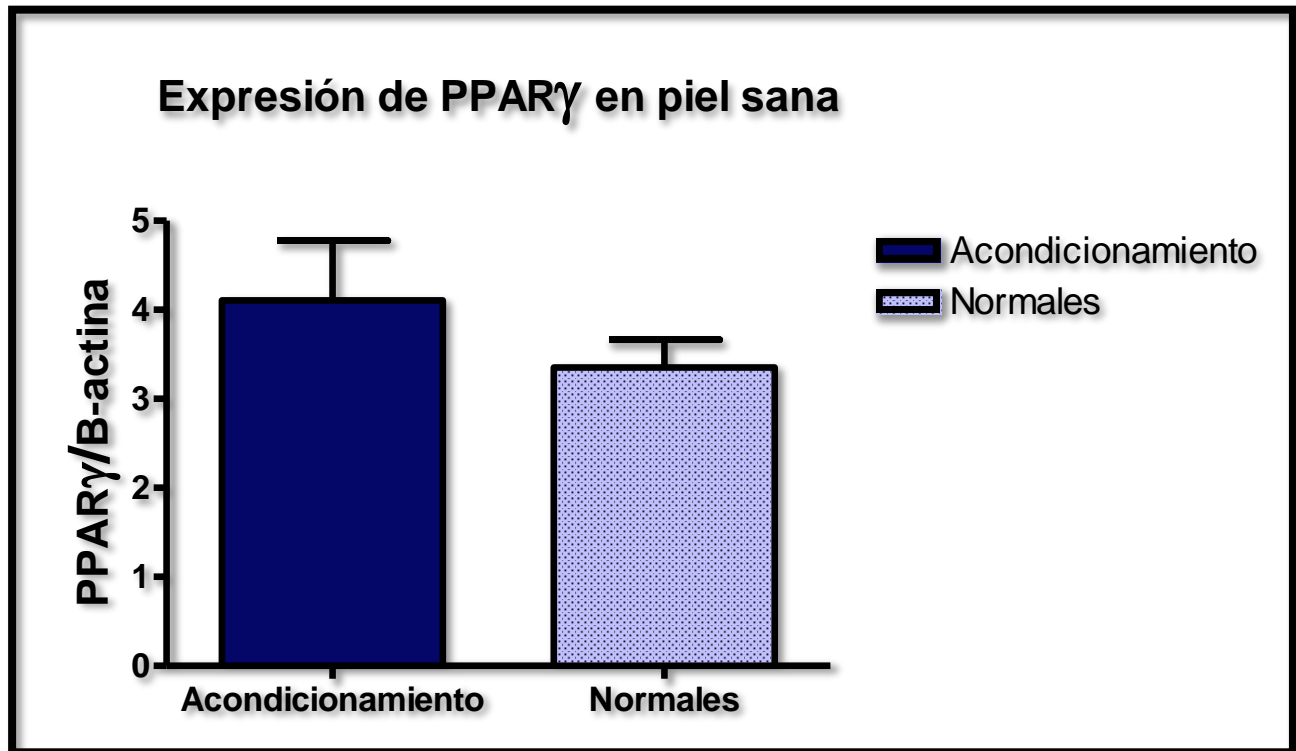
Luego de analizar los grupos sumados de piel sana con y sin acondicionamiento, sin denotar ninguna diferencia estadística, esto debido a que no se encontró ningún caballo de alto rendimiento físico durante el periodo de muestro, se prosiguió a evaluar la expresión génica de la isoforma PPAR β/δ en los grupos sin acondicionamiento físico, encontrando un aumento significativo ($p \leq 0.05$) de expresión génica en los caballos con melanoma (Gráfica 7).



Gráfica 7. Diferencia de expresión de PPAR β/δ en piel sana y melanoma de caballos sin acondicionamiento físico. β -actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. por el método $2\Delta\Delta Ct$. * \rightarrow T de Student no apareada con corrección de Welch ($p \leq 0.05$). Prueba F de varianza \rightarrow *** ($p \leq 0.001$). Medidas de desviación estándar presentadas en la figura.

7.3.1.4. PPAR γ en piel sana en caballos con y sin acondicionamiento físico.

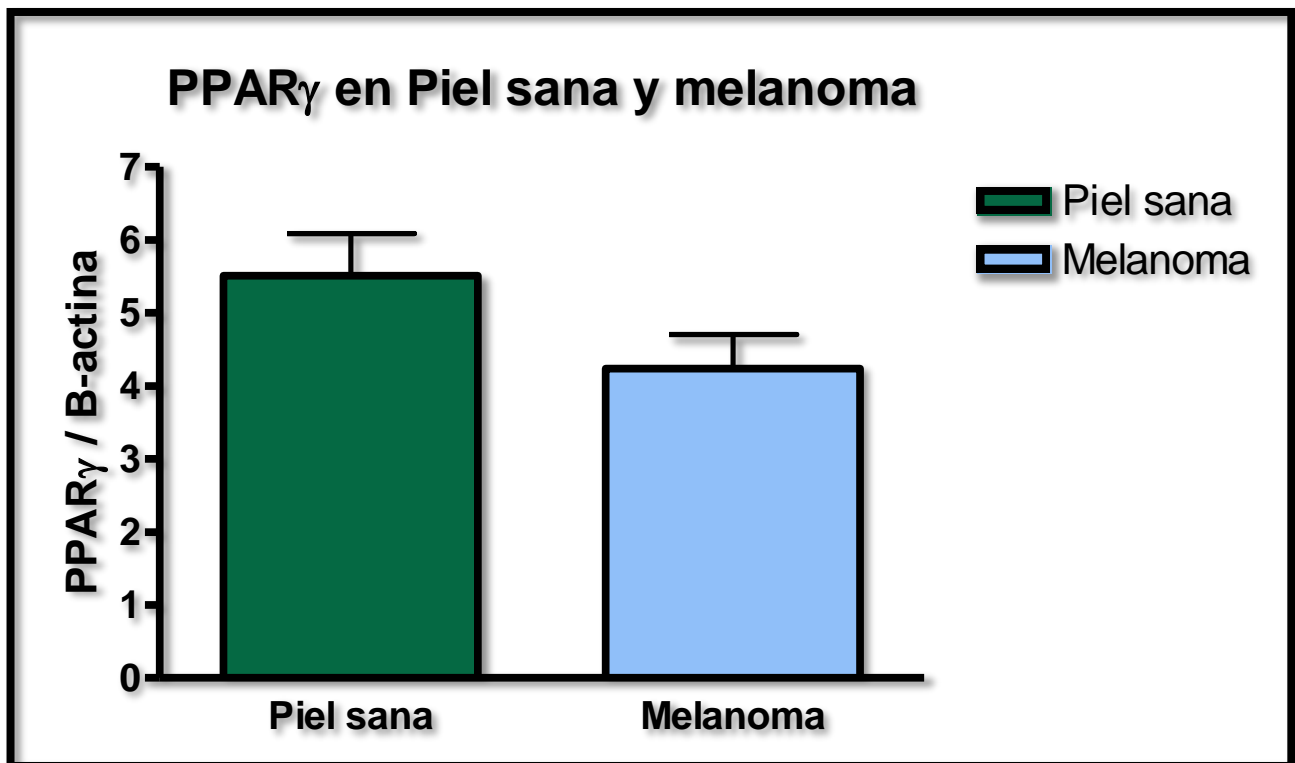
Al analizar la expresión génica de PPAR γ en piel sana, se obtuvo un aumento numérico (0.749 U.R.) pero no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 8).



Gráfica 8. Diferencia de expresión de PPAR γ en piel sana de los grupos con y sin acondicionamiento físico por el método $2\Delta\Delta Ct$. β -actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. NS \rightarrow T de Student no apareada con corrección de Welch ($p \leq 0.05$). Medidas de desviación estándar presentadas en la gráfica.

7.3.1.5. PPAR γ en piel sana y melanoma de caballos sin acondicionamiento físico.

Al analizar la expresión génica de PPAR γ en piel sana y melanoma de caballos sin acondicionamiento físico, se obtuvo un aumento numérico (1.265 U.R.) pero no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de ambos grupos (Gráfica 9).



Gráfica 9. Diferencia de expresión de PPAR γ en piel sana y melanoma de los grupos sin acondicionamiento físico por el método $2\Delta\Delta Ct$. β -actina fue utilizado como gen normalizador o Housekeeping. NS \rightarrow T de Student no apareada con corrección de Welch ($p \leq 0.05$). Medidas de desviación estándar presentadas en la gráfica.

8. DISCUSIÓN

Los datos porcentuales de las muestras recolectadas señalan concordancia con la literatura previamente reseñada de Moore y colaboradores y Phillips y Lembcke, resaltando al caballo con un rango de edad avanzada (>11 años) como el más propenso para el desarrollo de masas tumorales de melanoma; Fleury y colaboradores en el 2000, donde reportaron que el 75% de una población muestreada de 264 caballos tordillos era portadores de melanoma (Fleury et al., 2000a; Moore et al., 2013; Phillips & Lembcke, 2013).

En los estudios realizados de melanomas en equinos por Fleury y colaboradores en el año 2000 y Moore y colaboradores en el 2013 exponen que no hay alguna diferencia estadísticamente significativa en el género del animal, dato que concuerda con lo encontrado en este estudio donde no se observó una tendencia en el sexo de los caballos muestreados (Fleury et al., 2000a; Moore et al., 2013).

En un estudio realizado por Fleury y colaboradores en el año 2000, se consideró la capa gris o tordilla, como un factor de riesgo (Fleury et al., 2000b). Dato que Seltenhammer y colaboradores en el año 2003 seguirían señalando al reportar que, de una población de 296 caballos de color de capa gris mayores a 4 años, el 50% ya presentaban neoplasias melanocíticas. El estudio actualmente realizado continúa mostrando como tendencia, al caballo de capa gris o torda, como el más propenso al desarrollo de esta patología, al haber sido un 80% de muestras pertenecientes a caballos de esta característica (Fleury et al., 2000a; Seltenhammer et al., 2003).

Seltenhammer y colaboradores en el año 2003 reportaron en un estudio de 296 caballos tordillos, que un 75.6% de los animales diagnosticados con melanoma presentaron la tumoración en la base de la cola, dato que concuerda con nuestros animales muestreados, donde el 80% de las muestras fueron procedentes de la base de la cola y próximas a la región perianal (Seltenhammer et al., 2003).

El comportamiento agresivo (maligno) o pasivo (benigno) de los tumores melanocíticos aún permanece incierto debido a todos los componentes que entran en juego en la carcinogénesis de estas células, en el estudio retrospectivo de Beth A. Valentine en 1995 se señalan aspectos de tamaño, edad de presentación, ubicación anatómica, pueden ser de utilidad para la identificación de posibles

comportamientos en la neoplasia melanocítica, sin embargo, el criterio de los patólogos suele ser reservado para evitar errores en el pronóstico y el comportamiento de la patología, situación ocurrida con las muestras caracterizadas en este estudio (Valentine, 1995).

La amplia presentación clínica y macroscópica que se pudo observar en los diferentes melanomas recolectados supone una amplia amalgama de componentes moleculares que pueden estar desempeñando un rol específico en cada ambiente tumoral y debido a esto, se dificulta establecer una actividad puntual y definitiva de los PPARs en el rol de carcinogénesis (Van der Weyden et al., 2020).

En el trabajo realizado previamente por Itzel y colaboradores en el 2021, reportaron una sobreexpresión de PPAR β/δ en las muestras de melanoma en comparación a las muestras de piel sana de caballos por la técnica de inmunohistoquímica indirecta (IHQ). Estos datos reportados sugieren un aumento de expresión de la proteína PPAR β/δ en el melanoma, concordante con los resultados del presente estudio donde se observó un aumento de expresión génica por parte de PPAR β/δ . Sin embargo, se debe tener presente que un aumento de expresión génica no necesariamente indica un aumento de expresión proteica, por lo que se requiere realizar esta técnica con las muestras actuales para obtener más información (Rangel-Sánchez et al., 2021).

El estudio realizado por Cho y colaboradores en el 2015 señaló la relación que había entre la expresión de PPAR β/δ y el ejercicio, al realizar una toma de muestra antes y después de que los caballos hayan realizado ejercicio bajo condiciones controladas. Los resultados del presente estudio arrojados por el análisis de PCR en tiempo real señalaron una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión del ARNm PPAR β/δ en piel sana de caballos con acondicionamiento físico, dato que vendría siendo concordante con los resultados obtenidos por Cho, que indican que, a mayor ejercicio y acondicionamiento físico, mayor expresión génica de PPAR β/δ (Cho et al., 2015).

Los resultados del análisis de expresión génica del ARNm PPAR γ no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión en piel sana de caballos con y sin acondicionamiento físico ni tampoco mostraron diferencias de expresión entre las muestras de melanoma y piel sana, contrario a lo que se esperaba de esta isoforma, que ha sido reportada por Núñez y colaboradores en el 2006 y Paulitschke en el 2012 donde reportan que esta isoforma presenta un aumento de actividad

en las neoplasias debido a que ligandos específicos de estos pueden encadenar mecanismos de acción o de transcripción anticancerígenos (Núñez et al., 2006; Paulitschke et al., 2012).

Durante el presente estudio no se encontró caballos con acondicionamiento físico que presentaran melanomas o neoplasias melanocíticas, debido a esto, los análisis de los grupos debieron realizarse sin esta variable (comparación de los grupos de melanoma con y sin acondicionamiento), analizando los diferentes niveles de expresión génica entre las muestras de piel sana con y sin acondicionamiento físico, y la comparación de las muestras de melanoma se realizó únicamente en caballos sin acondicionamiento físico. Este dato no afirma que no haya caballos con acondicionamiento físico y presencia de melanoma, pero sugiere que su presencia es mucho menor debido a la selectividad genética que conlleva la selección de los caballos deportivos, y esta selección previene la inclusión de genética inestable o con alta posibilidad de mutación, en adición a esto, como lo describe Cho y colaboradores en su estudio realizado en Corea del sur, en el 2015, donde señalan que el ejercicio está relacionado con niveles elevados de PPAR β/δ , factor de transcripción que Michiels y colaboradores en el 2010 reportaron que desempeña un rol anticancerígeno en el melanoma, inhibiendo el promotor del gen del tumor de Wilms (WT1) (Cho et al., 2015; Michiels et al., 2010).

Los resultados de presente estudio muestran una posible interacción biológica entre las neoplasias melanocíticas y la expresión de PPAR β/δ , como ya se había sugerido por Itzel y colaboradores en el 2021 y por Michiels y colaboradores en el 2010, no obstante, se requiere extender el número de muestras de piel sana y melanoma, el período de tiempo de recolección o quizá utilizar cultivos celulares equinos para poder esclarecer con mayor precisión el rol patobiológico que cumple PPAR β/δ y PPAR γ en el desarrollo del melanoma en equinos (Michiels et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el trabajo de investigación previamente realizado, podemos concluir:

- Comparando la expresión del ARNm de PPAR β/δ en las muestras de piel sana, los caballos con acondicionamiento físico mostraron mayores niveles de expresión génica en relación con los caballos sin acondicionamiento físico.

- Comparando los grupos sin acondicionamiento físico, se mostró un aumento de expresión de ARNm PPAR β/δ en melanoma en comparación a las muestras de piel sana.

- El acondicionamiento físico no mostró diferencia estadística en la expresión del ARNm PPAR γ en las muestras de piel sana.

- La presencia de melanoma tampoco mostró diferencias estadísticas en la expresión del ARNm PPAR γ en comparación con las muestras de piel sana.

Los resultados obtenidos indican una fuerte relación entre los PPARs y el desarrollo del melanoma, incluyendo una posible modulación y aumento de expresión en los caballos que tienen acondicionamiento físico o están expuestos a rutinas de esfuerzo físico constantes, presentándose como una interesante observación y recomendación para un caballo predispuesto a la presentación de melanoma u otras neoplasias. Dilucidar adecuadamente la relación de los PPARs con el melanoma u otras neoplasias en equinos, puede ser el inicio de alternativas terapéuticas o adyuvantes para la especie.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este estudio son sugestivos de posibles mecanismos de función o de estimulación de los PPARs, sin embargo, se deben seguir realizando análisis bajo variables más controladas, como la edad de los grupos, cantidad específica de ejercicio, razas, e incluso dietas, aspectos que debido a la brevedad del tiempo de recolección no pudieron ser óptimamente controlados. Una manera más acertada de controlar la estimulación que reciben los PPARs sería mediante la utilización de cultivos celulares de melanoma equino, ya que sería ideal para reducir ampliamente muchos de los factores previamente mencionados.

Otro aspecto para valorar sería su posible relación con la tercera isoforma, PPAR α ; que, si bien no está conceptualizada o relacionada en tantos roles de carcinogénesis como la isoforma PPAR β/δ o PPAR γ y en adición a ello, estudios recientes reportan actividades en la sanación de heridas y lesiones crónicas; su expresión génica podría arrojar alguna tendencia que revele alguna información relevante para el entendimiento de estos receptores nucleares.

Estudios futuros con ARN de interferencia como bloqueadores de rutas metabólicas, podrían ayudar a vislumbrar de una manera más específica el rol biológico anticancerígeno que juegan los PPARs en el desarrollo del melanoma equino.

El estudio de los PPARs es demorado, debido a que, siendo factores de transcripción y receptores nucleares, juegan un rol en múltiples actividades del organismo, por lo tanto, es requerido seguir realizando estudios en esta línea de investigación, de mayor duración y especificidad, que permitan el continuo aprendizaje y entendimiento del funcionamiento particular de los PPARs en la carcinogénesis equina.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, Penélope et al. 2012. “PCR En Tiempo Real.” : 175–202.
- Alberts, Bruce et al. 2010. 5ta edición Ediciones OMEGA *Biología Molecular de La Célula*.
- Alonso, Juliana de Moura et al. 2019. “Recurrent Laryngeal Nerve Pathology Secondary to Nerve Compression by Melanomas - Case Report.” *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 71(5): 1477–82.
- Anaïs Prouteau, Catherine André. 2019. “Canine Melanomas as Models for Human Melanomas :” *Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison* (Lmm).
- Balignasay, Rey. 2016. *PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)*.
- Berger, Joel P., Taro E. Akiyama, and Peter T. Meinke. 2005. “PPARs: Therapeutic Targets for Metabolic Disease.” *Trends in Pharmacological Sciences* 26(5): 244–51.
- Bernal, Aurora, and Lorena Arranz. 2018. “Nestin - Expressing Progenitor Cells : Function , Identity and Therapeutic Implications.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(12): 2177–95.
- Burden, Katherine. 2011. “Melanomas and Their Effect on the Grey Horse.” *Young Scientists Journal* 4(10): 75.
- Busato, E. M. et al. 2017. “Compressão de Medula Espinhal Ocasionalada Por Melanoma Em Cavalo de Pelagem Castanha.” *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 69(5): 1346–50.
- Carneiro, Benedito A., and Wafik S. El-Deiry. 2020. “Targeting Apoptosis in Cancer Therapy.” *Nature Reviews Clinical Oncology* 17(7): 395–417. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- Cheng, Hong Sheng et al. 2019. 20 International Journal of Molecular Sciences *Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence*.

- Cho, Hyun-woo et al. 2015. "Molecular Characterization and Expression Analysis of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPAR δ) Gene before and after Exercise in Horse." 28(5): 697–702.
- Davis, E. G., and B. R. Rush. 2013. "Diagnostic Challenges: Equine Thoracic Neoplasia." *Equine Veterinary Education* 25(2): 96–107.
- Desvergne, Atrice, Liliane Michalik, and Walter Wahli. 2019. "Transcriptional Regulation of Metabolism." : 465–514.
- Domingues, Beatriz, Jose Lopes, Paula Soares, and Helena Populo. 2018. "Melanoma Treatment in Review." *ImmunoTargets and Therapy* Volume 7: 35–49.
- Dubois, Vanessa, Jérôme Eeckhoute, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. 2017. "Distinct but Complementary Contributions of PPAR Isotypes to Energy Homeostasis." *Journal of Clinical Investigation* 127(4): 1202–14.
- Dummer, Reinhard et al. 2020. "Rationale for Immune Checkpoint Inhibitors plus Targeted Therapy in Metastatic Melanoma: A Review." *JAMA Oncology* 6(12): 1957–66.
- Edge, STEPHEN B. et al. 2015. *CANCER STAGING*. Séptima ed. ed. STEPHEN B. EDGE. New york.
- Edition, Seventh. 2010. *AJCC Cancer Staging Handbook Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Other Cutaneous Carcinomas*.
- Ferri, Nicola, Alberto Corsini, Cesare Sirtori, and Massimiliano Ruscica. 2017. "PPAR- α Agonists Are Still on the Rise: An Update on Clinical and Experimental Findings." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 26(5): 593–602. <http://dx.doi.org/10.1080/13543784.2017.1312339>.
- Fleury, Catherine, Frederic Bérard, Brigitte Balme, and Luc Thomas. 2000a. "The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (1): Clinical-Pathological Characterization." *Pigment Cell Research* 13(1): 39–46.
- . 2000b. "The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (2): Epidemiological Survey." *Pigment Cell Research* 13(1): 39–46.
- Fossati, Lilian Moyano de. 2010. "Melanoma de Tipo Animal." *Dermatología Argentina* 16(5):

354–58.

- Van der Gaag, Ellen J. et al. 2002. “Role of Zyxin in Differential Cell Spreading and Proliferation of Melanoma Cells and Melanocytes.” *Journal of Investigative Dermatology* 118(2): 246–54.
- Grahovac, Jelena et al. 2019. “Telmisartan Induces Melanoma Cell Apoptosis and Synergizes with Vemurafenib in Vitro by Altering Cell Bioenergetics.” *Cancer Biology and Medicine* 16(2): 247–63.
- Gupta, Mrinal et al. 2015. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and PPAR Agonists: The ‘Future’ in Dermatology Therapeutics?” *Archives of Dermatological Research* 307(9): 767–80.
- Han, Lu et al. 2017. “PPARs: Regulators of Metabolism and as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ .” *Future Cardiology* 13(3): 279–96.
- Harmon, Gregory S., Michael T. Lam, and Christopher K. Glass. 2011. “PPARs and Lipid Ligands in Inflammation and Metabolism.” *Chemical Reviews* 111(10): 6321–40.
- Hastie, Nicholas D. 2017. “Wilms’ Tumour 1 (WT1) in Development, Homeostasis and Disease.” *Development (Cambridge)* 144(16): 2862–72.
- Hawkes, Jason E., Amanda Truong, and Laurence J. Meyer. 2016. “Genetic Predisposition to Melanoma.” *Seminars in Oncology* 43(5): 591–97.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.003>.
- Hiji, A. K., L. Michalik, and W. Wahli. 2002. “PPARs: Transcriptional Effectors of Fatty Acids and Their Derivatives.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(5): 790–98.
- Ignacio-Garza, O. 2015. “ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN WT1 (TUMOR DE WILMS) EN MELANOMA EQUINO.” Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Jørgensen, Elin et al. 2018. “Normal Microscopic Anatomy of Equine Body and Limb Skin: A Morphological and Immunohistochemical Study.” *Annals of Anatomy* 218: 205–12.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.03.010>.
- Kersten, Sander, Béatrice Desvergne, and Walter Wahli. 2000. “Roles of PPARs in Health and Disease.” *Nature* 405(6785): 421–24.

- Knottenbelt, Derek C, Janet C Patterson-Kane, and Katie L Snalune. 2015. *Clinical Equine Oncology*. segunda ed. Toronto.
- Kotb, Ahmed, Matthew Eric Hyndman, and Trushar R. Patel. 2018. “The Role of Zyxin in Regulation of Malignancies.” *Heliyon* 4(7): e00695.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00695>.
- Leonardi, Giulia C. et al. 2018. “Cutaneous Melanoma: From Pathogenesis to Therapy (Review).” *International Journal of Oncology* 52(4): 1071–80.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.” *Methods* 25(4): 402–8.
- Mackenzie, Louise S, and Lisa Lione. 2013. “Harnessing the Benefits of PPAR β / δ Agonists.” 93: 963–67.
- Matsuda, Yoko et al. 2013. “Nestin : A Novel Angiogenesis Marker and Possible Target for Tumor Angiogenesis.” 19(1): 42–48.
- Mendelsohn, John et al. 2008. “The Molecular Basis of Cancer.” *The Molecular Basis of Cancer*.
- Michiels, Jean François et al. 2010. “PPAR β Activation Inhibits Melanoma Cell Proliferation Involving Repression of the Wilms’ Tumour Suppressor WT1.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 459(5): 689–703.
- Moore, J S, C Shaw, E Shaw, and W K Scarratt. 2013. “Melanoma in Horses : Current Perspectives.” *Equine veterinary education* 25: 144–51.
- Müller, Rolf. 2017. “Biochimie PPAR β / δ in Human Cancer.” 136: 90–99.
- Núñez, Nomelí P., Huaitian Liu, and Gary G. Meadows. 2006. “PPAR- γ Ligands and Amino Acid Deprivation Promote Apoptosis of Melanoma, Prostate, and Breast Cancer Cells.” *Cancer Letters* 236(1): 133–41.
- Paulitschke, Verena et al. 2012. “Proteome Analysis Identified the PPAR γ Ligand 15d-PGJ2 as a Novel Drug Inhibiting Melanoma Progression and Interfering with Tumor-Stroma Interaction.” *PLoS ONE* 7(9): 1–10.
- Pelster, Meredith S., and Rodabe N. Amaria. 2019. “Combined Targeted Therapy and

Immunotherapy in Melanoma: A Review of the Impact on the Tumor Microenvironment and Outcomes of Early Clinical Trials.” *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 11: 1–11.

Peters, Jeffrey M., Yatrik M. Shah, and Frank J. Gonzalez. 2012. “The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Carcinogenesis and Chemoprevention.” *Nature Reviews Cancer* 12(3): 181–95. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3214>.

Peters, Jeffrey M, Frank J Gonzalez, and Rolf Müller. 2015. “Establishing the Role of PPAR β / δ in Carcinogenesis.” 26(11): 595–607.

Phillips, Jeffrey C., and Luis M. Lembcke. 2013. “Equine Melanocytic Tumors.” *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 29(3): 673–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2013.08.008>.

Rangel-Sánchez, Itzel et al. 2021. “Expression of the Wilms’ Tumour Gene and Its Association with PPAR β/δ in Healthy Skin and Melanoma of Horses.” *Acta Veterinaria Hungarica* 68(4).

Read, Jazlyn, Karin A.W. Wadt, and Nicholas K. Hayward. 2015. “Melanoma Genetics.” *Journal of Medical Genetics* 53(1): 1–14.

Ropka-Molik, K, Stefaniuk-Szmukier M, Zukowski K, and Piórkowska K. 2017. “Exercise-Induced Modification of the Skeletal Muscle Transcriptome in Arabian Horses.” *the American Physiological Society*.

Ropka-Molik, Katarzyna et al. 2017. “Exercise-Induced Modification of the Skeletal Muscle Transcriptome in Arabian Horses.” *Physiological Genomics* 49(6): 318–26.

Sakharkar, Meena K. et al. 2013. “Therapeutic Implications of Targeting Energy Metabolism in Breast Cancer.” *PPAR Research* 2013.

Sánchez-Guerrero, M. J. et al. 2019. “Genetic and Environmental Risk Factors for Vitiligo and Melanoma in Pura Raza Español Horses.” *Equine Veterinary Journal* 51(5): 606–11.

Schott II, Harold C., and D Peterson. 2005. “Cutaneous Markers of Disorders Affecting Young Horses.” : 314–23.

Scott, D Anny W S, and William H Miller. 2011. *Equine Dermatology*. segunda ed. Missouri.

Seltenhammer, M. H. et al. 2003. “Equine Melanoma in a Population of 296 Grey Lipizzaner

Horses.” *Equine Veterinary Journal* 35(2): 153–57.

Spugnini, Enrico P. et al. 2011. “Electrochemotherapy for the Treatment of Multiple Melanomas in a Horse.” *Journal of Equine Veterinary Science* 31(8): 430–33.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2011.01.009>.

Tachibana, Keisuke, Daisuke Yamasaki, Kenji Ishimoto, and Takefumi Doi. 2008. “The Role of PPARs in Cancer.” *PPAR Research* 2008.

Valentine, Beth A. 1995. “Equine Melanocytic Tumors: A Retrospective Study of 53 Horses (1988 to 1991).” *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9(5): 291–97.

van der Weyden, Louise et al. 2020. “Spontaneously Occurring Melanoma in Animals and Their Relevance to Human Melanoma.” *Journal of Pathology* 252(1): 4–21.

Yang, Liqun et al. 2020. 5 Signal Transduction and Targeted Therapy *Targeting Cancer Stem Cell Pathways for Cancer Therapy*. Springer US. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-01110-5>.

Zachary, James F. 2017. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6th Editio. eds. James F (College of Veterinary Medicine Zachary and University of Illinois) Illinois. Illinois.

Zieleniak, Andrzej, Marzena Wójcik, and Lucyna A. Woźniak. 2008. “Structure and Physiological Functions of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ .” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 56(5): 331–45.

Zoete, Vincent, Aurelien Grosdidier, and Olivier Michielin. 2007. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Structures: Ligand Specificity, Molecular Switch and Interactions with Regulators.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(8): 915–25.

12. ANEXOS

Anexo 1: Tabla de datos de las muestras de piel sana.

| Muestras de piel sana | | | | | |
|-----------------------|------|-----------------|-------------|----------------|-------------|
| N° | Sexo | Raza | Edad (años) | Color de capa | Rendimiento |
| 1 | M | Cuarto de milla | 3 | Alazán | A |
| 2 | H | Frisón/shire | 1 | Prieta | B |
| 3 | M | Cuarto de milla | 4 | Prieto | A |
| 4 | M | Frisón | 8 | Prieto | B |
| 5 | M | Ibérico | 10 | Albino | B |
| 6 | M | Cuarto de milla | 3 | Moro | A |
| 7 | M | Cuarto de milla | 18 | Bayo | B |
| 8 | H | Cuarto de milla | 1 | Alazán | B |
| 9 | H | Cuarto de milla | 10 | Tordillo | B |
| 10 | H | Cuarto de milla | 3.5 | Moro carbonero | A |

*A=Alto rendimiento físico, B=Bajo rendimiento físico.

Anexo 2: Tabla de datos de las muestras de melanoma:

| Muestras de melanoma | | | | | | |
|----------------------|---|--------------------------|------------|---------------|------|-------------|
| Caballos | Diagnóstico histopatológico | Ubicación | Raza | Color de capa | Edad | Rendimiento |
| M1 | Melanoma | Maslo de la cola | ¼ de milla | Tordillo | 14 | B |
| M2 | Melanoma | Maslo de la cola | ¼ de milla | Tordillo | 18 | B |
| M3 | Melanoma | Prepucio | ¼ de milla | Cremello | 10 | B |
| M4 | Melanoma | Escápula parte posterior | ¼ de milla | Tordillo | 16 | B |
| M5 | Melanoma de células elongadas | Región perianal | Ibérico | Albino | 10 | B |
| M6 | Melanoma amelanocítico de células elongadas | Base de la cola | ¼ de milla | Tordillo | 14 | B |
| M7 | Melanoma | Región perianal | ¼ de milla | Tordillo | 18 | B |
| M8 | Melanoma | Cola | Ibérico | Tordillo | 16 | B |
| M9 | Melanoma | Base de la cola | Appendix | Tordillo | 13 | B |
| M10 | Melanoma | Región perianal | ¼ de milla | Tordillo | 12 | B |

*A=Alto rendimiento físico, B=Bajo rendimiento físico.