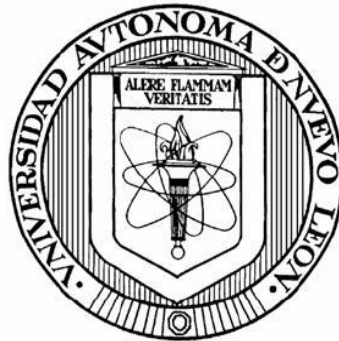


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 EN PIEL NORMAL Y MELANOMAS DE  
CABALLOS TORDILLOS Y OTROS COLORES DE CAPA

Por

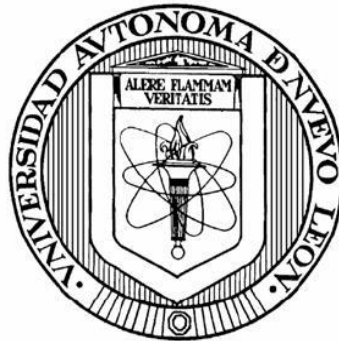
MVZ.AXEL MARIN VALBUENA

Como requisito parcial para obtener el grado de:  
“MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL”

General Escobedo, Nuevo León, México.

Julio, 2021

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



ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 EN PIEL NORMAL Y MELANOMAS DE  
CABALLOS TORDILLOS Y OTROS COLORES DE CAPA

Por

MVZ.AXEL MARIN VALBUENA

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

General Escobedo, Nuevo León, México.

Julio, 2021

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 EN PIEL NORMAL Y MELANOMAS DE  
CABALLOS TORDILLOS Y OTROS COLORES DE CAPA

Aprobación de tesis por el comité particular de

AXEL MARIN VALBUENA

**Comité de Tesis**



---

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila  
Presidente



---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Secretario



---

Dr. Gustavo Hernández Vidal  
Vocal



---

Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar  
Vocal



---

Dr. Gustavo Moreno Degollado  
Vocal

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE WT1 EN PIEL NORMAL Y MELANOMAS DE  
CABALLOS TORDILLOS Y OTROS COLORES DE CAPA

Aprobación de tesis por el comité particular de

AXEL MARIN VALBUENA

**Dirección de Tesis**



Directora

Dra. Diana Elisa Zamora Ávila



Director Externo

Dr. Pablo Zapata Benavides



Co-director

Dr. Gustavo Hernández Vidal



Co-director

Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar



Co-director

Dr. Gustavo Moreno Degollado

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en colaboración con el Departamento de Biología Molecular del Cáncer de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, primeramente, a todas las instituciones que hicieron posible esta investigación, comenzando por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Departamento de Genética de la FMVZ, Departamento de Virología de la FMVZ y al Hospital de Grandes Especies de la FMVZ.

Agradezco a la Dra. Diana Zamora Ávila que siempre estuvo al pendiente de mi proyecto y además que me haya brindado todos los recursos posibles para poder concluir de la mejor manera esta investigación. Agradezco al Dr. Gustavo Hernández Vidal por brindarme su apoyo para el uso de las instalaciones del HGE. Al Dr. Luis Martínez del Campo por todo el conocimiento y tiempo que ha compartido conmigo, que sin duda alguna me ha servido para crecer como médico y como persona.

Agradecer también a la TSU. Cynthia Marisol Padrón Carrillo del departamento de Genética de la FMVZ y a la TLC. Leslee Nayelly de la Rosa Contreras del departamento de Virología de la FMVZ, ambas me brindaron sus conocimientos para encontrar soluciones a los detalles que con el tiempo surgían y así poder continuar con mi investigación.

Agradezco al Dr. Uziel Castillo que me brindó su amplio conocimiento para poder realizar mis pruebas moleculares y la interpretación de éstas.

Agradezco a mis compañeros de maestría por su apoyo, compañía, consejos, conversaciones, reuniones y demás, que siempre me recordaban que donde quiera que estes siempre habrá gente que te haga estar bien. A mi compañero Leonardo Tafur y Kevin que llevamos nuestros proyectos de la mano, y pudimos compartir conocimientos e ideas que fueron muy importantes para finalizar nuestros proyectos.

Al MC. Jaime Eduardo “Jimmy” que hacía espacio y tiempo para asesorarme y brindarme su conocimiento.

A mi familia y amigos que siempre se mantuvieron al pendiente de mí, y lo siguen haciendo.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a todos aquellos que me brindaron su apoyo, conocimiento, tiempo, espacio y que además me mostraron toda su confianza y nunca dudaron de mí.

A todos los doctores que estuvieron involucrados en este proyecto, sus palabras siempre son consejos que ayudan a construir.

## ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
ÍNDICE .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xii
1.-INTRODUCCIÓN .....	1
2.-ANTECEDENTES .....	3
2.1.-Funciones y propiedades generales de la piel .....	3
2.2.-Melanocitos y melanogénesis .....	4
2.3.-Colores de capa .....	7
2.4.-Cáncer .....	7
2.5.-Cáncer en piel de equinos .....	8
2.6.-Melanoma en equinos .....	9
2.7.-Gen WT1 .....	10
2.8.-Gen WT1 en equinos.....	12
3.-JUSTIFICACIÓN .....	13
4.-HIPÓTESIS .....	14
5.-OBJETIVOS .....	15
5.1.-Objetivo general.....	15
5.2.-Objetivos específicos .....	15
6.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1.-Área de trabajo .....	16
6.2.-Animales de estudio y métodos de recolección de muestras. ....	16
6.3.- Histopatología .....	17
6.4.- Inmunohistoquímica.....	17
6.5.- PCR-RT con SYBR Green.....	17



6.5.1.- Extracción ARN método Trizol ® (Invitrogen) .....	17
6.5.2 Síntesis de ADNc.....	18
6.6.-Análisis estadístico.....	19
7.-RESULTADOS .....	20
7.1.-Análisis de los datos de las muestras recolectadas.....	20
7.1.1.-Histopatología en muestras de piel.....	23
7.1.2.-Histopatología en muestras de melanoma .....	24
7.2.-Análisis por inmunohistoquímica .....	30
7.3.-PCR-RT.....	33
8.-DISCUSIÓN .....	42
9.-CONCLUSIONES .....	45
10.-BIBLIOGRAFÍA .....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grosor de la piel en las diferentes partes anatómicas del caballo.....	3
Tabla 2. Componentes y estructuras de adhesión.....	6
Tabla 3. Principales genes involucrados en el color de capa .....	7
Tabla 4. Estudio retrospectivo de 4 años: diferentes porcentajes de neoplasias diagnosticadas en un total de 1322 muestras.....	8
Tabla 5.- Principales isoformas por mecanismo de splicing.....	11
Tabla 6.- Oligonucleótidos utilizados para PCR-RT.....	19
Tabla 7- Datos de pacientes y muestras tomadas. *PN: piel normal, MEL: melanoma, S: sexo, E: edad, R: raza.....	20,21, 22
Tabla 8.- Diagnóstico histopatológico de las muestras de melanoma.....	24,25
Tabla 9.-Resultados del análisis $2^{\Delta\Delta Ct}$ de piel normal y melanoma. Los mayores índices de expresión se observaron en piel normal en comparación con los de melanoma.....	30
Tabla 10.-Índice de expresión de WT1 en inmunohistoquímica.....	33
Tabla 11.-Recopilación de las interpretaciones de inmunohistoquímicas en melanoma equino.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Melanocito y sus estructuras.....	4
Figura 2. Biosíntesis de la melanina (melanogénesis).....	5
Figura 3.-Síntesis de las isoformas de WT1.....	11
Figura 4.- Imágenes de la recolección de muestras. A) Melanoma (2cm <sup>2</sup> ), B) Melanoma con pigmentación central, C) Melanoma en caballo albino, D) Melanoma con pigmentación mixta, E) Melanoma fistulado, F) Melanoma plano, G) Muestra de piel caballo moro carbonero, H) Muestra de piel caballo bayo. Se ha colocado una marca amarilla señalando el lugar de resección.....	22
Figura 5.- Muestra de piel normal, 4X, 10X y 40X. Señalizados con flecha negra: A) Epidermis, B) Folículo piloso, C) Glándula sebácea, D) Melanocito.....	23
Figura 6.- Melanoma de células poligonales, 4x, 10X, 40X. Señalizados con flecha negra: A) Queratinocito con melanina en citoplasma y núcleo, B) Melanocito con melanina en citoplasma y núcleo (ovoide), C) Glándula con presencia de melanina.....	26
Figura 7.- Melanoma de células elongadas, 4X, 10X, 40X. Señalizados con flecha A) Queratinocito con escasa melanina, B) Melanocito con escasa melanina, núcleo elongado, C) Matriz colagenoide, D) Presencia de melanina difusa.....	27
Figura 8.- Melanoma, 4X, 10X, 40X. Señalizados con flecha negra: A) Agregados melanocíticos, B) Matriz colagenoide, C) Melanocito.....	28
Figura 9.- Melanoma amelanico de células elongadas, 4X, 10X, 40X. Señalizado con flecha negra A) Melanocitos con bordes indistintos, no pigmentados con núcleos alargados.....	29
Figura 10.- Análisis PCR-RT de muestras de piel normal. Asociación de edad y color de capa.....	31
Figura 11.- Análisis PCR-RT de muestras de melanoma equino. Asociación de tamaño de tumor y pigmentación.....	32
Figura 12.- Piel normal (P6) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) nuclear(A), positividad (++) citoplasmática en epidermis (A) y epitelio sudoríparo (B).....	34
Figura 13.- Piel normal (P7) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++ a +++) nuclear (A) y citoplasmática (A), epitelio de epidermis, epitelio apócrino (B) y epitelio folicular, positividad (+ a ++) en algunas células endoteliales vasculares (C).....	34
Figura 14.- Piel normal (P8) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) nuclear (A) y citoplasmática (A), en epitelio de epidermis (B) y folicular (C).....	35

Figura 15.- Piel normal (P9) 10X y 40X. señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) nuclear (A) y citoplásmica(A), epitelio sudorífero (B), epitelio folicular (C).....	35
Figura 16.- Melanoma (M24) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en todos los componentes, epidermis (C), epitelio sudorífero (B), el patron es nuclear y citoplásmico en melanocitos malignos (A).....	36
Figura 17.- Melanoma (M25) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) en epidermis (B), positividad (+++) en melanocitos malignos (A) el patron es nuclear y citoplásmico.....	37
Figura 18.- Melanoma (M26) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epidermis (B) y epitelio sudorífero, positividad (+++) en melanocitos malignos (A) patrón nuclear. y citoplasmático.....	37
Figura 19.- Melanoma (M27) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epidermis y epitelio sudorífero, positividad (+++) en melanocitos malignos (A) patron nuclear y citoplasmático.....	38
Figura 20.- Melanoma (M11) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epitelio sudorífero (B), positividad (+) en queratinocitos epidérmicos, positividad (+ a ++) en los melanocitos malignos (A), patron únicamente citoplásmico.....	38
Figura 21.- Melanoma (M12) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epidermis (B), positividad (++) en epitelio sudorífero, positividad citoplasmática (+) en melanocitos malignos fusiformes, positividad citoplasmática (++) en melanocitos malignos poligonales (A).....	39
Figura 22.- Melanoma (M14) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra negativo en epidermis, positividad (- a +) citoplasmática en melanocitos.....	39
Figura 23.- Melanoma (M15) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epitelio de epidermis, positividad (+++) en citoplasma y núcleo de melanocitos malignos.....	40
Figura 24.- Melanoma (M19) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epidermis y epitelio sudorífero, positividad (+++) citoplasmática en melanocitos malignos.....	40

## ABREVIATURAS

**WT1:** Tumor de Wilm's

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**H&E:** Hematoxilina y Eosina

**µl:** Microlitros

**Aa:** aminoácidos

**KTS:** aminoácidos lisina, treonina y serina

**STX17:** Syntaxina 17

**INVS:** Inversina

**TXNDC4:** Thioredoxin Domain-Contain-4

**NR4A3:** Nuclear Receptor Subfamily 4

**PDGF-A:** Platelet Derived Growth Factor subunit-A

**EGR:** Early Growth Response

**MSH:** Melanocyte Stimulating Hormone

## RESUMEN

En la actualidad ha tomado gran relevancia el diagnóstico histopatológico de las neoplasias en los caballos debido a que la industria equina ha crecido exponencialmente; a nivel mundial la incidencia de cáncer en equinos es baja, sin embargo, entre las neoplasias con mayor incidencia se encuentran las de la piel, incluyendo: sarcoides, papilomas y melanomas; de estos 3 tipos de neoplasias la de mayor relevancia es el melanoma debido a su evolución negativa durante la vida de los equinos que lo padecen, motivo por el cual se hace necesario el realizar análisis de los melanomas para entender su desarrollo y evolución, tomando en consideración factores genéticos (marcadores moleculares) asociadas a este tipo de neoplasias.

En lo caballos existen factores intrínsecos como el color de capa y la edad, que predisponen a desarrollar melanomas. Los colores de capa en el caballo, así como sus diversas tonalidades, son regulados por la expresión de genes dominantes o recesivos cuya expresión puede verse afectada por factores externos alterando su expresión; los colores de capa clara muestran una mayor predisposición a desarrollar neoplasias en la piel como el melanoma, el cual, puede desarrollarse a largo de la vida del caballo. En el caso de neoplasias en humanos, WT1 (Tumor de Wilm's) se ha reconocido como un oncogén y se ha asociado a proliferación celular, malignidad, metástasis, quimioresistencia y baja sobrevivencia. El gen WT1 se encuentra expresado en humanos en diversos procesos neoplásicos; donde cabe destacar su sobreexpresión en melanoma maligno y en otro tipo de melanomas como los son: melanomas nodulares, melanomas metastásicos y melanomas superficiales, sin embargo, en equinos su rol biológico en piel normal y melanoma no se encuentra dilucidado.

En este trabajo se analizó la expresión de WT1 en un total de 37 muestras, 10 de piel normal y 27 de melanomas, por medio de inmunohistoquímica y PCR-RT. Los resultados obtenidos demostraron la presencia del ARNm del gen WT1 en el 100% de las muestras de piel normal y melanoma analizadas, encontrándose una mayor expresión en piel normal comparada con las muestras de melanoma.

En las muestras de piel normal, se encontró una mayor expresión en aquellas provenientes de caballos jóvenes y con colores de tonalidad oscura.

En las muestras de melanomas se observó que entre menor tamaño del tumor (2 cm<sup>2</sup>) mayor la expresión de WT1, aunado a esto se también se observó que entre mayor pigmentación del tumor menor expresión de WT1.

En los resultados de inmunohistoquímica, se observó en las muestras de piel normal expresión moderada a alta de la proteína de WT1 en la mayoría de los componentes celulares: epidermis, núcleo, citoplasma y glándula sebácea.

En las muestras de melanoma se observó expresión de la proteína de WT1 de moderada a alta en muestras provenientes de tumores no mayores a 2cm<sup>2</sup> a nivel nuclear y citoplasmático de los melanocitos y en tumores de mayor tamaño una positividad alta a nivel citoplasmático con patrón difuso y de moderada a leve en las muestras de melanomas amelanocíticos.

Los resultados obtenidos sugieren que WT1 está jugando un rol como gen supresor de tumor para el desarrollo de melanoma en equinos.

## ABSTRACT

Currently the histopathological diagnosis of neoplasms in horse has taken great relevance due the fact that the equine industry has grown exponentially; worldwide the incidence of cancer in equines is low, however, neoplasms with the highest incidence are the skin neoplasms including: sarcoides, papilloma and melanoma. Melanoma is the most relevant type of skin neoplasm due the fact that is more aggressive and have negative evolution along the life of horses. Whence it's necessary the analysis of melanoma to understand more of its behavior, considering genetic (molecular markers) associated to melanoma. There are intrinsic factors, like color and age, that predispose horses to developing melanoma. The different colors of the horse are regulated by a diversity of genes which can be dominant or recessive and can be affected by external factors altering his expression. The clear colors of the horse show a greater predisposition to developing neoplasms such as melanoma which can evolve throughout the horse's life.

In human's WT1 has been recognized as an oncogene and has been associated with cellular proliferation, malignancy, metastasis, chemoresistance and low survival. WT1 it's present in various neoplastic processes; however, it's important to mention that this gen it's highly expressed in malignant melanoma and in other types of melanomas such nodular melanomas, metastatic melanomas, and superficial melanomas, however in equines the role of WT1 it's not clear yet. In this work we analyzed the expression of WT1 in 37 samples, 10 of normal skin and 27 of melanoma by PCR-RT and inmunochemistry. The obtained results show the presence of RNAm of WT1 in 100% of the samples. We found a higher expression in normal skin in comparison with melanoma.

In the samples of normal skin, we found a higher expression in those from young horses and dark color.

In the samples of melanoma, we observed that samples of small tumor's (2 cm<sup>2</sup>) higher the expression of WT1, also we observed that the samples were more pigmented less expression of WT1.



In the immunohistochemical results we observed moderate to high expression of WT1 in the samples of normal skin and his cellular components: epidermis, nucleus, cytoplasm, and sebaceous gland.

In melanoma samples we observed moderate to high expression in melanocyte at nuclear and cytoplasmic level of WT1 protein from tumors not larger than 2 cm<sup>2</sup> and in larger tumors we observed moderate to high expression of WT1 at cytoplasmic levels with a diffuse pattern also we observed moderate to mild expression in samples of amelanic melanomas.

These results suggest that WT1 has a tumor suppressor role in the development of melanoma in equines.

## 1.-INTRODUCCIÓN

Debido al creciente interés en la industria equina, cada vez existen más personas interesadas en la salud de sus caballos, este interés crece de la mano con la preparación que tenemos los médicos que nos dedicamos a atender este tipo de pacientes, y los diferentes tratamientos que se están desarrollando.

Dentro de los problemas que se presentan con mayor frecuencia en los caballos se encuentran los problemas en la piel, incluidas las neoplasias, además de que los caballos por sus diversos colores de capa, predisponen a desarrollarlas. El cáncer en los equinos no es considerado una condición clínica relevante, pero es una causa significativa de morbilidad y mortalidad. A nivel mundial hacen falta sistemas de registro apropiados para conocer la verdadera incidencia de cáncer (Knottenbelt, 2015).

Existen estudios que mencionan que alrededor del 75-80% del total de las neoplasias presentes en caballos son en piel y se identifican 3 principalmente: melanoma, sarcoide y papiloma, siendo el melanoma el 3<sup>er</sup> lugar en cuanto a incidencia. En comparación con el sarcoide, papiloma y tumor de células escamosas los melanomas en la piel de los caballos tiende a ser maligno, sin embargo, solo un 25% de los casos presentan metástasis (Hendrick, 2016; Merlo, 2012).

En el caso de melanoma estos pueden ser benignos o malignos de acuerdo con el tiempo de presentación. Algunos autores mencionan que la mayoría de las neoplasias benignas eventualmente puede progresar a ser malignas esto de acuerdo con la edad y el color de capa, incluso pueden producir metástasis hacia los órganos internos. Además, se sugiere que la presencia de melanomas en la región parótida son más propensas a presentar metástasis, diversos autores mencionan la importancia de realizar histopatología de las masas que se reseccionen de los diversos casos que se presenten porque no siempre se trata de masas benignas (Knottenbelt, 2015; Wobeser, 2015; Moore et al., 2013; Hewes & Sullins, 2006).

El alto riesgo de metástasis y las complicaciones que se presentan aún con un tratamiento, resaltan la importancia del diagnóstico temprano y del desarrollo de pruebas de laboratorio más específicas para determinar el progreso y el tipo de melanoma presente en los equinos (Moore et al., 2013).

En otras especies incluido el humano se han realizado estudios para la búsqueda de genes que puedan ser utilizados como biomarcadores y futuros blancos terapéuticos en melanoma, siendo uno de ellos el gen WT1, cuya expresión se ha asociado a proliferación celular, inhibición de la apoptosis, malignidad, metástasis, quimioresistencia y baja sobrevivencia, reconociéndose, así como un biomarcador tumoral (Carranza-Martínez et al., 2019; Carter et al., 2018; Hastie, 2017).

El gen WT1 en equinos se encuentra en el cromosoma 7 y cuenta con 11 exones y en un trabajo previo realizado por el grupo de investigación se encontró expresión de la proteína de WT1 en muestras de piel normal y no así en las muestras de melanoma analizadas (Rangel, 2017). Sin embargo, no se ha logrado dilucidar el rol biológico que pudiera estar jugando WT1 para el desarrollo de melanoma en equinos y si existe alguna correlación entre la expresión de este gen con el color de capa, el cual ha sido definido como un factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia en équidos. Por lo anteriormente mencionado, el objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de WT1 en muestras de piel sana y melanomas de caballos tordillos y su relación con los colores de capa.

## 2.-ANTECEDENTES

### 2.1.-Funciones y propiedades generales de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y es la barrera entre el animal y el medio ambiente. Este órgano se encarga de brindar protección contra lesiones físicas, químicas y microbiológicas, además, esta inervada, lo cual le confiere la capacidad de percibir calor, frío, dolor, comezón, contacto y presión. Y además la piel juega un papel sinérgico con los órganos internos, refleja procesos patológicos en un órgano específico o un órgano que comparte lugar con otros tejidos (Scott, 2011).

Histológicamente la piel se puede identificar en capas o estratos los cuales son (de dentro hacia afuera): estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido, estrato córneo. El grosor de estos estratos presenta una variabilidad de acuerdo con el lugar anatómico como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1):

**Tabla 1. Grosor de la piel en las diferentes partes anatómicas del caballo** (Scott, 2011).

LOCALIZACIÓN	GROSOR
<b>Cuerpo y cara (con pelo)</b>	30-100 $\mu\text{m}$ (53 $\mu\text{m}$ promedio)
<b>Melena y cola</b>	40-200 $\mu\text{m}$ (90 $\mu\text{m}$ promedio)
<b>Piel en uniones mucocutáneas</b>	40-1000 $\mu\text{m}$ (238 $\mu\text{m}$ promedio)

La piel tiene diversas funciones importantes como: producir glándulas y estructuras queratinizadas tales como pelo, casco y la capa cornificada de la epidermis, regulación de la temperatura corporal ofreciendo soporte con la capa de cabello, regulación de flujo sanguíneo cutáneo y las funciones de las glándulas sudoríparas, indicador de la salud en general, así como de enfermedades que involucran órganos internos y efectos de sustancias aplicadas tópicamente o internamente. En cuanto a la inmunidad se ven involucradas diferentes tipos de células como células de Langerhans, linfocitos, dendrocitos dérmicos y queratinocitos, que en conjunto proveen a la piel de un sistema de vigilancia contra infecciones y desarrollo de neoplasias, además, la piel lleva a cabo un proceso de pigmentación denominado melanogénesis, en el cual se

produce melanina, así como vascularización y queratinización de la piel, que conlleva a la formación de una capa de protección contra la radiación solar. (Neuber & Nuttall, 2017; William J. Bacha, 2012; Scott, 2011).

## 2.2.-Melanocitos y melanogénesis

A diferencia de las células que se consideran primarias como los histiocitos, fibroblastos y células mesenquimatosas los melanocitos son el tipo celular secundario. Los melanocitos se encuentran en la capa basal de la epidermis, también se encuentran en la matriz de los folículos pilosos, en los ductos sebáceos, glándulas sudoríparas y en los vasos sanguíneos que irrigan la dermis superficial; existe una relación que indica que por cada melanocito existen 20 queratinocitos.; estos 2 tipos de células componen la unidad de melanina epidérmica que es altamente dinámica y responsiva ante estímulos endógenos y exógenos los cuales determinaran la función y constitución de los melanocitos. A continuación se muestra la estructura funcional del melanocito (Figura 1) (Neuber & Nuttall, 2017; Knottenbelt, 2015;; Scott, 2011).

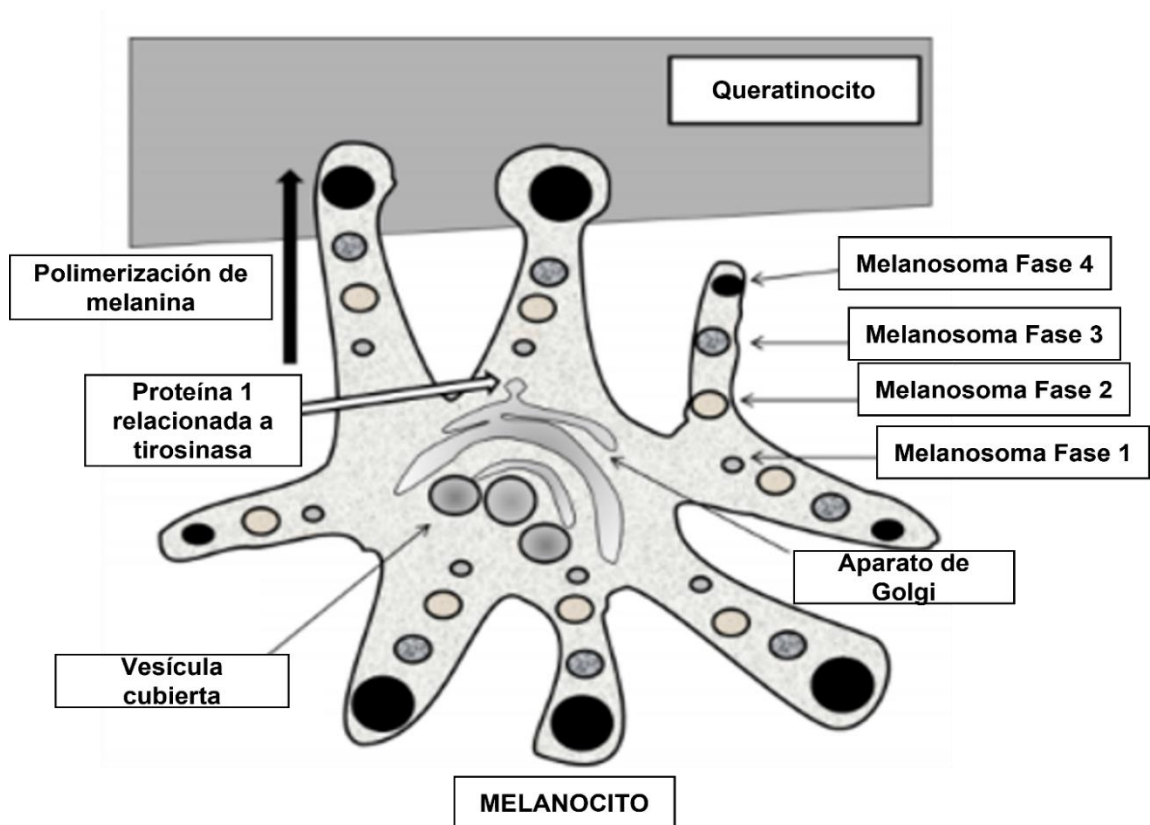


Figura 1. Melanocito y sus estructuras. Obtenido y traducido (Ma, 2012.).

La melanina es un pigmento considerado un biopolímero multifuncional, existen diferentes tipos de melanina: eumelanina (negro-café) y feomelanina (amarillo-café rojizo) ambos tipos de melanina pueden conjugarse para expresar las diversas tonalidades de la melanina; la melanina es polimerizada en el interior de vesículas subcelulares denominadas melanosomas, las cuales contienen las enzimas necesarias para sintetizar la melanina. El factor que regula la expresión de melanina es la dopaquinona, derivada de la oxidación de la tirosina. A continuación se muestra el proceso de melanogénesis (Figura 2) (Ma, 2012).

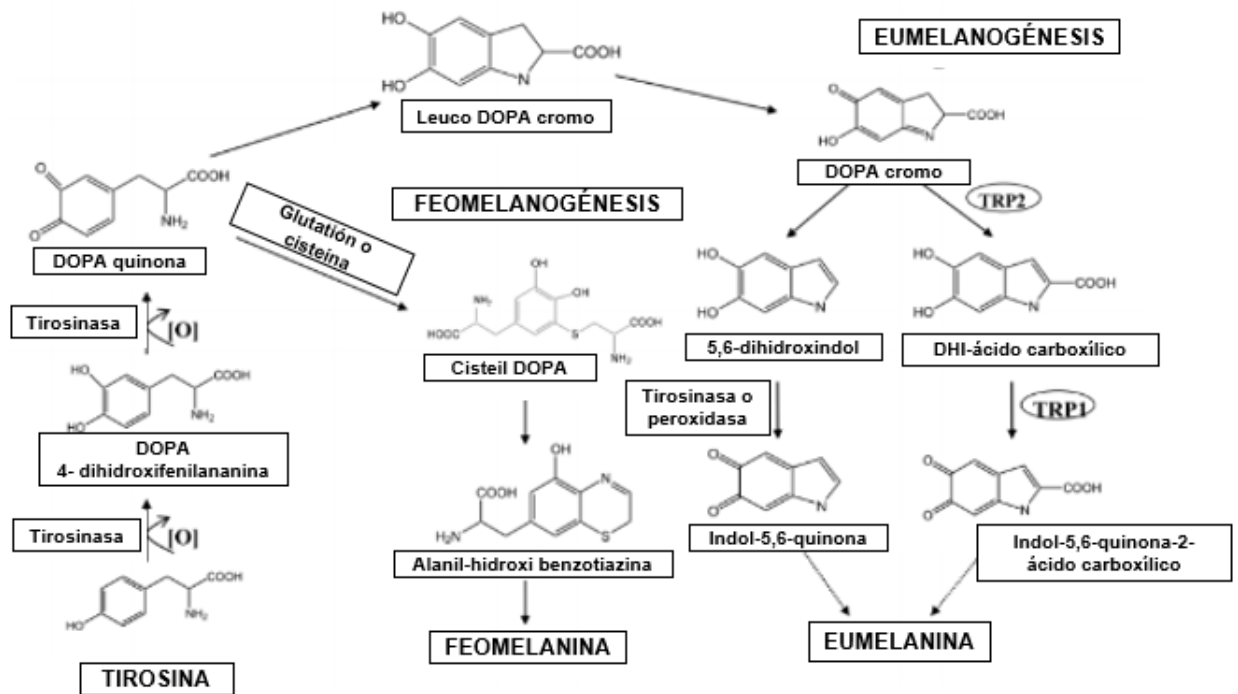


Figura 2. Biosíntesis de la melanina (melanogénesis). Obtenido y traducido (Ma, 2012).

La producción de melanina se da principalmente por la estimulación de la hormona estimuladora de melanocitos (*Melanocyte Stimulating Hormone*, MSH); las principales hormonas pigmentadoras son  $\alpha$ -melanocortina, corticotropina y la  $\beta$ -lipotropina. La melanogénesis tiene lugar en el melanosoma el cual se clasifica en 4 fases (grado de madurez) dependiendo del tipo y cantidad de melanina; el proceso en sí consiste en la obtención de melanina a partir de la oxidación de la 3,4-dihidroxifenilalanina a través de la enzima tirosinasa (oxidación), posteriormente los

productos de la oxidación son agrupados por los melanocitos en los melanosomas, para su posterior fagocitosis por el queratinocito en un proceso único denominado citocrinia o secreción citócrica; además son necesarias diferentes tipos de proteína de adhesión para fijar correctamente los sustratos y células, se mencionan en la siguiente tabla (tabla 2): (Ma, 2012.; Scott, 2011).

**Tabla 2. Componentes y estructuras de adhesión. Obtenido y traducido (Scott, 2011).**

Estructura de adhesión	Proteínas transmembrana	Proteínas fijadoras	Filamentos del citoesqueleto	Función y localización
Hemidesmosoma	$\alpha 6\beta 4$ integrina, colágeno tipo XVIII	Plectina, antígeno buloso penfigoide ( <i>Bullous pemphigoid antigen</i> , BPAG).	Citoqueratina	Adhesión de célula-sustrato; células y membrana basales
Focal	$\beta 1$ integrinas ( $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 3\beta 1$ , $\alpha 5\beta 1$ )	Talina, vinculina, paxilina, actinina.	Actina	Adhesión célula-sustrato; células basales
Desmosoma	Caderinas desmosomales: Desmogleina I, 11, 111; Desmocolina I, II, III.	Placoglobina, desmoplaquina, desmocalmina, placofilina.	Citoqueratina	Adhesión célula-célula; todos los queratinocitos
Unión clásica		Placoglobina, catenina, actina, vinculina.	Actina	Adhesión célula-célula; todos los queratinocitos (caderina solo en células basales)

### 2.3.-Colores de capa

La melanina y los factores genéticos que regulan su expresión están involucrados en la capa de color de los caballos, dichos genes han sido estudiados a detalle. Están involucrados al menos 6 genes en toda la variedad de colores en los caballos. Cada gen puede presentar dominancia o recesividad, de acuerdo con el rol que desempeñe cada gen, pueden desarrollarse colores de capa en diferentes tonalidades; en la siguiente tabla se presentan los genes más relevantes en la generación de los colores de capa (tabla 3) (Knottenbelt, 2015; Scott, 2011):

**Tabla 3. Principales genes involucrados en el color de capa** (Scott, 2011; Sponenberg & Bellone, 2017).

Gen	Función
W	Cuando este gen es dominante, el caballo que lo presenta muestra inhabilidad para formar melanina en la piel y en el pelo.
G	Determina la exclusión del pigmento del pelo.
B	Determina el pigmento negro en el pelo.
A	Determina la distribución del pelo negro.
C	Determina la dilución de las capas fundamentales (café, negro, apaloosa)
D	Determina la dilución del color del pelaje, que hace que el caballo muestre cambios que se denominan marcas primitivas, por ejemplo, la raya de mula

### 2.4.-Cáncer

En general se puede definir el cáncer como un conjunto de procesos celulares erráticos, los cuales desencadenan diferentes procesos fisiopatológicos que conllevan, generalmente, al desarrollo de neoplasias. Existen muchos tipos de cáncer que se pueden generar por diversas situaciones y diferentes factores, en la siguiente tabla se muestra una recopilación de diferentes casos confirmados de cáncer en equinos (tabla 4) (Zachary, 2017; Knottenbelt, 2015).



**Tabla 4. Estudio retrospectivo de 4 años: diferentes porcentajes de neoplasias diagnosticadas en un total de 1322 muestras. Obtenido y traducido (Knottenbelt, 2015).**

<b>TIPO DE TUMOR</b>	<b>PORCENTAJE (%) DE CASOS DE NEOPLASIAS REMITIDOS PARA HISTOLOGÍA/NECROPSIA</b>	<b>PACIENTES REMITIDOS PARA SACRIFICIO QUE PRESENTARON NEOPLASIAS</b>
<b>Tumores en piel</b>		
Sarcoide	43.6	.15
Melanoma	3.8	1.1
Papiloma	5.5	
Neurofibroma	4.2	
<b>Tumores en otros órganos</b>		
Tumor de células de la granulosa	2.5	
Linfoma	1.3	
Lipoma	3	1.5
Fibroma	2.1	
Colesteaoma	1.3	
Neoplasia de tiroides		5.4
Tumor en glándulas adrenales		1.8

### **2.5.-Cáncer en piel de equinos**

El cáncer en equinos no es considerado una condición clínica relevante, pero es una causa significativa de morbilidad y mortalidad. La verdadera incidencia de cáncer en equinos no está bien establecida, esto debido a falta de registros apropiados a nivel global.

Los diferentes tipos de cáncer en equinos se dan por diversas circunstancias, por ejemplo: ubicación geográfica, alimentación, actividad zootécnica, exposición a agentes químicos, contacto con agentes infecciosos, etc. Las neoplasias más comunes en los caballos son las que involucran la piel y sus diferentes estructuras (Knottenbelt, 2015).

Existen estudios de casos de neoplasias reportados, presentes en caballos, en los cuales más del 50% son en piel, de los cuales existen 3 tipos principalmente: melanoma, sarcoide y papiloma, siendo el melanoma el 3<sup>er</sup> lugar en cuanto a incidencia; a diferencia del sarcoide y el papiloma, el melanoma muestra los mayores índices de malignidad, incluso llegando a mostrar metaplasia (Hendrick, 2016; Merlo, 2012).

En México no existe mucha información acerca de la incidencia, desarrollo y tratamiento en los melanomas de los caballos; siendo una problemática considerable debido al creciente interés por los caballos en diferentes ámbitos.

## **2.6.-Melanoma en equinos**

Este tipo de neoplasia puede ser benigna o maligna de acuerdo a diferentes factores. Algunos autores mencionan que la mayoría de las neoplasias benignas eventualmente puede progresar a ser malignas esto de acuerdo con la edad y el color de capa, llegando incluso a producir metástasis a órganos internos. Además, se sugiere que los melanomas que se desarrollan en la región parótida son más propensos a producir metástasis (Hewes & Sullins, 2006; Knottenbelt, 2015; Wobeser, 2015).

En un estudio de Moore y colaboradores (2013) en donde se realizó una recolección de casos clínicos de melanoma en diferentes fases, se concluyó que los dos factores de mayor relevancia para el desarrollo de melanoma son: la edad y el color, en este estudio se menciona una edad promedio de los caballos de 15 años y en que su mayoría los caballos que desarrollan esta neoplasia son tordillos o con una tonalidad de gris; se menciona una asociación del color gris con una duplicación del intrón 6 del gen syntaxina 17, además que esta mutación se ve relacionada con otros 3 genes NR4A3 (nuclear receptor subfamily 4, group 4, member 3), TXNDC4 (thioredoxin domain-contain-4), INVS (inversina) (Moore et al., 2013; Wong et al., 2019). Se menciona la importancia de realizar histopatología de los diversos casos que se presenten porque existe variación entre los tumores los cuales pueden ser benignos o malignos (Moore et al., 2013). En otro estudio se realizó una compilación de 14 casos de melanomas metastásicos en equinos, el cual demostró una asociación entre edad y color de capa, se menciona que la edad promedio del desarrollo de las neoplasias fue de 16 años, además,

en 12 de los 14 casos, a pesar de los tratamientos con cimetidina y autovacunas, se presentó metástasis y complicaciones que iban desde ataxia hasta problemas respiratorios (MacGillivray, 2013).

Estos estudios sugieren la importancia de realizar estudios suficientes para entender el comportamiento del melanoma, para así poder desarrollar tratamientos más efectivos y así mejorar la vida de los pacientes (Moore et al., 2013).

## **2.7.-Gen WT1**

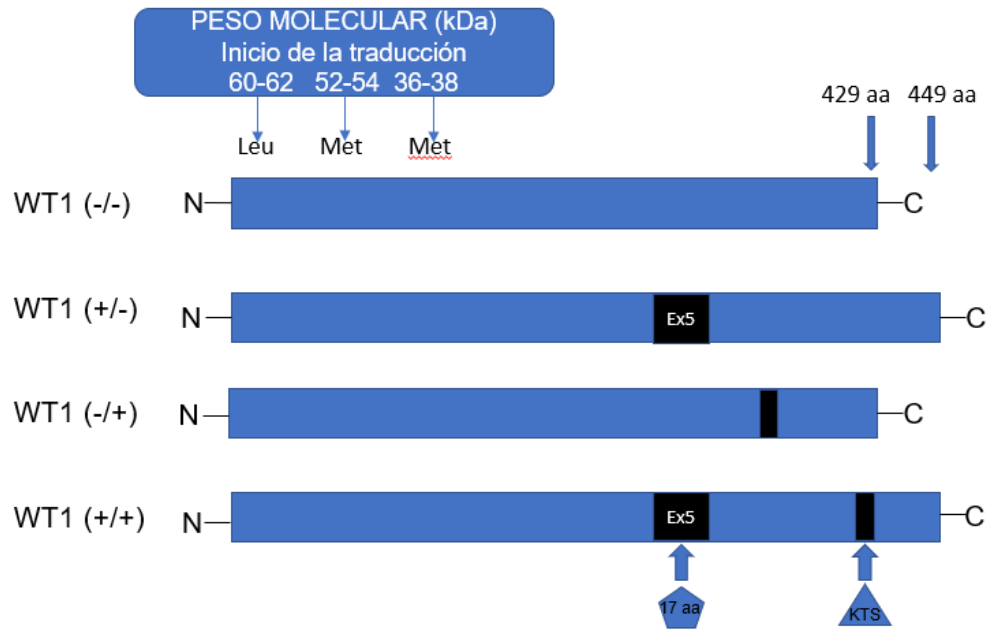
El Gen WT1 fue descubierto a partir de las evidencias de delección en el brazo corto del cromosoma 11 asociadas al síndrome WAGR (Wilm's tumour-aniridia syndrome), que es una serie de malformaciones congénitas asociadas al sistema genitourinario, retraso mental, retinoblastoma y tumor de Wilm's. El locus WT1 se localizó en posición 11p13 y su secuenciación mostró que el producto era una proteína dotada, en su extremo C-terminal, de cuatro regiones del tipo dedos de zinc, dominios con capacidad de interactuar con secuencias GC del ADN. Esta estructura es muy parecida a las descritas para los factores de transcripción de la familia de los EGR (Early Growth Response) los cuales tienen un papel fundamental en la proliferación celular y la regulación de la apoptosis, por lo tanto, se asoció a esta proteína la función de transcripción. (Carter et al., 2018; Sakamoto et al., 2009; Wagner, Panelos, Massi, & Wagner, 2008; Chápuli-Muñoz, 2003).

Existen estudios en los cuales se destaca el gen WT1 como biomarcador para el pronóstico en el desarrollo del melanoma y otros tumores, se menciona que se encontró una mayor expresión del gen WT1 en los tumores que se diagnosticaron como malignos, por medio de inmunohistoquímica y PCR-RT (Carranza-Martínez et al., 2019; Qi et al., 2015). En mamíferos este gen consta de diferentes isoformas las cuales dependen del lugar de inicio de la traducción y de la inserción de aminoácidos en el exón 5 y 9, las 2 diferentes inserciones de aminoácidos dan lugar a 4 diferentes isoformas, esto se da a partir de la inserción de 3 aminoácidos en el exón 9 que son lisina, treonina y serina (KTS) y en el exón 5 de 17 aminoácidos (Tabla 5).

**Tabla 5.- Principales isoformas por mecanismo de splicing**(Hastie, 2001, 2017)

ISOFORMA	EXON 5 (17aa)	KTS
-/- (neg/neg)	Ausente	Ausente
+/- (pos/neg)	Presente	Ausente
-/+ (neg/pos)	Ausente	Presente
+/+ (pos/pos)	Presente	Presente

Se han asociado diferentes funciones para cada una de las isoformas de WT1 y a continuación se describen: KTS +/+ : suprime la actividad del promotor del gen WT1, también suprime la transcripción de ciertos promotores modificados de PDGF-A (factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad A), KTS +/- : asociado a poco desarrollo del sistema genitourinario y desarrollo de tumores cuando se pierde la relación normal de expresión 2:1, KTS -/+ : promueve la transcripción del PDGF-A y tiene actividad supresora del crecimiento tumoral, KTS -/- : asociado al desarrollo tumoral; estas 4 isoformas pueden iniciar su traducción en diferente localización y así tener cambios en su peso molecular (Figura 3) (Hastie, 2017; Maugeri et al., 2016; Menke, Mcinnes, Hastie, & Schedl, 1998; Klamt et al., 1998):



**Figura 3.-Síntesis de las isoformas de WT1, Obtenido y traducido** (Scharnhorst, Van Der Eb, & Jochemsen, 2001)

Un estudio realizado en el año 2017 nos explica la estructura, evolución e isoformas, y ejemplifica las diferentes influencias del gen WT1 en diferentes procesos. En mamíferos existen hasta 36 isoformas de el gen WT1, pero dentro de estas cabe resaltar las isoformas +KTS/-KTS ya que experimentalmente la baja expresión de estas isoformas conlleva a muerte neonatal temprana específicamente por el desarrollo incompleto de riñones, esto en ratones. En este estudio se da hincapié a que estudios posteriores deben ser dirigidos a la dilucidar el rol biológico de las diferentes isoformas de WT1 (Hastie, 2017).

## **2.8.-Gen WT1 en equinos**

A diferencia del gen WT1 en humanos el gen WT1 en equinos se encuentra en el cromosoma 7 y cuenta con 11 exones.

En la actualidad existe una secuencia para WT1 de *Equus Caballus* reportada en el banco de genes (GENBANK) con número de acceso **XM\_023646213.1**. Se localiza en el locus SEGAF201736S con un total de 524pb. (“WT1 WT1 transcription factor [ *Equus caballus* (horse) ],” 2019).

Rangel Sánchez y colaboradores (2017) realizaron un análisis de la expresión de WT1 por inmunohistoquímica en equinos, reportando expresión en piel normal, principalmente en la epidermis, folículo piloso, glándula sudorípara y glándula sebácea, sin embargo no se observó expresión en las muestras de melanoma analizadas, lo cual se correlacionó con una expresión basal de PPARb/d en piel normal y una sobreexpresión de éste en melanoma (Rangel et al., 2017).

Existe poca información asociada del estudio del gen WT1 en equinos y por ende del rol biológico al que pudiera estar asociado, así como su semejanzas o diferencias con lo reportado en otras especies, y si pudiera existir alguna relación entre el color de capa en equinos y la expresión de este, motivo por el cual se desarrolló el presente trabajo de investigación.

### **3.-JUSTIFICACIÓN**

Actualmente la industria equina ha crecido exponencialmente, sin embargo, este crecimiento se ha visto afectado por diversas patologías incluido el cáncer, lo cual hace necesario mejorar las técnicas de diagnóstico y así poder crear tratamientos efectivos, aunado a esto los propietarios están cada vez más preocupados por el bienestar de sus caballos. Además, en la mayoría de los casos, los clínicos se limitan a realizar resecciones de los tumores y recurrir solo a los estudios histopatológicos, y debido a esto la reincidencia es común, por ejemplo, en el caso del melanoma. En el caso particular de las neoplasias en equinos hace falta sistemas de registro apropiados para conocer los verdaderos índices de cáncer.

Existe una relación directa entre 2 factores (edad y color de capa) y el desarrollo del melanoma, la cual hace necesario realizar estudios específicos para evaluar dichos factores y así entender el comportamiento del melanoma y factores genéticos que predisponen a desarrollarlo. En el caso particular del gen WT1 ha sido reconocido como biomarcador para prognosis en diversos tipos de cáncer en humanos incluyendo el melanoma, en donde a diferencia del equino, se ha investigado muy poco acerca de su rol biológico y su posible asociación con el desarrollo de cáncer.

#### **4.-HIPÓTESIS**

El gen WT1 presenta una expresión diferencial en piel sana y melanoma de equinos asociada al color de capa.

## **5.-OBJETIVOS**

### **5.1.-Objetivo general**

Analizar la expresión de WT1 en muestras de piel sana y melanomas de caballos tordillos y otros colores de capa.

### **5.2.-Objetivos específicos**

- 1.- Analizar por histopatología la morfología celular de las muestras de piel sana y melanomas de caballos tordillos y de otros colores de capa.
- 2.- Analizar la expresión de ARNm de WT1 en piel sana y melanomas de caballos tordillos y de otros colores de capa por PCR-RT.
- 3.- Analizar la presencia de la proteína WT1 en piel sana y melanomas de caballos tordillos y de otros colores de capa por inmunohistoquímica.
- 4.-Determinar la asociación entre la expresión de WT1 en muestras de piel normal y melanoma y con los diferentes colores de capa.



## **6.-MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1.-Área de trabajo**

- 1) Clubes hípicas del área metropolitana de Monterrey; Nuevo León, México.
- 2) Laboratorio de Genética de la FMVZ de la UANL.
- 3) Laboratorio de Virología de la FMVZ de la UANL.
- 4) Laboratorio de Histopatología de la FMVZ
- 5) Hospital de Grandes Especies de la FMVZ de la UANL.

### **6.2.-Animales de estudio y métodos de recolección de muestras.**

Un total de 20 caballos fueron muestreados, obteniendo 10 muestras de piel normal y 27 muestras de melanoma. El protocolo de investigación fue avalado por el Comité de Bioética de la FMVZ.

Para las muestras de piel normal se procedió previa autorización del propietario del caballo. El protocolo incluyó tranquilización del paciente con Xilazina al 10% (Xylamed, VETONE®) a una dosis de .5-1 mg/kg, posteriormente se rasuro el área y se lavó con jabón líquido y se embrocó con clorhexidina, después se realizó un bloqueo local con lidocaína al 2% (Lidocaine 2%, VETONE ®) instilando entre 2-4 ml con una aguja de calibre 23 y un largo de ½ pulgada, una vez instilado el bloqueo se procedió a realizar una incisión en ojiva para facilitar la disección y corte además que facilitó la sutura del área muestreada.

Para las muestras de melanoma que, por su localización anatómica, se pudieron realizar con el paciente de pie, se realizó el mismo procedimiento que para las muestras de piel; a excepción de algunas muestras en las cuales se tuvo que anestésiar por completo al paciente en cuyos casos después de la tranquilización se utilizó ketamina al 10% a dosis de 2 mg/kg (Clorkétam 1000 , VETONE®) y se mantuvo la anestesia con triple goteo (ketamina, xilazina y gliceril guayacol éter).

Posterior a la toma de muestras de piel normal y melanoma se cortaron a la mitad para poder ser almacenadas en un frasco con formol al 10 % para la histopatología e inmunohistoquímica y otra mitad se mantuvo en un congelador a -20 °C en el laboratorio de Genética de la FMVZ para posteriormente realizar la extracción de ARN.

### **6.3.- Histopatología**

Las muestras fijadas en formol se procesaron para encastrarse en bloques de parafina y poder realizar la tinción convencional con hematoxilina y eosina (H&E) en colaboración con el MC. Jaime Eduardo Elizondo Cantú.

### **6.4.- Inmunohistoquímica**

Las muestras encastradas en bloques de parafina se procesaron para realizar las inmunohistoquímicas correspondientes de un total de 13 muestras (5 piel normal y 8 de melanoma); se utilizó el anticuerpo monoclonal WT1 (F-6): sc-7385 (Santa Cruz Biotechnology); todo el procedimiento se realizó, en colaboración con el departamento de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL.

### **6.5.- PCR-RT con SYBR Green**

Las muestras que fueron congeladas se movieron con 12 horas de anticipación a un refrigerador a 5° C para realizar la extracción de ARN.

#### **6.5.1.- Extracción ARN método Trizol ® (Invitrogen)**

Para la extracción de ARN se pesaron 200 mg de muestra, después se colocaron en un mortero, se añadió nitrógeno líquido al mortero cubriendo la muestra (individualmente) para congelarla y poder pulverizarla manualmente, se añadió 1 ml de trizol al mortero por cada 200 mg de muestra pulverizada y se dejó reposar en la campana por 30 minutos, después se pasó el remanente de trizol/muestra a un tubo eppendorf evitando los remanentes grandes de la muestra, se añadieron 200 µl de cloroformo al tubo eppendorf y se sometieron a vortex por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente se centrifugaron a 16,000 RPM por

5 minutos a 4 °C, después se extrajo la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo al cual se le añadió 500 µl de isopropanol y se realizó inversión 10 veces, después se centrifugó a 16,000 RPM por 10 minutos a 4°C, una vez que se terminó de centrifugar se decantó el isopropanol manualmente, una vez decantado del isopropanol se añadió 1 ml de etanol (80%) y se le dio vortex 3 segundos, después se centrifugó a 16,000 RPM por 5 minutos a 4°C, posteriormente se decantó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente dentro de la campana, por último se añadieron 20 µl de agua ultrapura DEPC y se incubaron en termoblock a 55°C por 10 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 3-4 minutos y después se almacenaron en congelador a -150°C.

### **6.5.2 Síntesis de ADNc**

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit comercial ImProm-II ® Reverse Transcription System (Promega ®), primero se realizó un proceso de desnaturalización en el cual se preparó un mix en tubos eppendorf individuales que consistió de 2 µl de ARN, 1µl Oligo dT (primer), 1µl de Random Primer y 1 µl de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 5 µl, este mix se precalentó a 70°C por 5 minutos, se enfrió por 5 minutos en refrigerador a 5°C y se centrifugó 10 segundos (1-10,000 RPM); se mezcló otro mix que incluyó 4 µl de Buffer 5x, 2.5 µl de MgCl, 1 µl de dNTP mix, 20 U (.5 µl) inhibidor de ribonucleasas, 1µl de Transcriptasa reversa y 6 µl de H<sub>2</sub>O resultando un volumen final de 15 µl, a este preparado se le agregan los 5 µl del mix ARN sumando una mezcla de 20 µl la cual se centrifugó por 5 segundos (1-4500 RPM) y se incubó en el termociclador a 25 °C por 5 minutos, 42°C por 1 hora y finalmente a 70°C 15 minutos, se almacenó a -5°C.

### 6.5.3.-PCR-RT

Para el proceso de amplificación se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (tabla 6):

**Tabla 6.- Oligonucleótidos utilizados para PCR-RT**

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS
WT1	F 5' GAGAAACCATACCAGTGTGA 3' R 3' CTAACAATGTGGGAGCATCA 5'
$\beta$ -actina	F 5' TAAGGACCTGTACGCCAACACAGT 3' R 3' ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT 5'

Antes de colocar las muestras para su amplificación por PCR-RT se hizo una mezcla con SYBR Green (SYBR ® Green, PCR Master Mix, AB Applied Biosystems), cada mezcla consistió de 10  $\mu$ l SYBR Green, 0.5  $\mu$ l del primer forward (F) y 0.5  $\mu$ l del primer reverse (R), 7  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y por último 2  $\mu$ l de ADNc a una concentración de 250 ng/ $\mu$ l, para obtener una mezcla total de 20  $\mu$ l. Una vez colocadas las muestras en el bloque se procedió a introducirlas al equipo de PCR-RT (7500 Real Time PCR System, applied biosystems), para WT1 y  $\beta$ -actina se realizó bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos, fase de retención 50°C por 2 minutos y 95°C por 10 minutos, posteriormente la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C por 15 segundos y 58°C por 60 segundos, para las fase de extensión 95°C por 15 segundos, después 60°C por 60 segundos, 95°C por 30 segundos y por último 60°C por 15 segundos. Para las 2 isoformas que se analizaron el único cambio fue la temperatura de alineación, 60°C para isoforma KTS y 57.5°C para Exón 5.

### 6.6.-Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía con una comparación de medias con test de tukey tomando una significancia de  $p < 0.05$  utilizando el software Mintab 17 (Minitab Statistical Software).

## 7.-RESULTADOS

### 7.1.-Análisis de los datos de las muestras recolectadas.

Se recolectaron un total de 37 muestras, 10 de piel normal de las cuales se recolectaron 6 por debajo de la crin y 4 de otras de áreas, y 27 de melanomas las cuales en su mayoría fueron recolectadas del área perianal y el maslo de la cola (Tabla 7)., aunado a esto es importante mencionar que hubo variación en los melanomas principalmente en el tamaño y la pigmentación (Figura 4).

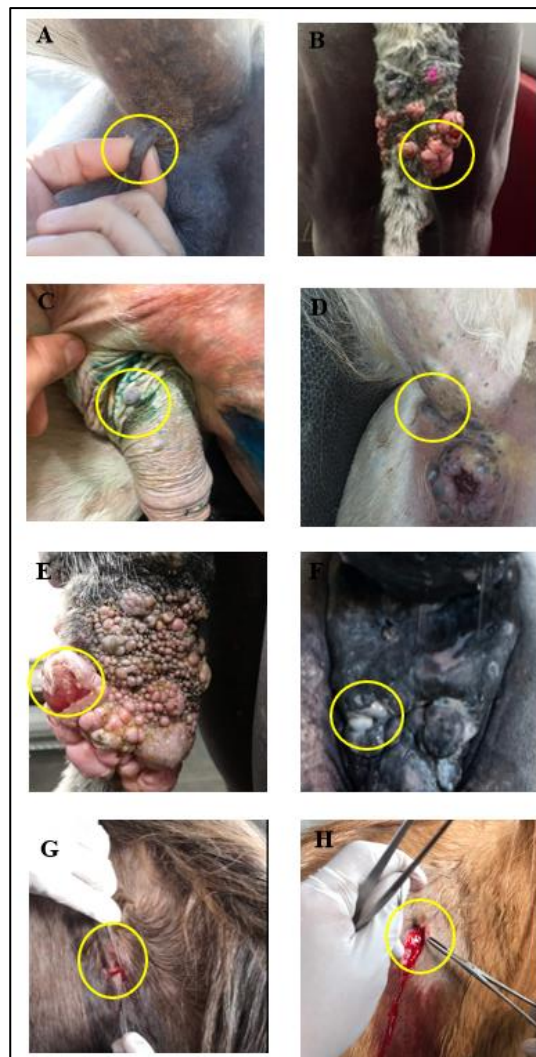
**Tabla 7- Datos de pacientes y muestras tomadas. \*PN: piel normal, MEL: melanoma, S: sexo, E: edad, R: raza**

DATOS DEL PACIENTE	COLOR DE CAPA	TIPO DE MUESTRA	# DE MUESTRAS TOMADAS	LOCALIZACIÓN ANATOMICA DE LA MUESTRA
S: Macho entero E: 3 años R: ¼ milla	Alazán	PN	1 (P1)	Área escrotal
S: Yegua E: 1 año R: Frisian/Shire	Prieta	PN	1 (P2)	5 cm de línea alba (abdominal)
S: Macho entero E: 4 años R: ¼ milla	Prieto	PN	1 (P3)	Área escrotal
S: Macho entero E: 8 años R: Frisian	Prieto	PN	1 (P4)	5 cm de línea alba (abdominal)
S: Macho entero E: 10 años R: Ibérico	Albino	PN	1 (P5)	10 cm por debajo de la crin
S: Macho entero E: 3 años R: ¼ milla	Moro	PN	1 (P6)	10 cm por debajo de la crin
S: Macho castrado E: 18 años R: ¼ milla	Bayo	PN	1 (P7)	10 cm por debajo de la crin

S: Yegua E: 1 año R: ¼ milla	Alazana	PN	1 (P8)	10 cm por debajo de la crin
S: Yegua E: 10 años R: ¼ milla	Tordilla	PN	1 (P9)	10 cm por debajo de la crin
S: Yegua E: 3.5 años R: ¼ milla	Moro/carbonero	PN	1 (P10)	10 cm por debajo de la crin
S: Yegua E: 14 años R: ¼ milla	Tordilla	MEL	2 (M1, M2)	Maslo de la cola
S: Yegua E: 18 años R: ¼ milla	Tordilla	MEL	5 (M3, M4, M5, M6, M7)	Área perianal, incluyendo 1 del esfínter anal
S: Macho entero E: 10 años R: ¼ de milla	Cremello	MEL	1 (M8)	Prepucio
S: Macho castrado E: 16 años R: ¼ milla	Tordillo	MEL	1 (M10)	Parte posterior de la escápula
S: Macho entero E: 10 años R: Ibérico	Albino	MEL	3 (M9, M11, M12)	Base de la cola y esfínter anal
S: Macho castrado E: 14 años R: ¼ milla	Tordillo	MEL	2 (M13, M14)	Tercio medio de la cola
S: Macho castrado E: 18 años R: ¼ milla	Tordillo	MEL	4 (M15, M16, M17, M18)	Tercio distal de la cola y área perianal
S: Macho castrado E: 16 años R: Ibérico	Tordillo	MEL	5 (M19, M20, M21, M22, M23)	Tercio distal de la cola, tercio medio de la cola y área perianal

S: Yegua E: 13 años R: Appendix	Tordilla	MEL	1 (M24)	Base de la cola
S: Yegua E: 12 años R: ¼ milla	Tordilla	MEL	3 (M25, M26, M27)	Área perianal y base de la cola

En la figura 4 se muestran algunas imágenes de los diferentes lugares anatómicos del caballo de los cuales se recolectaron las muestras de piel normal y melanomas, en las imágenes también se pueden observar la diferencia de estadios del melanoma (Figura 4).

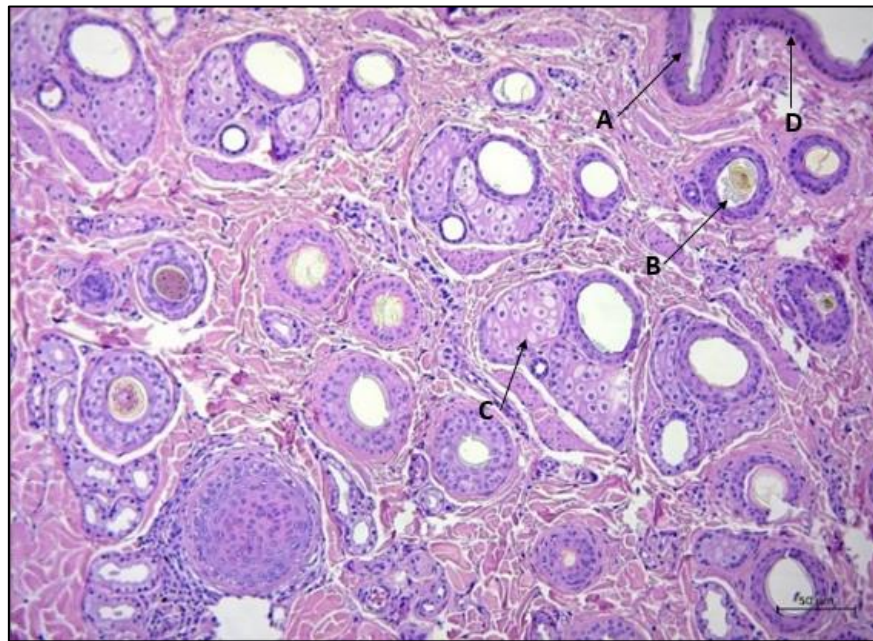


**Figura 4.-** Imágenes de la recolección de muestras. A) Melanoma (2cm<sup>2</sup>), B) Melanoma con pigmentación central, C) Melanoma en caballo albino, D) Melanoma con pigmentación mixta, E) Melanoma fistulado, F) Melanoma plano, G) Muestra de piel caballo moro carbonero, H) Muestra de piel caballo bayo. Se ha colocado una marca amarilla señalando el lugar de resección.

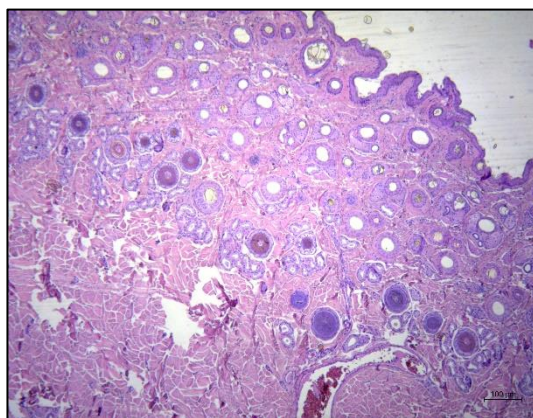


### 7.1.1.-Histopatología en muestras de piel

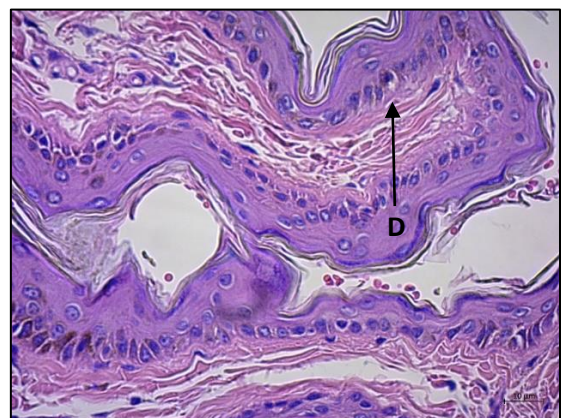
Las muestras de piel normal analizadas mostraron patrones histológicos normales como se describe en la figura 5 además se muestran micrografías de la muestra de piel normal en aumento 4X, 10X y 40X (imágenes obtenidas mediante cámara AxioCam Erc; ZEN 3.2 lite; Laboratorio de Histopatología de la FMVZ) (Figura 5):



10X



A) 4X



B) 40X

**Figura 5.- Muestra de piel normal, 4X, 10X y 40X. Señalizados con flecha negra: A) Epidermis, B) Folículo piloso, C) Glándula sebácea, D) Melanocito**



### 7.1.2.-Histopatología en muestras de melanoma

Las muestras de melanoma analizadas mostraron diferencias histológicas entre sí y en comparación con las muestras de piel normal. Se diagnosticaron diferentes tipos de melanomas siendo 8 muestras de melanoma de morfología poligonal las cuales presentaron diferencias en la muestra (tumor) de tamaño y pigmentación, 1 muestra de melanoma de células elongadas y 1 muestra de melanoma amelanico de células elongadas (Tabla 8). En relación al color de capa, los caballos tordillos tienden a desarrollar melanomas más pigmentados (más del 75% de melanina) y de mayor tamaño (superiores a 5cm<sup>2</sup>).

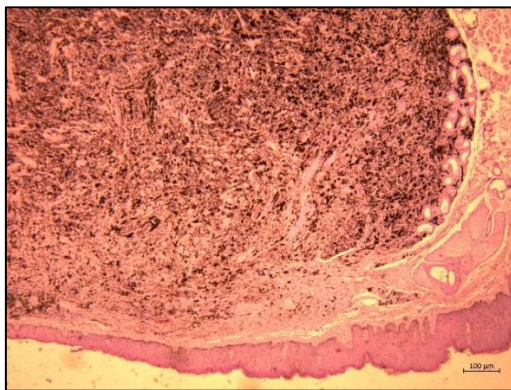
**Tabla 8.- Diagnóstico histopatológico de las muestras de melanoma**

PACIENTE	COLOR DE CAPA	# DE MUESTRAS	DIAGNÓSTICO
S: Yegua E: 14 años R: ¼ milla	Tordilla	2 (M1, M2)	Melanoma
S: Yegua E: 18 años R: ¼ milla	Tordilla	5 (M3, M4, M5, M6, M7)	Melanoma
S: Macho entero E: 10 años R: ¼ de milla	Cremello	1 (M8)	Melanoma
S: Macho castrado E: 16 años R: ¼ milla	Tordillo	1 (M10)	Melanoma
S: Macho entero E: 10 años R: Ibérico	Albino	3 (M9, M11, M12)	Melanoma de células elongadas
S: Macho castrado E: 14 años R: ¼ milla	Tordillo	2 (M13, M14)	Melanoma amelanico de células elongadas
S: Macho castrado E: 18 años R: ¼ milla	Tordillo	4 (M15, M16, M17, M18)	Melanoma
S: Macho castrado	Tordillo	5	Melanoma

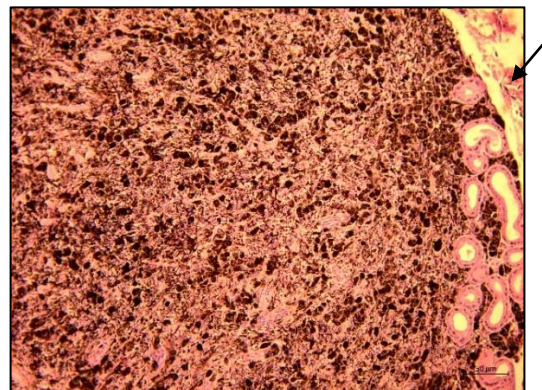
E: 16 años R: Ibérico		(M19, M20, M21, M22, M23)	
S: Yegua E: 13 años R: Appendix	Tordilla	1 (M24)	Melanoma
S: Yegua E: 12 años R: ¼ milla	Tordilla	3 (M25, M26, M27)	Melanoma

A continuación, se muestran secciones histológicas de 4 muestras de melanoma representativas. Se observaron diferencias macroscópicas en los tumores de los cuales se obtuvieron las laminillas y también cambios histológicos en cuanto a pigmentación, patrón de melanina, conformación celular y distribución de la matriz extracelular (Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9)

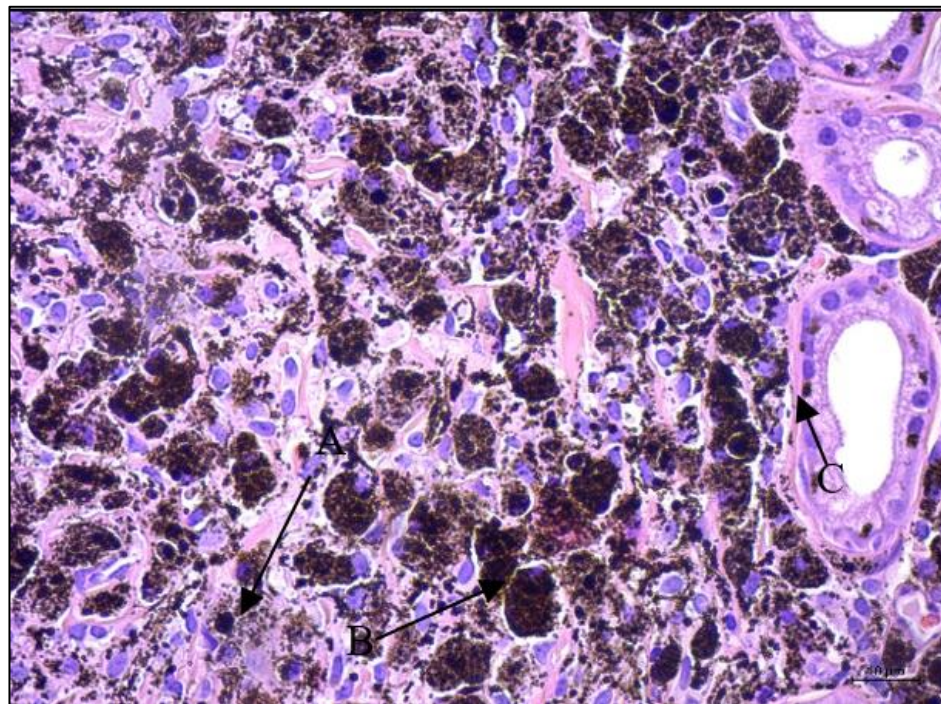
En las secciones histológicas se muestra una neoplasia delimitada en la dermis pero sin encapsular, conformada por la proliferación de melanocitos de morfología poligonal/fusiforame de citoplasmas con presencia de melanina y núcleos centrales ovoides, de cromatina morada pálida. Las células se organizan en mantos, agregados o láminas. No se reconocen mitosis. Melanoma de células poligonales (Figura 6):



4X



10X

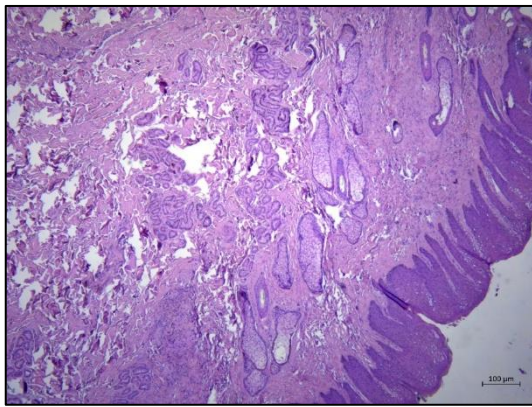


40X

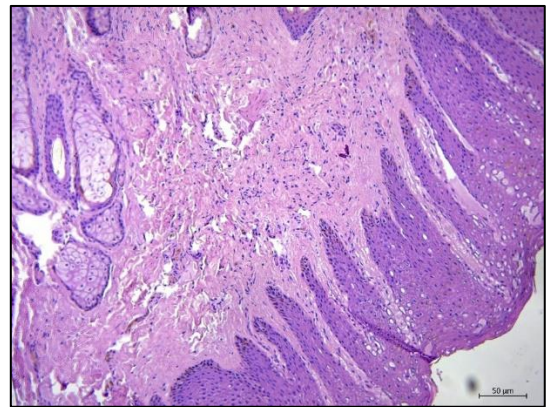
**Figura 6.- Melanoma de células poligonales, 4x, 10X, 40X. Señalizados con flecha negra: A) Queratinocito con melanina en citoplasma y núcleo, B) Melanocito con melanina en citoplasma y núcleo (ovoide), C) Glándula con presencia de melanina.**



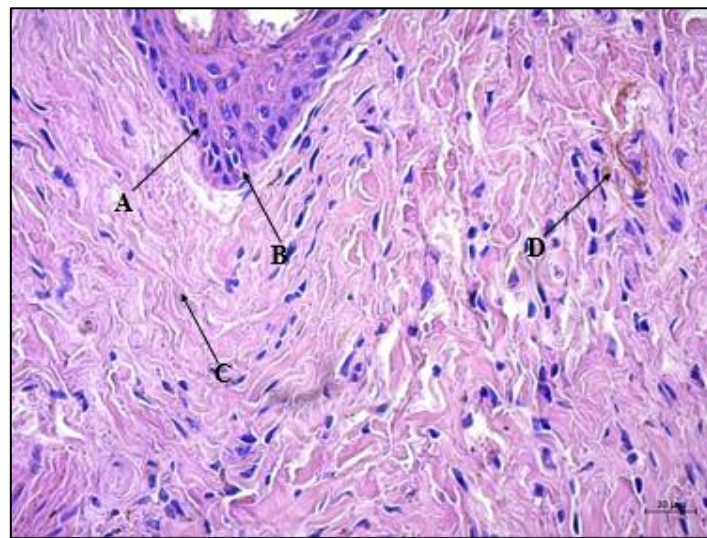
En las secciones histológicas se muestra una neoplasia escasamente delimitada en la dermis, conformadas por la proliferación neoplásica de melanocitos de morfología fusiforme/elongada de citoplasmas eosinófilos de bordes indistintos con escaso pigmento de melanina, núcleos alargados hipercromáticos relativamente uniformes, algunas células exhiben cariomegalia. Las células se organizan en torrentes, mantos, arremolinados o empalizada y están sostenidos por escasa matriz extracelular colagenoide, logran invadir fascículos de músculo estriado. No se reconocen mitosis. Melanoma de células elongadas (Figura 7):



4X



10X



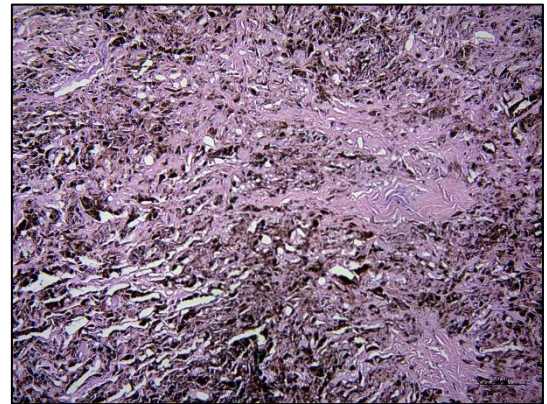
40X

**Figura 7.- Melanoma de células elongadas, 4X, 10X, 40X. Señalizados con flecha A) Queratinocito con escasa melanina, B) Melanocito con escasa melanina, núcleo elongado, C) Matriz colagenoide, D) Presencia de melanina difusa**

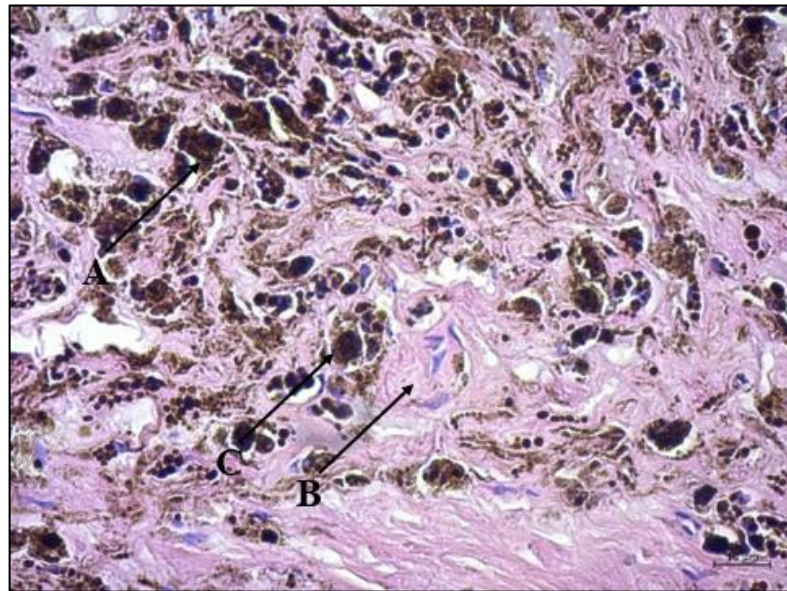
En las secciones histológicas se muestra una neoplasia escasamente delimitada, conformadas por la proliferación de melanocitos de morfología poligonal/fusiforme de citoplasmas con melanina y núcleos alargados de cromatina pálida morada, muchos oscurecidos por la melanina. Las células se organizan principalmente en pequeños agregados sostenidos por una matriz extracelular colagenoide. No se reconocen mitosis. Melanoma (Figura 8):



4X



10X

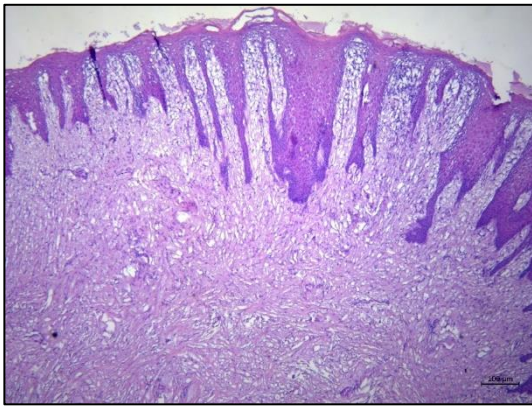


40X

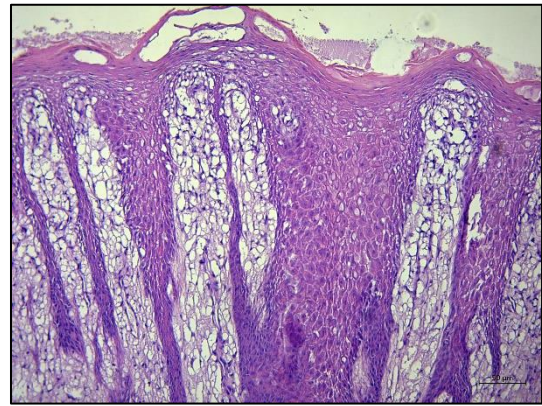
**Figura 8.- Melanoma, 4X, 10X, 40X. Señalizados con flecha negra: A) Agregados melanocíticos, B) Matriz colagenoide, C) Melanocito**



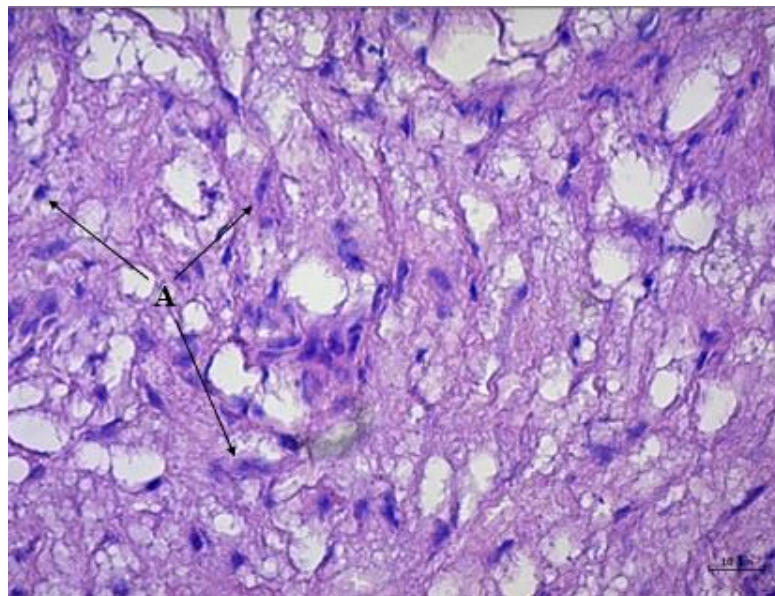
En las secciones histológicas se muestra una neoplasia delimitada en la dermis, pero sin encapsular conformadas por la proliferación de melanocitos fusiformes/elongados de citoplasmas eosinófilos de bordes indistintos, sólo algunos pigmentados con melanina, de núcleos alargados hipercromáticos relativamente uniformes. Las células se organizan en torrentes y están embebidas en una matriz extracelular colagenoide en algunas áreas ligeramente basófila. No se reconocen mitosis. Melanoma amelánico de células elongadas (Figura 9):



4X



10X



40X

**Figura 9.- Melanoma amelánico de células elongadas, 4X, 10X, 40X. Señalizado con flecha negra A) Melanocitos con bordes indistintos, no pigmentados con núcleos alargados.**

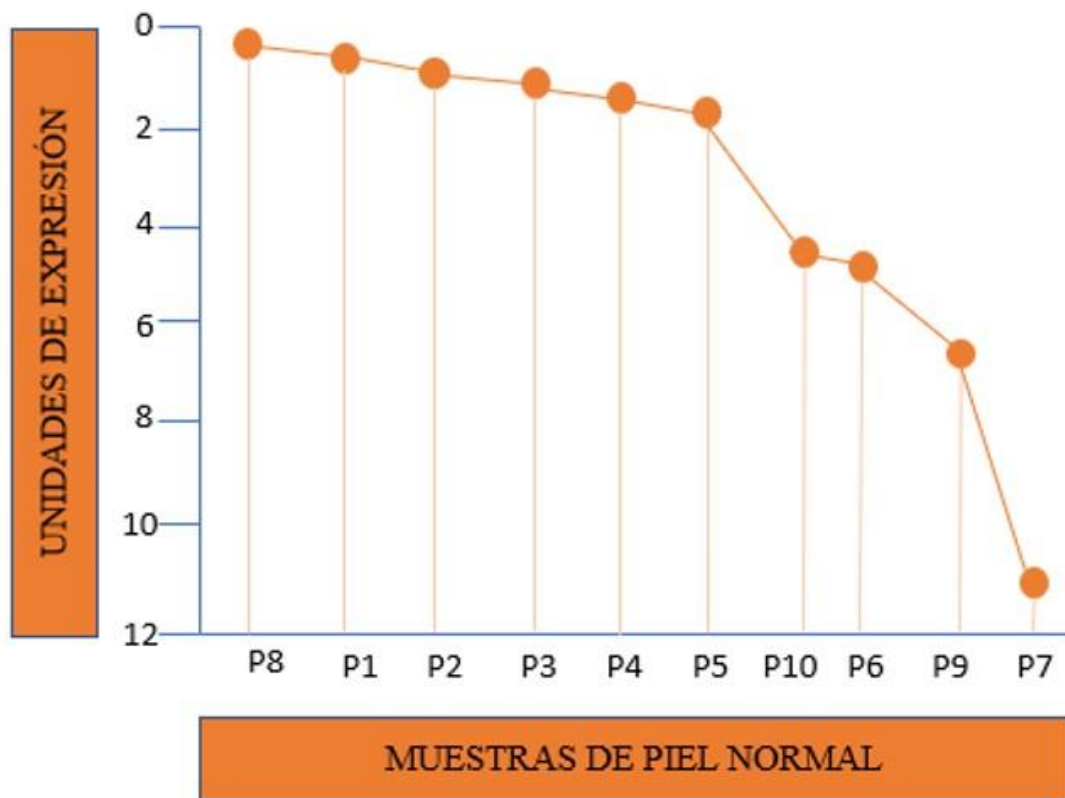
## 7.2.-Análisis de la expresión del ARNm de WT1

Los datos obtenidos por este análisis fueron sometidos al método  $2^{\Delta\Delta Ct}$  para medir la expresión del ARNm de WT1, utilizando como gen constitutivo  $\beta$ -actina, con los resultados obtenidos pudimos detectar la expresión de WT1 en el 100% de las muestras de piel normal y melanoma equino analizadas (Tabla 9), detectándose diferencias en las unidades de expresión relativa entre las muestras de piel normal y melanoma, encontrándose mayor expresión en las muestras de piel normal.

**Tabla 9.-Resultados del análisis  $2^{\Delta\Delta Ct}$  de piel normal y melanoma. Los mayores índices de expresión se observaron en piel normal en comparación con los de melanoma.**

<b>MUESTRA DE PIEL</b>	<b>UNIDADES DE EXPRESIÓN RELATIVA (Mayor a menor)</b>	<b>MUESTRA DE MELANOMA</b>	<b>UNIDADES DE EXPRESIÓN RELATIVA (Mayor a menor)</b>
P8	0.04572	M15	0.15713
P1	0.06004	M26	0.29059
P2	0.39862	M3	0.37607
P3	0.47734	M7	0.50666
P4	0.69500	M5	0.93374
P5	1.82525	M4	1.2844
P10	4.42322	M22	1.4192
P6	4.63028	M21	1.4430
P9	6.445805	M1	1.5423
P7	11.40899	M11	1.7901
		M27	4.1991
		M2	5.0880
		M17	6.0590
		M24	6.9600

Dentro del grupo de muestras de piel normal se observó una asociación entre la edad, el color de capa y la expresión de WT1, sugiriendo que el caballo expresará más WT1 a edad joven (1-4 años) y con una tonalidad oscura, y menos expresión de WT1 a edad adulta (>6 años) y tonalidades claras (Figura 10).

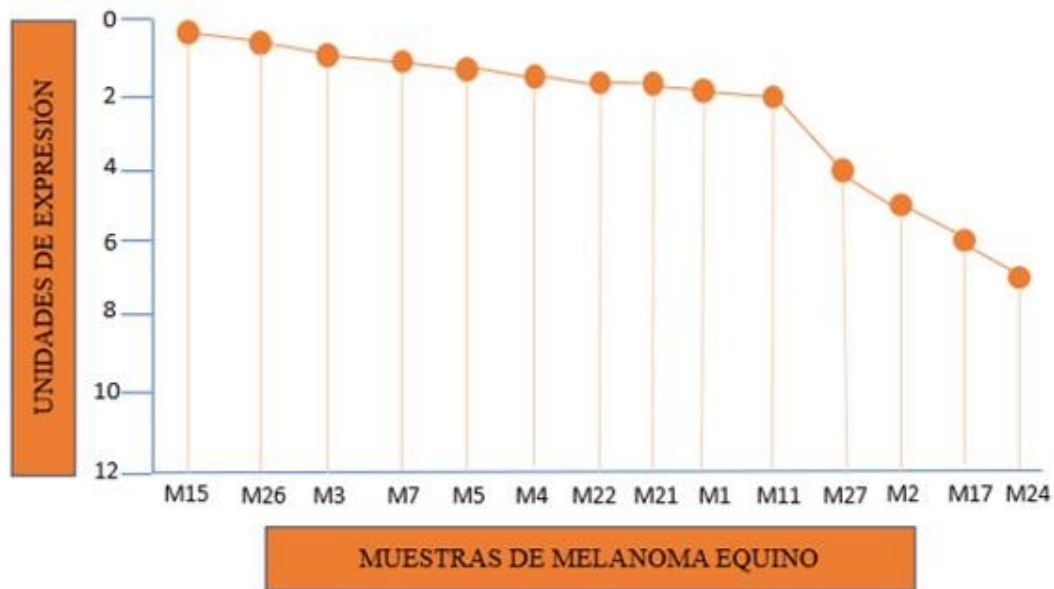


P8	P1	P2	P3	P4	P5	P10	P6	P9	P7
S: Yegua alazana	S: Macho alazán	S: Yegua prieta	S: Macho prieto	S: Macho prieto	S: Macho albino	S: Yegua mora	S: Macho moro	S: Yegua tordilla	S: Macho bayo
E: 1 año	E: 3 años	E: 1 año	E: 4 años	E: 8 años	E: 10 años	E: 3.5 años	E: 3 años	E: 10 años	E: 18 años
UER: 0.04572	UER: 0.06004	UER: 0.39862	UER: 0.47734	UER: 0.69500	UER: 1.82525	UER: 4.42322	UER: 4.63028	UER: 6.45805	UER: 11.40899

Figura 10.- Análisis PCR-RT de muestras de piel normal. Asociación de edad y color de capa.



Dentro del grupo de muestras de melanoma se observó una asociación en el tamaño del melanoma, los tumores mas pequeños (2 cm<sup>2</sup>) mostraron los mayores índices de expresión de WT1 y los tumores de mayor tamaño (>4 cm<sup>2</sup>) mostraron los índices mas bajos de expresión de WT1, aunado a esto se también se observó que entre mayor pigmentación del tumor menor expresión de WT1 (Figura 11).



M15	M26	M3	M7	M5	M4	M22	M21	M1	M11
UER: 0.15713 Tumor con baja pigmentación, 2 cm <sup>2</sup>	UER: 0.29059 Tumor con pigmentación mixta (30% melanina), 1.5 cm <sup>2</sup>	UER: 0.37607 Tumor pigmentado, 2cm <sup>2</sup>	UER: 0.50666 Tumor pigmentado, 2cm <sup>2</sup>	UER: 0.93374 Tumor pigmentado, 2.5 cm <sup>2</sup>	UER: 1.2844 Tumor pigmentación mixta (70% melanina), 3 cm <sup>2</sup>	UER: 1.4192 Tumor pigmentado, 3 cm <sup>2</sup>	UER: 1.4430 Tumor pigmentación mixta (60% melanina), 3.5 cm <sup>2</sup>	UER: 1.5423 Tumor totalmente pigmentado, 2.5 cm <sup>2</sup>	UER: 1.7901 Tumor pigmentación mixta, 2.5 cm <sup>2</sup>
M27	M2	M17	M24						
UER: 4.1991 Tumor muy pigmentado, 3 cm <sup>2</sup>	UER: 5.0880 Tumor muy pigmentado, 3.5 cm <sup>2</sup>	UER: 6.0590 Tumor con mucha pigmentación, 5 cm <sup>2</sup>	UER: 6.9600 Tumor totalmente pigmentado, 4cm <sup>2</sup>						

Figura 11.- Análisis PCR-RT de muestras de melanoma equino. Asociación de tamaño de tumor y pigmentación.

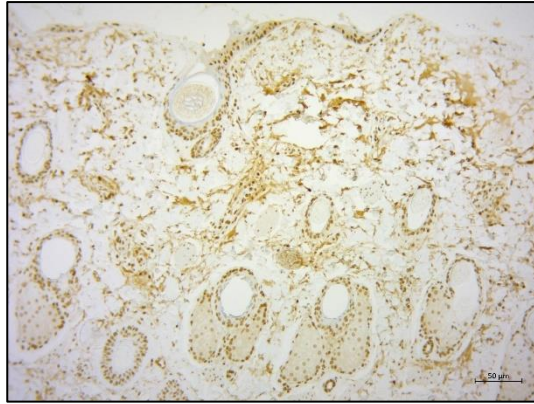
### 7.3.-Análisis por inmunohistoquímica

Se analizaron un total de 13 muestras de las cuales 4 son de piel normal y 9 de melanoma.; para la interpretación de las inmunohistoquímicas se evaluó en una escala de índice de positividad (Tabla 10).

**Tabla 10.-Índice de expresión de WT1 en inmunohistoquímica**

<b>POSITIVIDAD</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
-	Negativo
+	Poca expresión positiva
++	Expresión moderada positiva
+++	Expresión altamente positiva

Los resultados de las inmunohistoquímicas en muestras de piel normal y melanoma equino se realizaron utilizando el anticuerpo monoclonal para WT1 (F-6): sc-7385 (Santa Cruz Biotechnology), con sistema de detección optiview en un equipo automático BENCHMART XT (VENTANA). Se obtuvieron resultados positivos en todas las muestras analizadas. Las imágenes fueron capturadas con AxioCam Erc; ZEN 3.2 lite; (Laboratorio de Histopatología de la FMVZ). Se encontró una expresión de moderada a alta de la proteína de WT1 en las muestras de piel normal en la mayoría de los componentes celulares: epidermis, núcleo, citoplasma y glándula sebácea. A continuación, se muestran las micrografías de inmunohistoquímicas de piel normal (Figura 12 a Figura 15). En relación al color, las muestras con mayor positividad a WT1 en las muestras de piel normal, en todos los componentes celulares, fueron las provenientes de caballos con tonos oscuros.

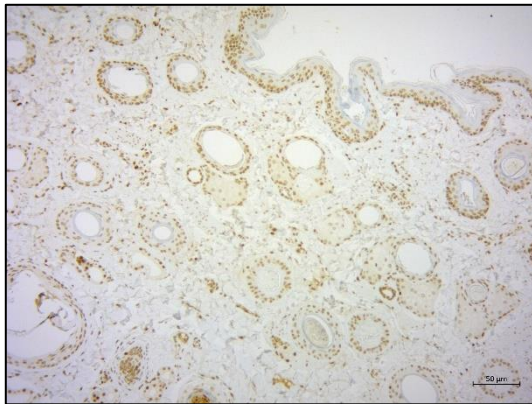


10X

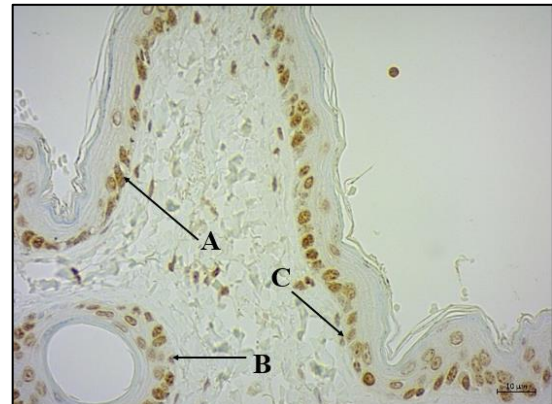


40X

**Figura 12.- Piel normal (P6) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) nuclear(A), positividad (++) citoplasmática en epidermis (A) y epitelio sudoríparo (B)**

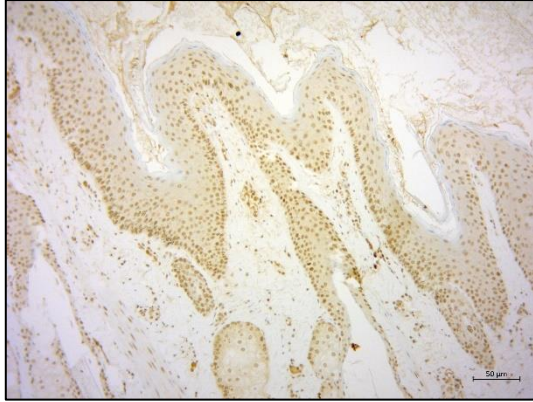


10X



40X

**Figura 13.- Piel normal (P7) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++ a +++ nuclear (A) y citoplasmática (A), epitelio de epidermis, epitelio apócrino (B) y epitelio folicular, positividad (+ a ++) en algunas células endoteliales vasculares (C).**

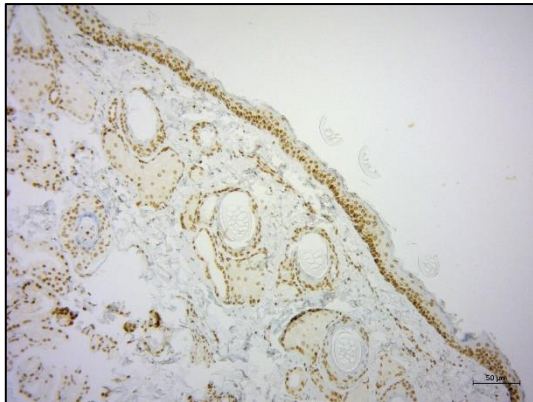


10X

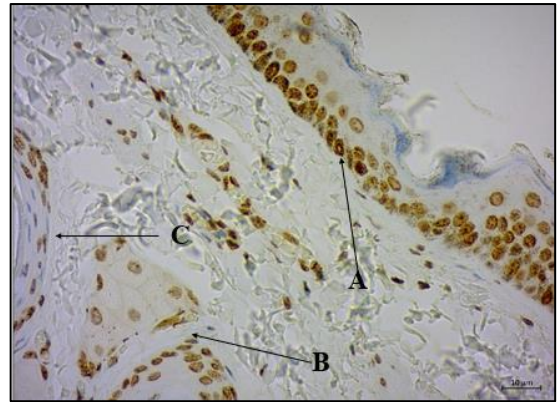


40X

**Figura 14.- Piel normal (P8) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) nuclear (A) y citoplásmica (A), en epitelio de epidermis (B) y folicular (C).**



10X



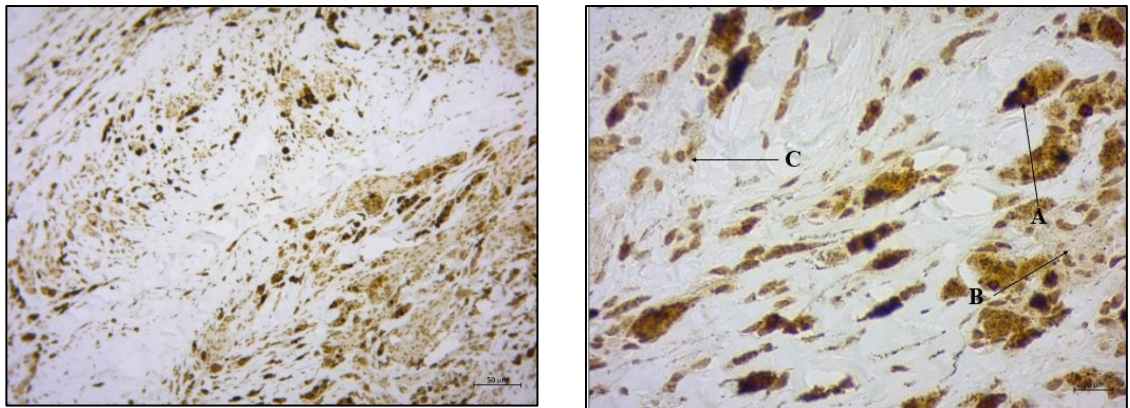
40X

**Figura 15.- Piel normal (P9) 10X y 40X. señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) nuclear (A) y citoplásmica(A), epitelio sudoríparo (B), epitelio folicular (C).**



En las muestras de melanoma se observaron diferentes grados de positividad a la proteína de WT1. En los tumores no mayores a 2cm<sup>2</sup> se observó expresión de moderada a alta en comparación con las muestras de tumores de mayor tamaño, estos tuvieron una expresión de moderada a leve en citoplasma; las muestras de melanomas amelanocíticos expresaron positividad leve. En relación al color, los melanomas que se desarrollaron en caballos de capa clara mostraron menor positividad a WT1 en comparación con los melanomas de caballos tordillos.

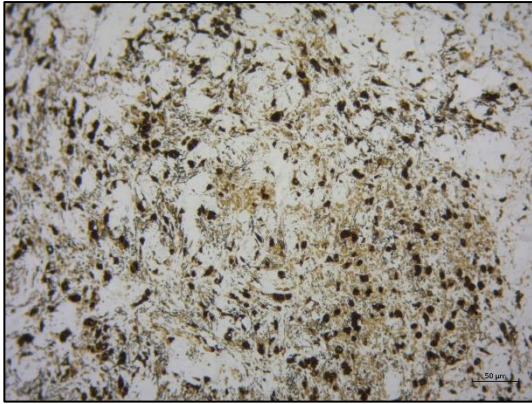
A continuación, se muestran las inmunohistoquímicas de melanoma equino (Figura 16 a Figura 24).



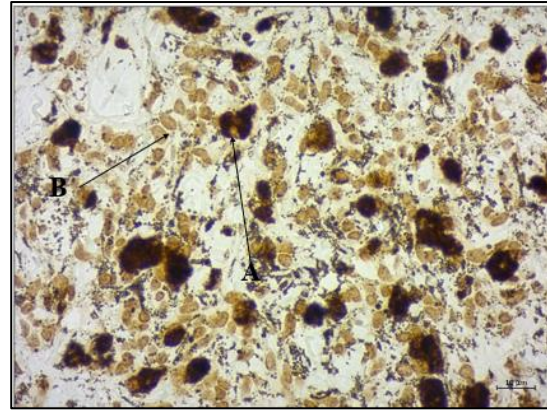
10X

40X

**Figura 16.- Melanoma (M24) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en todos los componentes, epidermis (C), epitelio sudoríparo (B), el patrón es nuclear y citoplásmico en melanocitos malignos (A).**

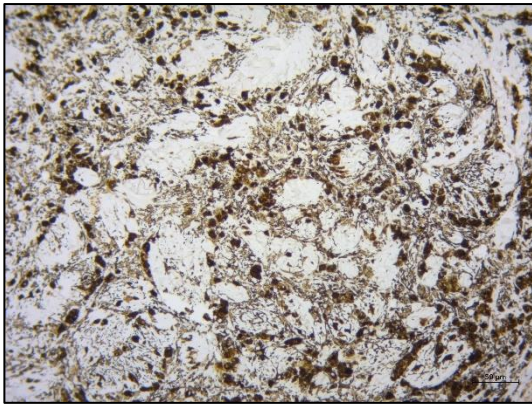


10X

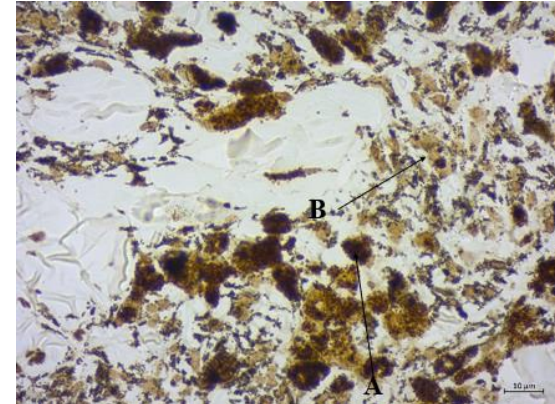


40X

**Figura 17.- Melanoma (M25) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (++) en epidermis (B), positividad (+++) en melanocitos malignos (A) el patron es nuclear y citoplásmico.**



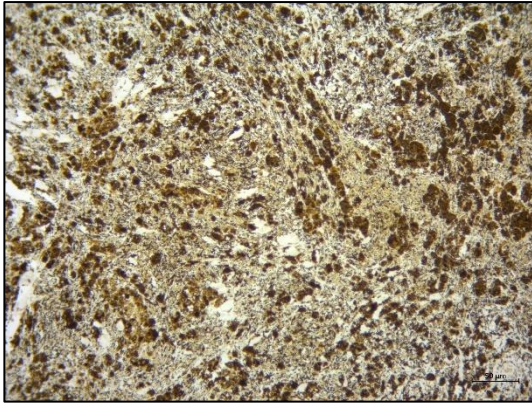
10X



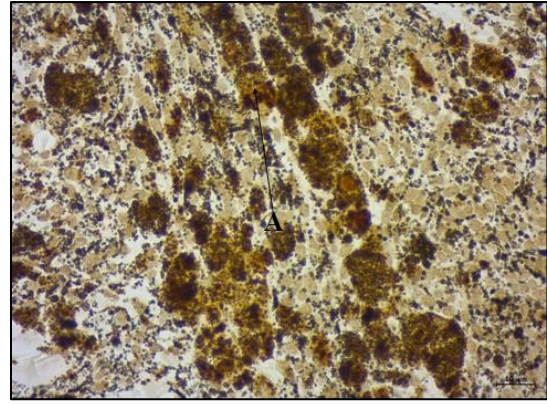
40X

**Figura 18.- Melanoma (M26) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epidermis (B) y epitelio sudoríparo, positividad (+++) en melanocitos malignos (A) patrón nuclear. y citoplasmático.**



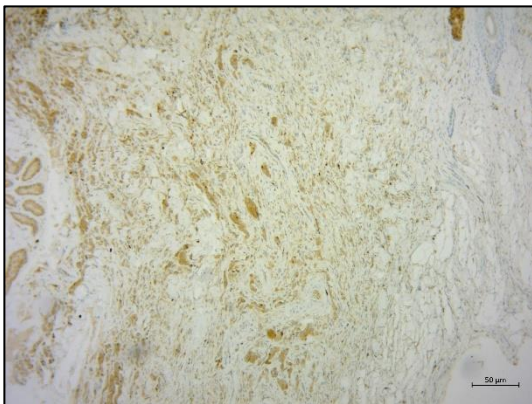


10X

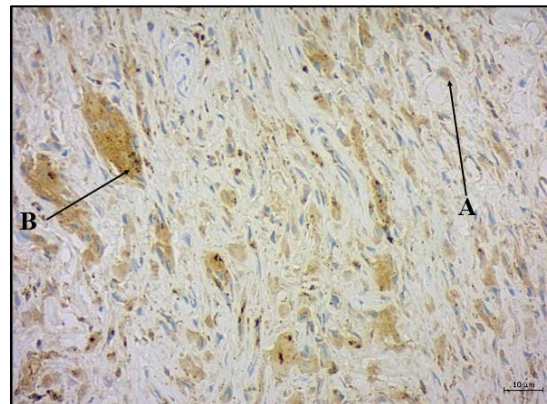


40X

**Figura 19.- Melanoma (M27) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epidermis y epitelio sudoríparo, positividad (+++) en melanocitos malignos (A) patron nuclear y citoplasmático**

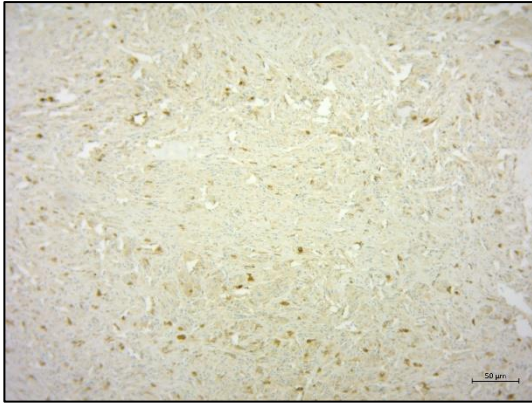


10X

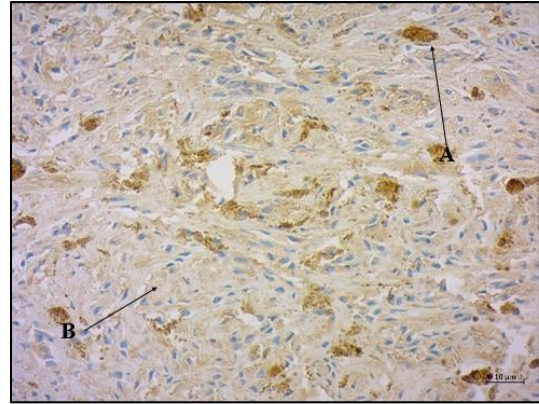


40X

**Figura 20.- Melanoma (M11) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+++) en epitelio sudoríparo (B), positividad (+) en queratinocitos epidérmicos, positividad (+ a ++) en los melanocitos malignos (A), patron únicamente citoplásmico.**

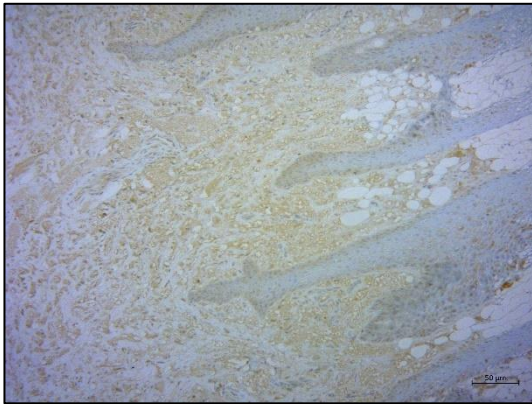


10X

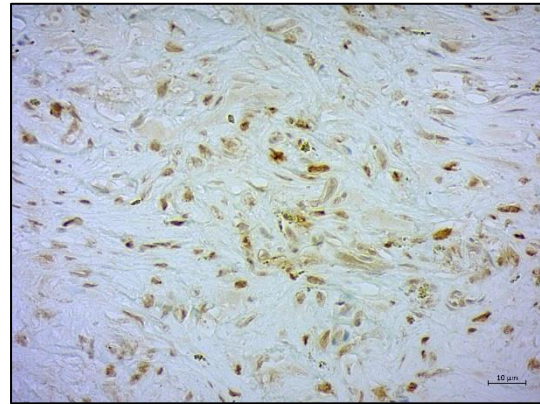


40X

**Figura 21.- Melanoma (M12) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epidermis (B), positividad (++) en epitelio sudoríparo, positividad citoplasmática (+) en melanocitos malignos fusiformes, positividad citoplasmática (++) en melanocitos malignos poligonales (A).**



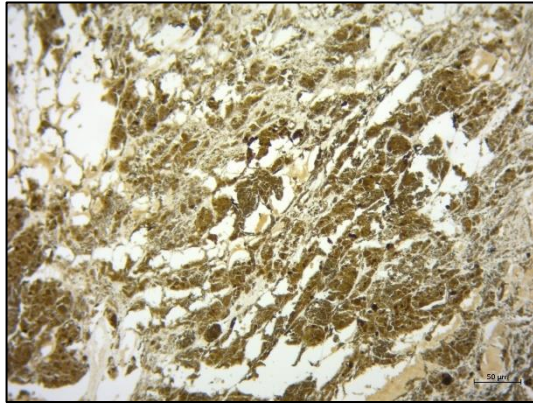
10X



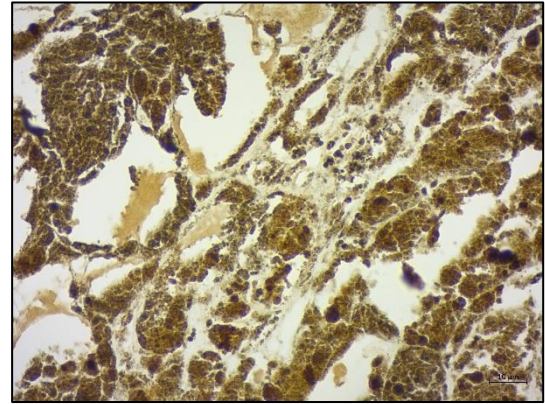
40X

**Figura 22.- Melanoma (M14) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra negativo en epidermis, positividad (- a +) citoplasmática en melanocitos.**



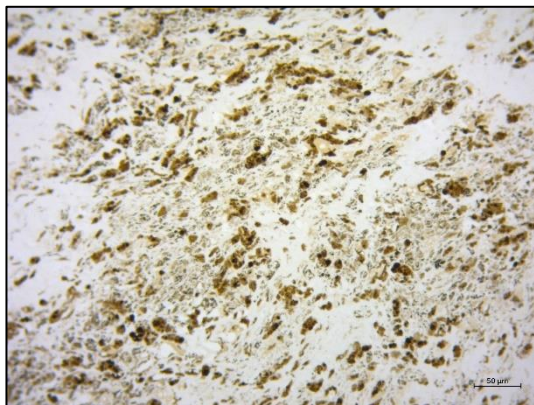


10X

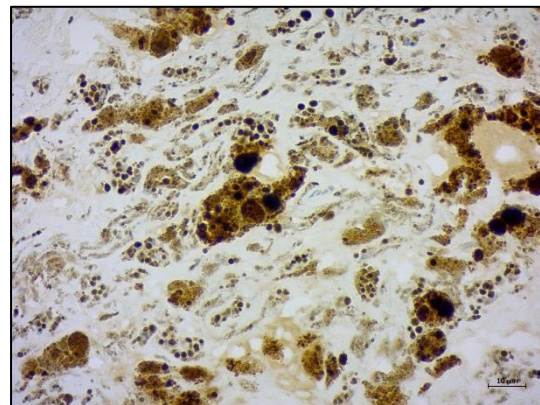


40X

**Figura 23.- Melanoma (M15) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epitelio de epidermis, positividad (+++) en citoplasma y núcleo de melanocitos malignos.**



10X



40X

**Figura 24.- Melanoma (M19) 10X y 40X: señalizada con flechas negras se muestra positividad (+) en epidermis y epitelio sudoríparo, positividad (+++) citoplasmática en melanocitos malignos.**

**Tabla 11.-Recopilación de las interpretaciones de inmunohistoquímicas en melanoma equino.**

MUESTRA DE PIEL	INTERPRETACIÓN
M24	-Positividad (+++) en todos los componentes, epidermis, epitelio sudoríparo, el patron es nuclear y citoplásmico en melanocitos malignos.
M25	-Positividad (++) en epidermis, positividad (++) y (+++) en melanocitos malignos, el patron es nuclear y citoplásmico.
M26	-Positividad (+++) en epidermis y epitelio sudoríparo, positividad (+++) en melanocitos malignos patrón nuclear y citoplasmático.
M27	-Positividad (+++) en epidermis y epitelio sudoríparo, positividad (+++) en melanocitos malignos patron nuclear y citoplasmático.
M11	-Positividad (+++) en epitelio sudoríparo, positividad (+) en queratinocitos epidérmicos, positividad (+ a ++) en los melanocitos malignos, patron únicamente citoplásmico.
M12	-Positividad (+) en epidermis, positividad (++) en epitelio sudoríparo, positividad citoplasmática (+) en melanocitos malignos fusiformes, positividad citoplasmática (++) en melanocitos malignos poligonales.
M14	-Negativo en epidermis, positividad (- a +) citoplasmática en melanocitos.
M15	-Positividad (+) en epitelio de epidermis, positividad (+++) en citoplasma y núcleo de melanocitos malignos.
M19	-Positividad (+) en epidermis y epitelio sudoríparo, positividad (+++) citoplasmática en melanocitos malignos.

## 8.-DISCUSIÓN

Debido al creciente interés en la industria equina, cada vez existen más personas interesadas en la salud de sus caballos, este interés crece de la mano con la preparación que tenemos los médicos para desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de diferentes patologías, incluyendo el cáncer. Dentro de los problemas más frecuentes que desarrollan los caballos son los problemas de piel los cuales generalmente se pueden tratar sin problema, sin embargo, existen patologías que son difíciles de tratar como lo son las neoplasias (cáncer) las cuales incluyen: sarcoides, papilomas y melanomas, siendo estos las neoplasias más frecuentes que desarrollan los caballos. A diferencia de los sarcoides y papilomas, el índice de metástasis es mayor en los melanomas (Hendrick, 2016; Knottenbelt, 2015).

En los melanomas existen factores intrínsecos que predisponen a los caballos a padecerlo como lo son la edad y el color de capa ( Zachary, 2017; Knottenbelt, 2015; Scott, 2011).

Actualmente los estudios de las neoplasias en caballos está limitada a la resección quirúrgica y posteriormente análisis histopatológico, dejando a un lado los análisis moleculares que nos pudieran ayudar a entender el comportamiento de este tipo de neoplasia e inclusive llegar a desarrollar tratamientos efectivos contra el melanoma (Moore et al., 2013).

En humanos, perros y modelos murinos se ha estudiado el gen WT1 como oncogén, autores mencionan su importancia para prognosis en diferentes tipos de cáncer, los cuales, han demostrado sobreexpresión de este gen (Carter et al., 2018; McGregor et al., 2018; Perry, 2006). Sin embargo, en equinos, un trabajo previo realizado por el grupo de investigación se encontró expresión de la proteína de WT1 en muestras de piel normal y no así en las muestras de melanoma analizadas (Rangel, 2017)

En este trabajo se analizó expresión de WT1 en muestras de piel normal y melanoma de equino por PCR-RT e inmunohistoquímica y se analizó si existe una asociación con el color de capa.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por Knottenbelt en 2015, Moore en 2013 y Scott en 2011, en que los caballos predisponen a desarrollar melanomas por 2 factores principalmente: la edad y el color de capa, siendo los caballos tordillos los más afectados por esta patología en comparación con los caballos con colores de capa en tonalidades oscuras (Knottenbelt, 2015; Moore et al., 2013; Scott, 2011).

La expresión de este gen a nivel de ARNm por PCR-RT se detectó en el 100% de las muestras analizadas tanto de melanoma como de piel normal.

En los resultados obtenidos por PCR-RT no hubo diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) pero si hubo diferencia numérica entre las muestras de piel normal y melanoma, observándose diferencias en las unidades de expresión relativas entre las muestras de piel y melanoma equino, lo cual pudiera deberse a diferentes factores como el estadio, el tamaño, la actividad física del caballo, la edad y el color de capa, como lo mencionan Knottenbelt, en 2015, y Moore y colaboradores, en 2013.

En la piel se encontraron diferencias en la expresión de WT1 de acuerdo con el color de capa y la edad del paciente, encontrándose mayor expresión del gen WT1 en los caballos jóvenes (1-4 años) en comparación con los caballos adultos (>8 años) y, dentro de los caballos jóvenes, los colores de capa de tonalidad diferente al tordillo (blanco) expresan más WT1.

En los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica se pudieron observar variaciones en la expresión proteica de WT1 en piel y melanoma, en las muestras de piel se detectó positividad en sus componentes incluyendo el melanocito (patron nuclear y citoplasmático), se puede inferir que el gen WT1 esta presente en la piel normal y funge como regulador génico; en las muestras de melanoma se observaron diferencias entre los estadios, lo que pudiera indicar que el gen WT1 se manifiesta en periodos específicos en el desarrollo del melanoma o que pudiera iniciar un proceso de neoplasia.

Los resultados obtenidos por Rangel Sánchez en 2017 en los cuales no se detectó la expresión de WT1 en melanoma equino pero si en piel normal, son contrastantes a nuestros resultados en cuanto a la expresión de WT1 en melanoma; sin embargo, existen

diferentes factores por los cuales pudiesen verse afectados los métodos de análisis como los tipos de melanomas, técnica quirúrgica, protocolos de PCR-RT, entre otros, dichos factores pueden influir en los resultados (Rangel, 2017).

Los presentes resultados sugieren que el gen WT1 pudiera tener un rol biológico regulador en el desarrollo del melanoma en equinos. Estudios posteriores deben ser dirigidos a dilucidar con mayor especificidad el rol biológico de WT1 y aunado a esto las características de los pacientes deben de ser más homogéneos en cuanto a los diferentes factores ya mencionados.

## **9.-CONCLUSIONES**

Los análisis que se realizaron en este trabajo nos permiten concluir lo siguiente:

- WT1 se expresa en todos los componentes de la piel normal del caballo, encontrándose mayor expresión en tonalidades oscuras.
- WT1 se expresa en el melanoma equino y sus diferentes estadios, encontrándose mayor expresión en los tumores menores a 2cm<sup>2</sup> y en caballos de tonalidades oscuras.
- Existe una mayor expresión del gen WT1 en caballos con colores de capa diferentes al tordillo.
- Existe una mayor expresión del gen WT1 en la piel de los caballos jóvenes.

## 10.-BIBLIOGRAFÍA

- Carranza-Martínez, B. D., Salas-Treviño, D., Soto-Domínguez, A., Ramírez-Romero, R., Zapata-Benavides, P., Cedillo-Rosales, S., ... Zamora-ávila, C. D. E. (2019). WT1 expression as a potential biomarker of malignancy in canine breast tumor. *International Journal of Morphology*, 37(1), 190–195.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000100190>
- Carter, J. H., Deddens, J. A., Mueller, G., Lewis, T. G., Dooley, M. K., Robillard, M. C., ... Douglass, L. E. (2018). Transcription factors wt1 and p53 combined: A prognostic biomarker in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 119(4), 462–470. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0191-x>
- Chápoli-Muñoz, R. (2003). *Las multiples caras del gen WT1: funciones en el desarrollo e implicaciones clínicas*. 24, 29–38.
- Hastie, N. D. (2001). Life, sex, and WT1 isoforms - Three amino acids can make all the difference. *Cell*, 106(4), 391–394. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00469-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00469-X)
- Hastie, N. D. (2017). Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development (Cambridge)*, 144(16), 2862–2872.  
<https://doi.org/10.1242/dev.153163>
- Heinzerling, L. M., Feige, K., Rieder, S., Akens, M. K., Dummer, R., Stranzinger, G., & Moelling, K. (2001). Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA coding for human interleukin 12 into melanoma metastases in gray horses. *Journal of Molecular Medicine*, 78(12), 692–702. <https://doi.org/10.1007/s001090000165>
- Hendrick, M. J. (2016). Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. *Tumors in Domestic Animals*, (1995), 142–175. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch5>
- Hewes, C. A., & Sullins, K. E. (2006). Use of cisplatin-containing biodegradable beads for treatment of cutaneous neoplasia in equidae: 59 Cases (2000-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(10), 1617–1622.  
<https://doi.org/10.2460/javma.229.10.1617>

- Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P., & Gessler, M. (1998). Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 709–714. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.709>
- Knottenbelt, D. C. (2015). *Clinical Equine Oncology* (1st ed.). England: Elsevier.
- Knottenbelt, D. C. (2019). The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options? *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 35(2), 243–262. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.03.006>
- Kupcova Skalnikova, H., Cizkova, J., Cervenka, J., & Vodicka, P. (2017). Advances in Proteomic Techniques for Cytokine Analysis: Focus on Melanoma Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122697>
- Ma, X. X. (n.d.). *Melanin: biosynthesis, Functions and Health Effects*.
- MacGillivray. (2013). Metastatic melanoma in horses. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Maugeri, G., D'Amico, A. G., Rasà, D. M., Reitano, R., Saccone, S., Federico, C., ... D'Agata, V. (2016). Expression profile of wilms tumor 1 (Wt1) isoforms in undifferentiated and all-trans retinoic acid differentiated neuroblastoma cells. *Genes and Cancer*, 7(1–2), 47–58.
- McGregor, R. J., Chau, Y. Y., Kendall, T. J., Artibani, M., Hastie, N., & Hadoke, P. W. F. (2018). WT1 expression in vessels varies with histopathological grade in tumour-bearing and control tissue from patients with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 119(12), 1508–1517. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0317-1>
- Menke, A., Mcinnes, L., Hastie, N. D., & Schedl, A. (1998). The Wilms' tumor suppressor WT1: Approaches to gene function. *Kidney International*, 53(6), 1512–1518. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00935.x>
- Merlo, E. M. M. De. (2012). Introducción al diagnóstico en oncología equina. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2), 88–98.



<https://doi.org/10.5209/RCCV.40086>

- Moore, J. S., Shaw, C., Shaw, E., Buechner-Maxwell, V., Scarratt, W. K., Crisman, M., ... Robertson, J. (2013). Melanoma in horses: Current perspectives. *Equine Veterinary Education*, 25(3), 144–151. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00368.x>
- Morrison, A. A., Viney, R. L., & Lodomery, M. R. (2008). The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1785(1), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.10.002>
- Mrowka, C., & Schedl, A. (2000). Wilms' tumor suppressor gene WT1: From structure to renal pathophysiologic features. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(SUPPL. 16), 106–115.
- Neuber, A., & Nuttall, T. (2017). Diagnostic Techniques in Veterinary Dermatology. In *Diagnostic Techniques in Veterinary Dermatology*. <https://doi.org/10.1002/9781119233053>
- Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S. I., ... Sugiyama, H. (2002). Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *International Journal of Cancer*, 100(3), 297–303. <https://doi.org/10.1002/ijc.10476>
- Perry, B. N., Cohen, C., Govindarajan, B., Cotsonis, G., & Arbiser, J. L. (2006). Wilms tumor 1 expression present in most melanomas but nearly absent in nevi. *Archives of Dermatology*, 142(8), 1031–1034. <https://doi.org/10.1001/archderm.142.8.1031>
- Qi, X. W., Zhang, F., Wu, H., Liu, J. L., Zong, B. G., Xu, C., & Jiang, J. (2015). Wilms' tumor 1 (WT1) expression and prognosis in solid cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 5(Figure 1), 11–15. <https://doi.org/10.1038/srep08924>
- RANGEL-SANCHEZ, I. Y. (2017). *Expression of the Wilms' tumour gene and its association with PPARb/d in healthy skin and melanoma of horses*.
- Rasà, D. M., D'Amico, A. G., Maugeri, G., Cavallaro, S., & D'Agata, V. (2017). WT1

- Alternative Splicing: Role of Its Isoforms in Neuroblastoma. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(2), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0930-0>
- Rieder, S., Stricker, C., Joerg, H., Dummer, R., & Stranzinger, G. (2000). A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 117(2), 73–82. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2000x.00245.x>
- Sakamoto, Y., Mariya, Y., Sasaki, S., Teshiromori, R., Oshikiri, T., Segawa, M., ... Funato, T. (2009). WT1 mRNA level in peripheral blood is a sensitive biomarker for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(2), 169–176. <https://doi.org/10.1620/tjem.219.169>
- Scharnhorst, V., Van Der Eb, A. J., & Jochemsen, A. G. (2001). WT1 proteins: Functions in growth and differentiation. *Gene*, 273(2), 141–161. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00593-5)
- Scott, D. A. W. S. (2011). *Equine Dermatology Medicine III*.
- Sponenberg, D. P., & Bellone, R. (2017). Equine color genetics: 4th edition. In *Equine Color Genetics: 4th Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781119130628>
- Wagner, N., Panelos, J., Massi, D., & Wagner, K. D. (2008). The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 455(5), 839–847. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0340-1>
- William J. Bacha, L. M. B. (2012). *Color Atlas of Veterinary Histology* (third).
- Wilsher, M., & Cheerla, B. (2007). WT1 as a complementary marker of malignant melanoma: An immunohistochemical study of whole sections. *Histopathology*, 51(5), 605–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02843.x>
- Wobeser, B. K. (2015). Skin Diseases in Horses. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 31(2), 359–376. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2015.04.007>

Wong, K., van der Weyden, L., Schott, C. R., Foote, A., Constantino-Casas, F., Smith, S., ... Adams, D. J. (2019). Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08081-1>

WT1 WT1 transcription factor [ *Equus caballus* (horse) ]. (2019). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100072704>

Yanina, R. (2017). *Escobedo, n.l., mayo 2017. I.*

Zachary, J. F. (2017). *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (6 th).