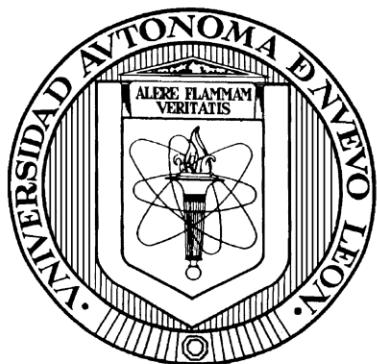


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Análisis molecular del rol biológico del gen WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino”

Tesis presentada por:

MVZ RICARDO ZENÓN TORRES GUERRA

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Escobedo, N.L., Septiembre 2025

Análisis molecular del rol biológico del gen WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino”

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ Ricardo Zenón Torres Guerra

COMITÉ DE TESIS



PhD. Gustavo Hernández Vidal
Director de Tesis



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Codirectora



Dra. Zaida Torres Cavazos
Codirectora



Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Codirector



Dr. Gerardo Méndez Zamora
Codirector

“Análisis molecular del rol biológico del gen WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino”

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ RICARDO ZENÓN TORRES GUERRA

COMITÉ DE TESIS



PhD. Gustavo Hernández Vidal
Director



Dr. Pablo Zapata Benavides
Codirector Externo



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

* A todas las instituciones que hicieron posible la materialización de esta investigación, al CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología), a la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, al laboratorio de Genética, al laboratorio de Patología veterinaria, al laboratorio de Virología veterinaria de la FMVZ y sobre todo al Hospital de Grandes Especies de la FMVZ.

*A mi familia, en especial a mis padres, estoy muy agradecido por estar siempre presentes en los momentos más importantes de toda mi vida y sobre todo en esta etapa.

*Al Dr. Gustavo Hernández Vidal, por confiar en mí para este proyecto, por apoyarme y ser una persona clave durante mi crecimiento profesional en todo momento, por ser un ejemplo de profesionalismo y liderazgo con quien estoy muy contento de seguir trabajando.

*A la Dra. Diana Elisa Zamora Ávila, por aceptarme en su proyecto, por su paciencia y profesionalismo, sobre todo por enseñarme una alternativa cada que se agotaban las posibilidades, por transmitirme su conocimiento y dirigirme por el sentido correcto, para mí ha sido una experiencia profesional muy satisfactoria el poder trabajar en su línea de investigación.

*Al Dr. Pablo Zapata Benavides por su entusiasmo y pasión en este proyecto, sobre todo por ser una fuente de inspiración y apoyo.

*Al Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar, por sus valiosas aportaciones al proyecto.

*Al Dr. Gerardo Méndez Zamora, sin su apoyo los resultados obtenidos durante todo el estudio no tendrían sentido.

*A la Doctora Zaida Torres Cavazos por apoyarme con la obtención de las muestras.

* A la Técnica del laboratorio Cynthia Marisol Padrón Carrillo por su gran fortaleza emocional, compromiso y apoyo todos los días durante la etapa experimental, por compartirme su experiencia, por las alegrías y las decepciones que vivimos en el laboratorio, sobre todo por todo su profesionalismo, gracias, infinitas Cynthia.

*A la técnica del laboratorio Leslie Nayelly de la Rosa, por apoyarme con su experiencia en el laboratorio.

*Al Dr. Jesús Jaime Escareño por transmitirme su alegría todos los días en el laboratorio y alentarme cuando los resultados no salían, sobre todo por enseñarme a verle el lado favorable a los inconvenientes.

*Al Dr. Uziel Castillo Velázquez por apoyarme durante la última fase del estudio y su admirable tenacidad, conocimiento y disponibilidad para ayudar.

* A la Dra. Cecilia Ramírez por su disponibilidad, a los chicos del laboratorio y a Alejandra Mendoza por su entusiasmo, dedicación y su apoyo durante el procesamiento de las muestras.

* Al MVZ José de Jesús Sustaita Dávila por facilitarme muestras de tumores de sus casos clínicos.

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre por darme la existencia, desde el perfume más sutil de la vida hasta el más intenso y rico sabor de sus frutos más grávidos, por su incondicional e inagotable apoyo a lo largo de los años. A todos mis hermanos, José, Edgar y Felipe por su presencia continua a pesar de la distancia, saben lo mucho que los admiro y los respeto.

A Renata por ser un respiro de aire en lo profundo del océano.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Cáncer	2
2.2 Metástasis	4
2.3 Cáncer en equinos	4
2.4 Anatomía y fisiología de la piel en equinos	5
2.5 Melanoma equino	7
2.6 Sarcoide equino	11
2.7 Gen WT1 y sus mecanismos de expresión diferencial	13
2.8 Gen WT1 y sus funciones	15
2.9 WT1 en equinos	19
2.10 PPAR beta delta	20
2.11 PPAR beta delta en equinos	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	22
3.1 HIPÓTESIS	23
3.2 OBJETIVO GENERAL	23
3.2.1 Objetivos específicos	23

4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1 Aprobación ética	24
4.2 Lugar de procesamiento de muestras	24
4.3 Área y tiempo de muestreo	24
4.4 Metodología	24
4.4.1 Obtención de las muestras	24
4.4.2 Rescisión quirúrgica y biopsia	24
4.4.3 Histopatología	26
4.4.4 Inmunohistoquímica	26
4.4.5 Análisis molecular	27
4.4.5.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	27
4.4.5.2 RTqPCR WT1 y PPARβ/δ	28
4.4.5.3 Análisis de la metilación	28
4.4.6 Análisis de la expresión de las variantes de WT1, PPAR β/δ y metilación	29
4.4.7 Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Diagnóstico histopatológico.	31
5.2 Hallazgos clínicos e histopatológicos de las neoplasias	32
5.2.1 Tipos de melanomas	32
5.2.2 Tipos de sarcoides	33
5.2.3 Sarcoide oculto	35
5.2.4 Sarcoide verrucoso	35
5.2.5 Sarcoide nodular	36
5.2.6 Sarcoide fibroblástico	36
5.2.7 Nevo melanocítico (Nevo azul celular)	37

5.2.8 Melanoma dérmico	37
5.2.9 Melanomatosis dérmica	38
5.3 Inmunohistoquímica	38
5.3.1 Expresión Inmunohistoquímica de WT1 en la piel sana, sarcoide y melanoma	40
5.3.2 Expresión Inmunohistoquímica de WT1 en las variantes de piel sana, variantes clínicas de neoplasias de sarcoide y variantes clínicas de melanoma	42
5.3.3 Expresión Inmunohistoquímica de PPAR β/δ en las variantes de piel sana, variantes clínicas de neoplasias de sarcoide y variantes clínicas de melanoma	48
5.3.4 Expresión Inmunohistoquímica de PPAR β/δ en la piel sana, sarcoide y melanoma	49
5.3.5 Cuantificación de la densidad inmunohistoquímica de WT1 y PPAR β/δ	51
5.3.6 Correlación de la expresión inmunohistoquímica de WT1 y PPAR β/δ . en piel sana, sarcoide y melanoma equino	52
5.4 RTqPC	53
5.4.1 Análisis de las variantes de expresión de WT1 (17AA +/-, KTS +/-)	53
5.4.2 Análisis de la metilación de WT1 Exón 1 por RTqPCR	56
5.4.3 Análisis de la expresión de PPAR β/δ por RTqPCR	57
5.4.4 Correlación de los mecanismos de expresión diferencial de WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino	58
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES	66
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fundamentos de la multicelularidad.	3
Figura 2. Estructura morfológica de la piel y sus componentes.	6
Figura 3. Diferentes nomenclaturas de las variantes de melanomas en equinos.	9
Figura 4. Variantes clínicas del sarcoide equino y sus sub-diferenciaciones.	13
Figura 5. Variantes de expresión diferencial de WT1	15
Figura 6. Función de WT1 como represor transcripcional	17
Figura 7. Función de WT1 como factor transcripcional.	18
Figura 8. Función postranscripcional de WT1.	19
Figura 9. Mecanismo de PPAR β/δ en conjunto con el RXR.	20
Figura 10. Características histológicas de la piel de equinos sanos.	31
Figura 11. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide oculto.	35
Figura 12. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide verrucoso.	35
Figura 13. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide nodular.	36
Figura 14. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide fibroblástico.	36
Figura 15. Características clínicas e histopatológicas de un nevo melanocítico.	37
Figura 16. Características clínicas e histopatológicas de un melanoma dérmico.	37
Figura 17. Características clínicas e histopatológicas de la Melanomatosis dérmica.	38

Figura 18. Inmunohistoquímica en órganos de control positivo interno para los anticuerpos WT1 6FH2 monoclonal en Testículo y PPAR β/δ políclonal C-20 en riñón.	39
Figura 19. Comparación de la expresión de WT1 en tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino.	41
Figura 20. Densidad de expresión nuclear en variantes de piel sana de WT1 y PPAR β/δ .	42
Figura 21. Densidad de expresión citoplasmática en variantes de piel sana de WT1 y PPAR β/δ .	43
Figura 22. Densidad de expresión nuclear en variantes Sarcoide.	44
Figura 23. Densidad de expresión citoplasmática en variantes Sarcoide.	45
Figura 24. Densidad de expresión nuclear en variantes de Melanomas.	46
Figura 25. Densidad de expresión citoplasmática en variantes de Melanoma.	47
Figura 26. Comparación de la expresión de PPAR β/δ en tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los grados de melanoma y sus características	9
Tabla 2. Secuencias para RTqPCR de las diferentes regiones de interés de WT1, gen constitutivo y de PPAR β/δ .	29
Tabla 3. Relación entre el tipo de presentación clínica de neoplasias de melanomas, cantidad de tejidos obtenidos, edades y colores de capa predominantes.	33
Tabla 4. Variantes histopatológicas más sobresalientes de los diferentes tipos de presentaciones clínicas en las neoplasias obtenidas de melanomas	33
Tabla 5. Relación entre el tipo de presentación clínica de neoplasias de sarcoides, cantidad de tejidos obtenidos, edades y colores de capa predominantes.	34
Tabla 6. Variantes histopatológicas más sobresalientes de los diferentes tipos de presentaciones clínicas en las neoplasias obtenidas de sarcoides.	34
Tabla 7. Comportamiento de la localización nuclear por inmunohistoquímica de las proteínas de WT1 y PPAR β/δ en las neoplasias de melanoma y sarcoide con respecto a la piel.	53
Tabla 8. Comportamiento de las variantes de expresión diferencial de WT1.	59

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Incidencia de neoplasias referidas para el estudio en un lapso de 1.5 años.	32
Gráfica 2. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de piel sana	42
Gráfica 3. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de piel sana.	43
Gráfica 4. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de sarcoïdes	44
Gráfica 5. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de sarcoïdes.	45
Gráfica 6. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de Melanomas	46
Gráfica 7. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de Melanomas.	47
Gráfica 8. Expresión de la proteína WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino.	51
Gráfica 9. Expresión de la proteína PPAR β/δ en piel sana, sarcoide y melanoma equino.	52
Gráfica 10. Análisis del ARNm de WT1 expresión total.	54
Gráfica 11. Expresión del ARNm de la variante WT1 E5 en tejidos equinos.	55
Gráfica 12. Expresión del ARNm de la variante WT1 KTS en tejidos equinos.	56
Gráfica 13. Expresión del ARNm de la variante WT1 Exón 1 en tejidos equinos.	57
Gráfica 14. Análisis de la expresión del ARNm de la variante de PPAR β/δ .	58

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%:	Porcentaje.
°C:	Centígrados.
17AA:	17 aminoácidos.
2ΔΔCt:	2 delta delta ct.
CT:	Temperatura melting.
5hmC:	5 hidroximetilcitosina
5mC:	5 metilcitosina.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA:	Análisis de la varianza.
ARNm:	Ácido ribonucleico.
ASIP:	Proteína de señalización Agouti.
ASP:	Ácido aspártico.
BcL2:	B cell Lymphoma gen (regulador de la apoptosis).
Vid:	Dos veces al día.
Pb:	Pares de bases.
C₂H₂O₄:	Ácido oxálico.
C-Terminal:	Carboxilo terminal.
ECM:	Matriz extracelular.
H₂S0₄:	Ácido sulfúrico.
HPV-8:	Virus del papiloma humano tipo 8.
IM:	Intramuscular.
IV:	Intravenoso.
KDa:	Kilodalton.
kg:	Kilogramo.
KMnO₄:	Permanganato de potasio.
KTS:	Lisina, treonina y serina.
MAPK:	proteína quinasa activada por mitógenos.
MC1R:	Receptor de melanocortina -1.

mg/ml:	Miligramo sobre mililitro.
MHC-I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1.
MITF:	Factor de transcripción de la macroftalmia.
ML:	Mililitro.
ng/µL:	Nanogramos sobre microlitro.
nM:	Nano molar.
NR1C1:	Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa.
NR1C2:	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas beta delta.
NR1C3:	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma.
NR4A3:	Receptor nuclear activador de tipo 3.
PAX3:	Gen de caja pareada tipo 3.
PCNA:	Antígeno nuclear de células proliferantes.
PDGFβ-R:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo beta.
PH:	Potencial de Hidrógeno.
Po:	Vía de administración oral.
PPAR β/δ:	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas beta delta.
PRE:	Pura raza española.
PTA:	Monitor de tono parasimpático.
RXR:	Receptor de retinoides X.
Sid:	Una vez al día.
STX17:	Gen sintaxina 17.
TIMP-2:	Inhibidor tisular de metaloproteinasas.
UER:	Unidad de expresión relativa.
UI:	Unidades internacionales.
UV:	Ultravioleta.
VPB-1 Y VPB-2:	Virus del papiloma bovino tipo 1 y tipo 2.
WT1:	Gen 1 del tumor de Wilms

RESUMEN

La expresión del gen del Tumor de Wilms 1 (WT1) ha sido descrita en diversas neoplasias, tales como el melanoma en humanos y otras especies, por lo que debido a sus características moleculares es considerado un objetivo terapéutico importante, en la especie equina, sin embargo, sus funciones moleculares no están dilucidadas. Nuestros hallazgos por otra parte sugieren una función de WT1 como supresor tumoral en la piel sana, así como una posible interacción con los receptores activados del proliferador de peroxisomas beta/delta (PPAR β/δ) en las neoplasias de sarcoide y melanoma, las cuales son neoplasias cutáneas que demandan un importante interés clínico, social y económico. Conocer el comportamiento molecular de WT1 en estos tejidos amplia la posibilidad de ser considerado como un objetivo para nuevas alternativas terapéuticas, por lo que en este estudio hemos determinado que WT1 desempeña un rol como supresor tumoral en la piel sana en comparación con las neoplasias de sarcoide y melanomas, generamos una asociación entre las variantes de color de capa y las variantes clínicas de neoplasias de sarcoideos y melanomas con sus principales hallazgos histopatológicos y sugerimos que PPAR β/δ puede ser considerado como un marcador de agresividad por medio de inmunohistoquímica en estas neoplasias, cuantificamos y correlacionamos las variantes que determinan la expresión alternativa de WT1 en las cuales se incluyeron su expresión total, las variantes de corte y empalme alternativo, KTS (+/-), 17 AA (+/-), la metilación de las islas CPG en el primer exón y la expresión de PPAR β/δ por RTqPCR en tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma. No encontramos una relación entre los mecanismos de corte y empalme alternativo con la generación de neoplasias, pero si una correlación negativa en la expresión de WT1 con respecto a PPAR β/δ en los tumores, cuyo mecanismo pudiese interferir con la región metilante en las islas CPG en el promotor de WT1, limitar su expresión y como consecuencia atenuar su función como supresor tumoral en las neoplasias de sarcoideos y melanomas en equinos.

ABSTRACT

Wilms tumor 1 (WT1) gene expression has been described in various neoplasms, such as melanoma in humans and other species, due to its molecular characteristics it is considered an important therapeutic target in equine species, however, its molecular functions are not elucidated. Furthermore, our findings suggest a role of WT1 as a tumor suppressor in healthy skin, as well as a possible interaction with peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) in sarcoid and melanoma neoplasms, which are cutaneous neoplasms that demand important clinical, social and economic interest. Knowing the molecular behavior of WT1 in these tissues expands the possibility of being considered as a target for new therapeutic alternatives, so in this study we have determined that WT1 plays a role as a tumor suppressor in healthy skin compared to sarcoid neoplasms and melanomas, we generated an association between layer color variants and clinical variants of sarcoid neoplasms and melanomas with their main histopathological findings and determined that PPAR β / δ can be considered as a marker of aggressiveness by means of immunohistochemistry in these neoplasms, we quantified and correlated the variants that determine the alternative expression of WT1 in which its total expression, co-terminus and alternative splicing variants, KTS (+/-), 17 AA (+/-), methylation of CPG islands in the first exon and the expression of PPAR β / δ by RTqPCR in healthy skin, sarcoid and melanoma tissues were included. No relationship was found between alternative splicing mechanisms and the generation of neoplasms, but a negative correlation was found in the expression of WT1 with respect to PPAR β/δ in tumors, whose mechanism could interfere with the methylating region in the CPG islands in the WT1 promoter, limiting its expression and consequently attenuating its function as a tumor suppressor in sarcoid neoplasms and melanomas in equines.

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma es uno de los tumores cutáneos que más se presentan en los equinos, junto con el sarcoide constituyen el 95% de las neoplasias cutáneas en el caballo, estos tumores tienden a generar lesiones de interés clínico, que con el tiempo deterioran las condiciones fisiológicas de los equinos, los estudios realizados en caballos actualmente han tenido mayor relevancia por su interés económico, social y afectivo, por lo que convierte este problema en uno de los desafíos más frecuentes de enfrentar para los veterinarios. En humanos, el melanoma está regulado por el gen WT1 (Wilm's tumor protein- 1), cuyo gen ha sido descrito como un gen con una función dual de acuerdo con el contexto biológico en el que se encuentre, se le ha atribuido una función como oncogén, con una alta expresión en células cancerosas. A diferencia de humanos, en los equinos no se ha encontrado sobreexpresado en neoplasias de sarcoide y melanoma, sin embargo, está presente en piel normal, sangre y riñón, lo que sugiere que en la piel sana de los equinos pudiese estar actuando como un gen supresor de tumores. En células de melanoma humanas y melanoma murino, se ha asociado la sobreexpresión de los genes PPAR β/δ (Receptores Activados por el Proliferador de Peroxisomas beta / delta) con una modulación negativa del gen WT1, es importante destacar que existen diferentes mecanismos de regulación en la expresión del gen WT1, como la regulación epigenética en el encendido y apagado de la expresión a través de procesos interconectados, así como factores de transcripción y proteínas asociadas, además de procesos postranscripcionales que afectan la traducción y la estabilidad del ARNm de WT1. Entre estos procesos se incluyen el corte y empalme, y la utilización de codones de inicio alternativo durante la traducción. Cabe considerar que los procesos de metilación influyen en las interacciones entre el ADN y las proteínas, pudiendo alterar su estructura y como consecuencia, la expresión génica. Dilucidar qué mecanismos de regulación negativa limitan la expresión y función de WT1 en neoplasias de melanoma, en comparación con la piel sana y sarcoide, podría permitirnos determinar el rol biológico de WT1 en la piel sana del equino.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer se describe como la proliferación de células de forma descontrolada, que tiene como consecuencia la generación de neoplasias, una neoplasia es una masa anormal de tejido, donde el crecimiento de esta neoplasia excede sus límites además de ser descoordinada en relación con los tejidos normales adyacentes a ella, las neoplasias son persistentes de forma excesiva, aun después de terminar el estímulo que ha provocado el cambio en el tejido, El término cáncer se deriva de la palabra griega karkinos, o cangrejo, por su apariencia "similar a un cangrejo" de los vasos sanguíneos en los tumores (Knottenbelt *et al.*, 2015). No obstante, en los últimos años se ha profundizado más sobre el estudio de estos cambios, y se ha propuesto al cáncer como un engaño a un sistema multicelular cooperativo, esto es fundamentado debido a que existen fenómenos similares al cáncer a lo largo del árbol de la vida que rompen las características centrales de una multicelularidad efectiva. Los fundamentos a nivel de la multicelularidad efectiva están compuestos por 5 mecanismos celulares que son: Inhibición de la proliferación, muerte celular controlada, asignación de recursos, división de recursos, división del trabajo, crecimiento y mantenimiento del entorno extracelular. Cuando estos rasgos celulares que componen la funcionalidad efectiva de un sistema de cooperación multicelular se desorganizan, se conduce a los siguientes cambios: proliferación incontrolada, supervivencia celular inapropiada, monopolización de recursos, diferenciación desregulada y degradación del medio externo celular (Figura 1). (Aktipis *et al.*, 2015).

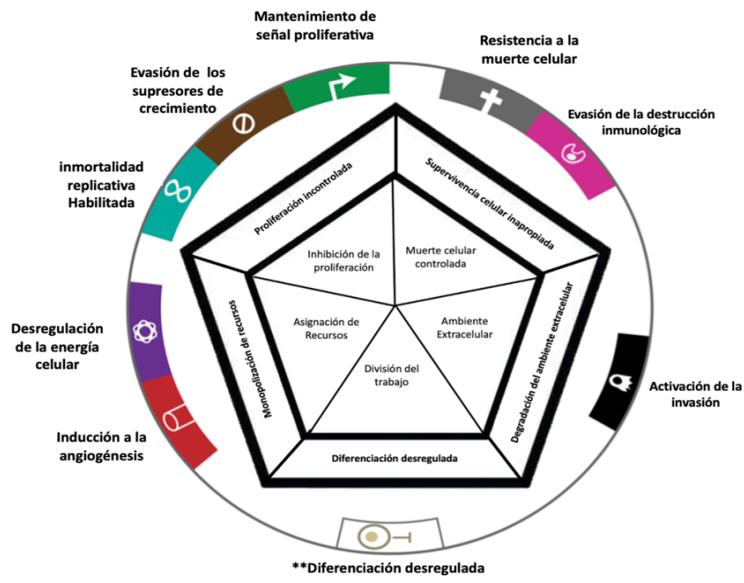


Figura 1. Fundamentos de la multicelularidad. Fundamentos (pentágono interno) y sus características frente al cáncer (pentágono externo), que cambian estrechamente ante el engaño de los fundamentos de la multicelularidad efectiva (Círculo externo). (Traducido y modificado de Aktipis *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que, la oncología comparativa permite identificar cambios relacionados con el cáncer y la progresión individual en organismos no humanos. Los animales parecen ser más propensos a desarrollar cáncer en comparación con otras formas de vida multicelular, sin embargo, los datos podrían estar influenciados por factores de muestreo. Sobresalen 4 hipótesis sobre el hecho de que los animales pueden ser más susceptibles al cáncer, como son: 1. Tasas metabólicas más altas; el metabolismo acelerado de los animales podría aumentar el riesgo de cáncer, al hacerlos más vulnerables a la asignación desigual de recursos y al engaño en la división del trabajo celular. Además, un metabolismo más rápido podría dañar directamente el ADN y aumentar la probabilidad de mutaciones cancerígenas (Boddy *et al.*, 2020). 2. Mayor número de células proliferativas; En comparación con otras formas de vida multicelular, los animales adultos pueden tener una mayor cantidad de células en división en tejidos epiteliales e inmunes. Esta mayor actividad celular podría incrementar la probabilidad de errores durante la replicación del ADN y, por lo tanto, el riesgo de cáncer; 3. Sistemas circulatorios complejos: Los animales poseen sistemas circulatorios que transportan tantas células como recursos. Esta característica, si bien esencial para su funcionamiento, también facilita la propagación de células cancerosas a través del cuerpo, aumentando la susceptibilidad a la metástasis en comparación con

organismos que solo transportan recursos. 4. Mecanismos de supresión del cáncer: Si bien los animales comparten algunos mecanismos de supresión del cáncer con otros organismos multicelulares, como la apoptosis y la vigilancia inmune, estos podrían no ser suficientes para contrarrestar los factores que aumentan su susceptibilidad al cáncer (Boddy *et al.*, 2020).

2.2 Metástasis

La metástasis es la capacidad que adquieren las células tras su invasión a otros tejidos, se describe en cuatro ejes principales que son: Estímulo inicial, transformación epitelial-mesenquimal mediado por una señalización, propagación linfática y hematológica y finalmente la implantación. En cada uno de estos procesos existen mecanismos moleculares controlados por las células tumorales, la metástasis es una enfermedad compleja y sistémica que se desarrolla a partir de la interacción entre las células tumorales y sus microambientes, tanto cercanos como lejanos. Estos cambios locales y sistémicos están asociados al sistema inmunitario conocido como vigilancia inmunológica y juegan un papel crucial en el desarrollo de la metástasis, ya sea limitando o permitiendo su función. Si bien las respuestas inmunitarias antitumorales suelen eliminar la mayoría de las lesiones primarias y las metástasis tempranas, ciertos factores segregados por el cáncer o las células estromales en el tumor primario pueden movilizar y activar células en órganos distantes, favoreciendo el crecimiento de células cancerosas diseminadas en lesiones macro metastásicas (Alečković *et al.*, 2019). (Groom & Sullins, 2017).

2.3 Cáncer en equinos

En los equinos, la ubicación más común de neoplasias es la piel, existen muchos tipos de tumores, sin embargo, dos de los tumores primarios más sobresalientes que encabezan la literatura son los sarcoídes y los melanomas. Estos dos tumores constituyen más del 95 % de las neoplasias cutáneas en el caballo, el resto incluye carcinomas de células escamosas, papilomas, granulomas y múltiples neoplasias poco estudiadas. Debido a su incidencia poco común, el resto de las neoplasias no cutáneas en el caballo están encabezadas por varias formas de linfoma, carcinoma de células basales, hemangiosarcoma y mastocitoma (Knottenbelt *et al.*, 2015). En cuanto a la presentación de melanomas y sarcoídes en caballos, debido a la visualización y el aspecto que tienden a caracterizarlos, han llevado a la creencia

de su existencia en un contexto de índole benigno, este hecho, sin embargo, es un obstáculo que limita el progreso terapéutico, diagnóstico y como consecuencia el buen pronóstico de los pacientes, así como el estudio de nuevas alternativas terapéuticas de forma significativa. Todas las presentaciones de estas neoplasias pueden progresar a pronósticos muy desfavorables, algunas lesiones de neoplasias cutáneas superficiales no llegan a tener un efecto inmediato sobre el rendimiento de los caballos, sin embargo, existe un riesgo potencial en la exacerbación como en el aumento de neoplasias, en el caso de los sarcoïdes no existe el riesgo metastásico en comparación con el melanoma pero sí suele ser muy agresivo a nivel local, llegando a limitar funciones vitales importantes (Funiciello & Roccabianca, 2020). Por otra parte, la localización de lesiones y su apariencia pueden perjudicar el valor monetario de los caballos debido a la tendencia a la exacerbación, la cual tiende a ser variable en cuanto al tiempo. El reconocimiento de ambas neoplasias genera complicaciones debido al amplio espectro de lesiones que generan, lo cual las vuelve irreconocibles en algunas ocasiones, estas variables están incluidas en su presentación clínica, morfológica e histopatológica (Knottenbelt *et al.*, 2015).

2.4 Anatomía y fisiología de la piel en equinos

La piel es la cubierta externa de cuerpo y constituye del 15 % al 20 % de la totalidad en masa del organismo, varía de acuerdo al sitio y las diferentes razas equinas, existen algunas diferencias significativas en el caballo, por ejemplo que en particular es bien dotada de glándulas sudoríparas ya que el caballo suda más fácilmente, estas glándulas se distribuyen en diferentes patrones a diferencia de otras especies, está compuesta por dos estratos que cumplen diferentes funciones, la epidermis se compone por epitelio estratificado que crece de forma continua hacia un proceso de descamación, la dermis por otra parte está compuesta por tejido conectivo denso que sostiene mecánicamente a la piel dándole resistencia y espesor (Knottenbelt & McGarry, 2009). Más profundo a la dermis se encuentra la hipodermis cuyo estrato contiene cantidades variables de tejido adiposo, otros componentes de la piel son los anexos cutáneos, entre ellos se encuentran los folículos pilosos, pelo, glándulas sudoríparas, glándulas mamarias y glándulas sebáceas (Figura 2). La epidermis está constituida por queratina que recubre la parte externa de la piel y actúa como barrera, las células cornificadas

son de espesor variable sumamente insolubles al agua y son la consecuencia de la diferenciación celular de los queratinocitos.

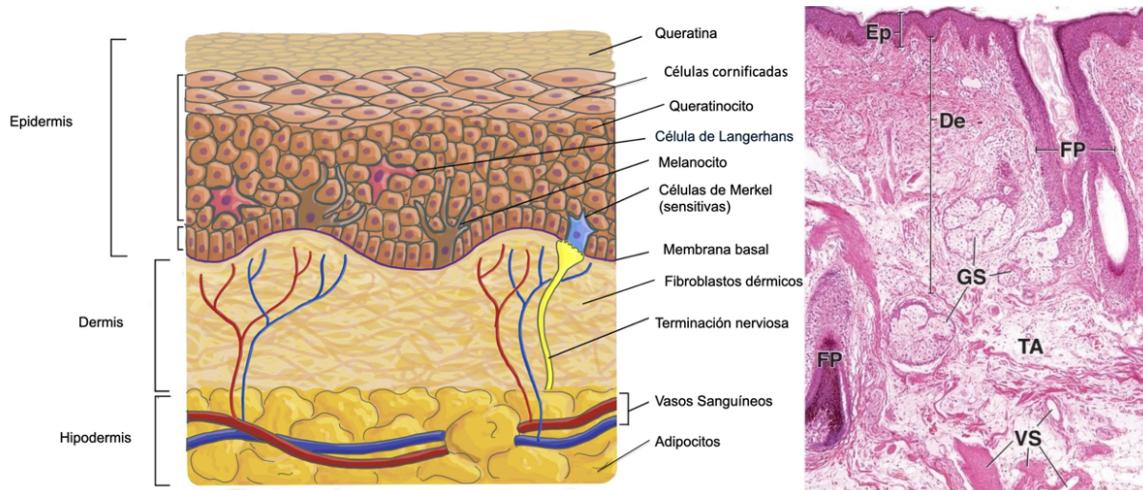


Figura 2. Estructura morfológica de la piel y sus componentes: Ep: epidermis, De: dermis, FP: folículo piloso, GS: Glándula sudorípara, TA: Tejido adiposo, VS: vasos sanguíneos. (Obtenido de la red y modificado de (Ross, & Pawlina 2015).

Los queratinocitos componen la capa más grande del estrato basal debido a las múltiples divisiones. Las células de Langerhans funcionan en los procesos inmunitarios y constituyen del 2% al 15% de las células epidérmicas, los melanocitos son células que se generan a partir de la cresta neural en la embriogénesis, las precursoras de estas células migran y se dispersan en el estrato basal de la epidermis, producen pigmento a partir de la generación de la eumelanina y la feomelanina cuyo biopolímero es derivado a partir de la oxidación de la tirosinasa en el aparato de Golgi, los melanocitos forman un complejo llamado unidad melanoepidérmica donde una célula melanocítica se asocia a una cantidad variable de queratinocitos a los cuales por medio de vesículas dona el pigmento por exocitosis, gracias a este complejo la piel tiende a adquirir su tono visual (Ross, & Pawlina 2015). Las células de Merkel son células dendríticas sensitivas también localizadas en el estrato basal y se conectan íntimamente con las terminaciones nerviosas. En la región llamada protuberancia folicular que reside en los folículos pilosos existe un fondo común de melanoblastos indiferenciados (citoblastos melanocíticos) y es regulada por la expresión de genes que son Factores de Transcripción de Caja Pareada (PAX3). Pax3 activa la expresión de Factores de

Transcripción de Macroftalmia (MITF), quienes desarrollan la melanogenia, estos melanocitos conservan la capacidad de duplicarse durante toda su vida solo que a velocidad más lenta. BcL2 es esencial en los citoblastos melanocíticos pues mantienen la población dentro de un nicho de prominencia en el folículo, su baja expresión genera apoptosis de los melanoblastos y disminución de la cantidad de melanocitos (Ross, & Pawlina 2015). La dermis superficial está compuesta por dos capas, la primera y más superficial se compone de finas y sueltas fibras de colágena, contraste a la dermis más profunda que se compone por fibras más densas, de acuerdo al sitio anatómico varía su grosor, la dermis es más delgada en los párpados del caballo, la porción medial de los muslos y axilas, en el cuello, en los glúteos y la región sacra presenta una tercera capa de fibras de colágena entrelazadas con finas fibras elásticas y reticulares, las células fibroblásticas comprenden la mayor parte de los componentes celulares de la dermis y son los responsables de secretar la matriz extracelular, es común la presencia de mastocitos, fagocitos, células de Langerhans y linfocitos, incluso puede haber presencia de neutrófilos que se distribuyen ocasionalmente en la dermis normal. La dermis está constituida de colágeno tipo I y tipo III, así como fibras de elastina y reticulina, glucosaminoglicanos, sulfato de dermatano y ácido hialuronato que son sintetizados por los fibroblastos dérmicos influenciados por el catabolismo y factores endocrinos (Ross, & Pawlina 2015).

2.5 Melanoma equino

El melanoma se presenta en varias especies, incluyendo humanos y perros, es considerada una enfermedad grave que conforme pasa el tiempo su pronóstico clínico se vuelve más reservado, en los equinos su comportamiento es diferente a otras especies, esta neoplasia se caracteriza por ser de crecimiento lento, generalmente aparece como nódulos únicos o múltiples en áreas específicas y crecen lentamente a lo largo de los años, teniendo la capacidad de permanecer inactivos por períodos prolongados. Afectan de forma negativa las funciones orgánicas por competencia de espacio e invasión, además de alterar la funcionalidad orgánica, alteran funciones importantes como la visión, la alimentación, la respiración, la defecación y la micción y esto depende directamente de su punto de ubicación. Los melanomas en equinos representan hasta el 15% de todos los tumores de piel en caballos, siendo más comunes en caballos de capa gris de edad avanzada, donde la prevalencia se

encuentra más allá del 80%, se presentan como masas esféricas firmes, de color variable, únicas, múltiples o unidas, que generalmente aparecen en la piel y el tejido subcutáneo de la región perineal y parótida, la parte inferior de la cola, el prepucio, la vulva y los labios. Pueden volverse malignos y extenderse a través de los vasos linfáticos, la sangre, localmente por crecimiento o la combinación de estas vías (Billi, *et al* 2021). Las células que generan los melanomas son los melanocitos que se originan a partir de células dendríticas que derivan de los melanoblastos neuro ectodérmicos que han migrado a la epidermis, la dermis y diferentes sitios durante el desarrollo en la embriogénesis, producen melanina en forma de pigmento que le da la tonalidad a la piel, los ojos y el pelo, la característica oscura le da la capacidad de absorber la luz UV y así impide que pase hacia la hipodermis, generando una barrera de protección contra los efectos nocivos de la radiación solar (Phillips & Lembcke, 2013). La transformación maligna que adquieren los melanocitos genera las neoplasias y la causa aún no es determinada completamente, por lo que se han asociado algunos factores de riesgo como las mutaciones genéticas, además de las asociaciones con el color del pelaje gris y el aumento a la exposición de la luz UV. En el caballo, la prevalencia de melanoma tiende a ser considerablemente más alta con relación a otras especies y con un gran impacto económico (Phillips & Lembcke, 2013). Los melanomas en caballos pueden ser benignos o malignos; el melanoma, cuando es benigno se conoce como melanocitoma, sin embargo, suele ser confusa la clasificación, algunas neoplasias benignas se han clasificado como nevos, lo que en humanos es equivalente a lunares (Groom & Sullins, 2017). Sin embargo, se considera que del 14 % al 66% de estas neoplasias pueden evolucionar y generar metástasis, convirtiéndose en malignas (Hollis, 2024). Se han sugerido cuatro categorías incluyendo una forma de nevo: Nevo melanocítico, Melanoma dérmico, Melanomatosis dérmica, y Melanosarcoma (Figura 3).

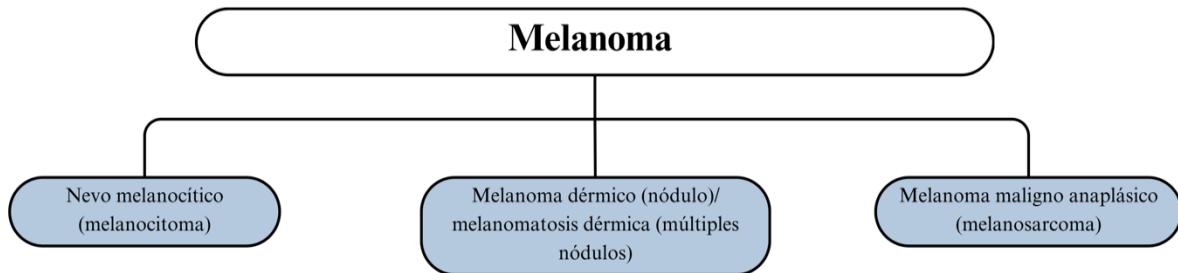


Figura 3. Diferentes nomenclaturas de las variantes de melanomas en equinos. (modificado de Knottenbelt *et al.*, 2015).

Además, se descubrieron tres tipos de nevos adicionales, este tipo de nevos llegaron a mostrar similitudes con algunos subgrupos de nevos que se encuentran en pacientes humanos y que raramente se llegan a encontrar en equinos (Knottenbelt *et al.*, 2015) (Groom & Sullins, 2017) (Metcalfe *et al.* 2013). Estos nevos adicionales son: nevo melanocítico común intradérmico, nevo azul celular, nevo azul celular combinado.

Existe un sistema de clasificación clínica en el cual se proponen 5 grados y se estima que estas neoplasias progresan hasta 0.3 grados por año (Tabla 1), (Hollis, 2024).

Tabla 1. Clasificación de los grados de melanoma y sus características clínicas. (Modificado de Hollis, 2024).

Clasificación propuesta para el grado de melanoma	
Grado de enfermedad	Descripción
0	Sin presencia de melanomas.
1	Etapa inicial, forma de placa, nódulo único, < 0.5 cm en ubicación típica.
2	Múltiples nódulos de 0.5 cm o un simple nódulo > 2 cm en una localización típica.
3	Uno o varios nódulos > 5cm intra o subcutáneos, en lugares típicos o en los labios.
4	Nódulos melanocíticos confluentes, extensos, con necrosis y ulcerados o metastásicos.
5	Excesivo crecimiento tumoral con superficies húmedas y ulceraciones.

A la generación de las neoplasias, también se les ha atribuido un origen poligénico, en donde se busca la expresión de diferentes genes que se expresan en melanomas humanos que

podrían ser utilizados como marcadores moleculares para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento, entre estos genes se encuentra el gen S-100, cuya proteína está presente en las células que se originan a partir de la cresta neural, cuyas células son; células de Schwann, melanocitos, condrocitos, adipocitos, células mioepiteliales , células dendríticas, macrófagos, y queratinocitos. La proteína S100 regula la fosforilación de proteínas que son factores transcripcionales, la homeostasis del calcio, actividades enzimáticas, crecimiento y diferenciación de las células, así como la respuesta inmunológica. Otra proteína involucrada es el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), es una proteína nuclear que se sintetiza en las fases G1 y S, para favorecer la síntesis del ADN en el ciclo celular, esta proteína es un cofactor de la ADN polimerasa delta, cuando el ADN se daña es reubicada y se integra a una vía de reparación (Garza, 2015). En los caballos tordillos, es la base genética de su coloración quien los vuelve predisponentes al desarrollo de neoplasias de melanoma, esta coloración es dada por una mutación que causa la duplicación en un fragmento de 4.6 Kb en el sexto intrón del gen sintaxina-17 (STX17), esta mutación genera una regulación a la alza, y como consecuencia la duplicación de los melanocitos, también esta duplicación aumenta la expresión del gen NR4A3 (receptor nuclear 4-A-3) proteína que participa en la diferenciación y proliferación celular que mejora la proliferación de los melanocitos.

Conforme los melanocitos proliferan, progresivamente se agotan las rondas de crecimiento por lo que se genera la despigmentación capilar, característica del pelaje blanco que adquieren los caballos conforme su edad avanza, esta sobreproliferación además predispone a una transformación neoplásica y al desarrollo de melanomas, el gen STX17 se encuentra en los melanomas equinos y su expresión aumenta conforme el tumor es más agresivo, cualquier caballo de color base con STX17 en un alelo o ambos, tendrá la tendencia a que su pelo sea blanco o motas de pelo gris. La proteína de señalización Agouti (ASP) que es una antagonista de los receptores de melanocortina (MC1R), regula la síntesis de pigmento, al reducir la activación de (MC1R), ya que interfiere con la unión de la hormona estimulante de alfa melanocitos (α -MSH), de acuerdo con lo anterior se considera que la proteína (ASP) esta codificada por la proteína de señalización Agouti (ASIP) quien permite la síntesis de pigmento capilar negro (eumelanina). Los caballos con alelos recesivos mutantes no tienen una inhibición normal de (α -MSH). Por lo tanto, la activación no restringida de MC1R que es impulsada por la mutación de ASIP puede aumentar el riesgo de melanoma (Hollis, 2024).

La mutación de ASIP aumenta el grado de melanoma 0.38/5 en homocigotos que aquellos sin la mutación, lo que teóricamente significa que, las bases genéticas del color constituyen un factor de riesgo en el desarrollo de melanomas, de acuerdo con los colores de capa, se consideran de mayor a menor riesgo: el tordillo, alazán, colorado y negro respectivamente. La prevalencia en cuanto a las razas pertenece a un 68% Carmargue, 75% Lipizanos y 100 % la pura raza española (PRE) (Hollis, 2024).

2.6 Sarcoide equino

El sarcoide equino es un tumor cutáneo que se presenta con mayor frecuencia y es generado a partir de células fibroblásticas y los queratinocitos epidérmicos, es considerada una neoplasia no metastásica, invasiva en forma local y de etiologías multifactoriales, la castración en potros es considerado un factor predisponente, así como el trauma, se ha reportado también la existencia de la evolución neoplásica espontánea. La mayoría de los caballos afectados suelen ser menores a 6 años, sin embargo, los caballos mayores son potencialmente predisponentes a desarrollar lesiones. Las lesiones involucran invasión local de la dermis, y tejidos subcutáneos, algunos resultan en ulceración y cuando las lesiones se encuentran cerca de los párpados y ojos perjudican la visión (Semik-Gurgul, 2020). Existe evidencia que involucra la causa mediada por la presencia del virus del papiloma bovino perteneciente al género de los deltas papilomavirus, la transcripción viral en sarcoides se asocia de forma directa a los virus del papiloma bovino tipo I y II (VPB-1 Y VPB-2) (Semik-Gurgul, 2020), (Munday *et al.*, 2024). Al ingresar a la célula, los genes tempranos (E) codifican a las proteínas no estructurales y los genes tardíos (L) a las proteínas que le dan estructura a la cápside viral. El gen E1 regula la replicación de los virus y el gen E2 regula la transcripción viral, los genes E4 codifican proteínas citoplasmáticas y los genes E5, E6 y E7 desempeñan un papel importante para la transformación de las células neoplásicas (Semik-Gurgul, 2020). El principal mecanismo latente a la presentación de la carcinogénesis del VPB es la unión entre la proteína E5 y el receptor del factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGF β -R). formando un complejo estable entre la proteína y el receptor, la dimerización entre ambos genera la activación, reclutamiento de señalizaciones celulares y de proteínas proliferativas. Se ha demostrado la presencia de las dos proteínas en los sarcoides, además de la evidencia de la fosforilación por receptores, la expresión de la vía

molecular P13K-AKT-Ciclina D3 (la cual en humanos se relaciona su desregulación con la progresión del ciclo celular en una variedad de neoplasias), además de la activación de algunos factores de transcripción específicos, una activación de PDGF β -R que activa a su vez a la proteína quinasa activada por mitógenos MAPK p38, involucrada en procesos como el ciclo celular, motilidad celular y un comportamiento invasivo (Knottenbelt *et al.*, 2015). Los sarcoideos tienen la capacidad de invadir localmente la dermis y el tejido subcutáneo y está demostrado que la expresión de genes virales aumenta la expresión de los genes de la metaloproteinasa de matriz, como sucede en el Virus del papiloma humano (HPV-8) por el oncogén E7 que se asocia con la invasión de queratinocitos, en los tejidos de sarcoideos en equinos se piensa que es similar por la infección del HVP-1 y su expresión viral génica, esta invasión está asociada a la sobreexpresión de los genes de las metaloproteinasas de matriz (MMPs-2, 9 y 14) y el gen inhibidor de la metaloproteinasa TIMP-2 que inducen a la invasión de los fibroblastos y los niveles aumentados de colágeno tipo I y tipo III. Las heridas que normalmente cicatrizan contienen colágeno tipo III con muchos miofibroblastos. En los procesos de cicatrización patológica donde la característica es queloide, las cicatrices consisten en haces de colágena tipo I y III con poca cantidad de miofibroblastos. La matriz extracelular (ECM) está involucrada en la producción y degradación de colágeno por lo que un desequilibrio en ECM y una anormal expresión de los genes MMPs y TIMP-2 juegan un papel crucial en la patogénesis de los sarcoideos (Semik-Gurgul 2020). En caballos, se ha reportado que la cadena pesada del MHC-I es inhibida desde la transcripción además de la retención intracelular del MHC-I en los fibroblastos de caballos por la proteína E5, evadiendo así la inmunovigilancia. La proteína E6 es además un factor transcripcional con la capacidad de inhibir la función de P53 al interferir con un coactivador de transcripción CBP/p300, por lo que esta proteína puede llegar a tener una actividad anti apoptótica, al interferir con el sistema de señales antiproliferativas normales de las células (Knottenbelt *et al.*, 2015), (Semik-Gurgul, 2020). En función de su apariencia morfológica y localización, el sarcoide se puede clasificar en 7 formas distintas, de las cuales dos cuentan con subcategorías, en principio el nombre asignado corresponde al tipo de neoplasia única, cuando se encuentran más de dos, o dos neoplasias donde no existe un tipo predominante se clasifica como una neoplasia mixta (Figura 4). Los caballos individualmente pueden llegar a presentar varios tipos diferentes al mismo tiempo. La variación en la presentación clínica significa que cada

tipo de sarcoide tiene su propio conjunto de diagnósticos diferenciales (Knottenbelt *et al.*, 2015), (Munday *et al.*, 2024).

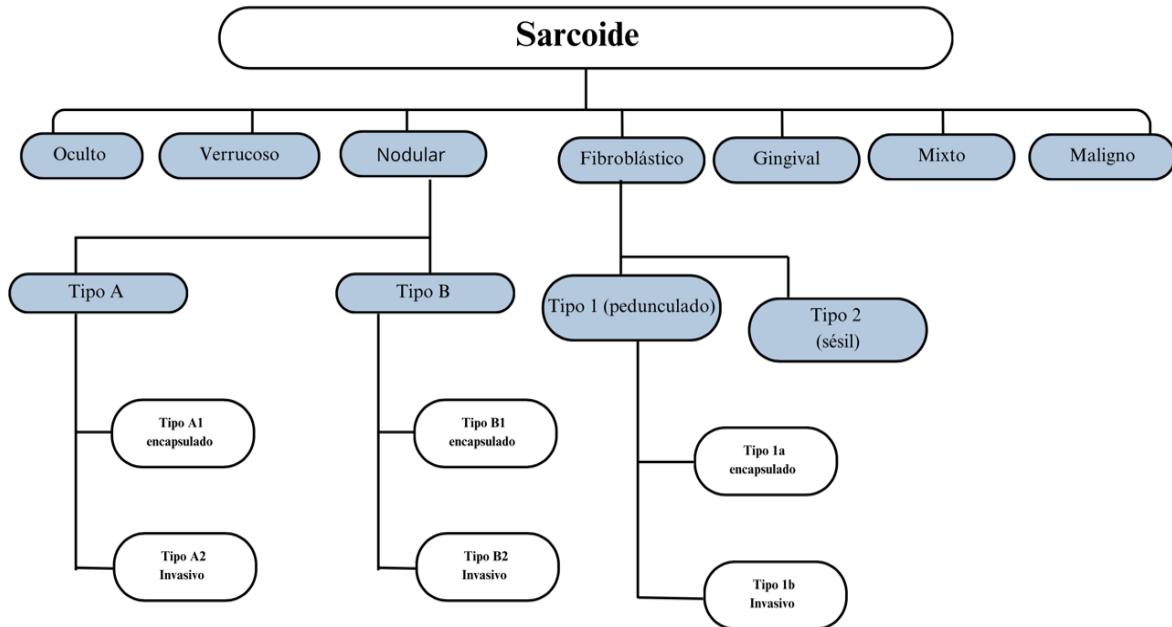


Figura 4. Variantes clínicas del sarcoide equino y sus sub-diferenciaciones. (modificado de Knottenbelt et al.,2015), (Munday et al., 2024).

2.7 Gen WT1 y sus mecanismos de expresión diferencial

El gen WT1 codifica una proteína con un dominio N-terminal involucrado en interacciones con el ARN y otras proteínas, este dominio es un factor de transcripción que se encuentra involucrado en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis en la que se involucra la activación o supresión de otros genes importantes en diferentes neoplasias. Esta proteína posee un dominio carboxilo-terminal (C-Terminal) importante para la interacción con el ADN el cual se une a las dianas del ADN a través de 4 dedos de zinc, Además estos dedos de zinc tienen la capacidad de interactuar con el ARN y otras proteínas. Estos procesos moleculares son cruciales ya que dan origen a diferentes funciones y como consecuencia la generación de diferentes isoformas. Las isoformas de WT1 son creadas a través de una combinación de sitios de inicio de traducción y la edición, el primer sitio de edición ocurre en el exón 5 y genera una región de 51 pares de bases que codifica a 17 aminoácidos (17AA), el segundo se da entre los exones 9 y 10, entre el tercer y cuarto dedo de zinc y codifica una secuencia pequeña de tres aminoácidos, KTS (Lisina, Treonina y Serina). La combinación

de la presencia (+) o ausencia (-) de las regiones 17AA y la región KTS genera cuatro isoformas distintas, estas isoformas fueron denominadas (WT1-17AA + KTS +), (WT1-17AA – KTS +), (WT1-17AA + KTS –) (WT1-17AA – KTS –) (Toska & Roberts, 2014), (Hastie, 2017), (Zhang *et al.*, 2020), (Wang *et al.*, 2023), (Davies *et al* 2000). WT1 puede actuar como activador transcripcional o como represor, en los dominios que van desde los aminoácidos 71-101 actúa como regulador represor y en el dominio 180-250 actúa como activador, en líneas celulares se ha demostrado que WT1 cumple funciones de interacción con coactivadores, correpresores y otros factores transcripcionales, incluyendo a P53 (TRP53) que es un gen supresor de tumores el cual regula la división celular y la apoptosis (Hastie, 2017). WT1 genera proteínas de diferentes pesos moleculares, el gen de WT1 tiene 3 sitios en los cuales se inicia la transcripción que dirigen la síntesis de proteínas con pesos moleculares diferentes, generando así una proteína típica de 54 kDa, una de mayor de 62 kDa y una pequeña 36 kDa (Hastie, 2017). Otro mecanismo de expresión diferencial de WT1 es un proceso de metilación, este mecanismo se genera con motivo de una reacción química que consiste en la unión de grupos metilo a moléculas del ADN y otras proteínas, en el ADN puede afectar la expresión génica y de proteínas, así como su estructura y función, tiene mucha relevancia en procesos de enfermedad, la mutación de WT1 lleva a la mutación de genes que codifican proteínas de la familia Tet metilcitosina dioxigenasa (TET) incluyendo TET2 e IDH 1 y 2 (Proteínas isocitrato deshidrogenasa I y II), son esenciales para la conversión de la 5-Metilcitosina (5mC) en el genoma a 5-Hidroximetilcitosina (5hmC), lo que conlleva a una mayor expresión génica, WT1 recluta a TET2 para dirigirse a los genes y así activar su expresión, por lo que se piensa que funcionan en la misma vía, la pérdida de función de WT1, TET2 y TET3 reduce la producción de (5hmC) y como consecuencia una alteración en la expresión sobre las islas CPG en el promotor de WT1 localizadas en el primer exón (Figura 8).(Hastie, 2017).

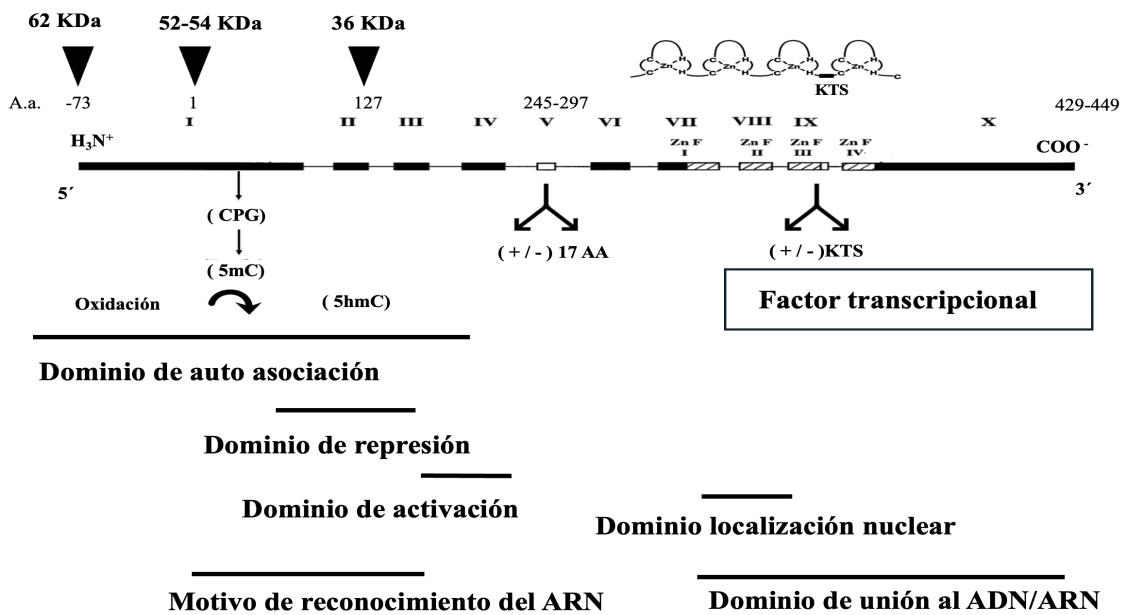


Figura 8. Variantes de expresión diferencial de WT1. Se identifican las regiones de las múltiples isoformas de WT1, así como los sitios de inicio de transcripción de las proteínas de diferentes pesos, regiones de translación, adición y eliminación (Wagner & Wagner, 2020) (Hastie, 2017).

2.8 Gen WT1 y sus funciones

El gen del Tumor 1 de Wilms (WT1) fue identificado por vez primera en 1990 por Max Wilms, (Hastie 2017) como un gen candidato a la fuerte predisposición del tumor de Wilms, también conocido como nefroblastoma. Es un gen con mucha riqueza molecular y versatilidad, biológicamente es muy útil ya que cuenta con diferentes actividades de acuerdo con el contexto en el que se encuentre, ya sea durante el desarrollo, enfermedad o su participación en procesos neoplásicos (Hastie, 2017). WT1 cumple una función importante en el desarrollo y la homeostasis en distintos tejidos y órganos, sin embargo, su mutación puede conducir a la enfermedad (Hastie, 2017), se expresa en una variedad de tumores y neoplasias en niveles muy altos por lo que muchas terapias inmunitarias se han tratado de dirigir a sus epítopos. Se expresa en una gama amplia de tumores que derivan de diferentes tejidos, como lo son: Tejido epitelial mesenquimal, hematopoyético y neuronal, por lo que se le atribuye un rol dual como oncogén y como supresor tumoral. Su funcionalidad es importante y se ha utilizado como un blanco terapéutico en neoplasias como melanoma en humanos y en otras especies, en los mamíferos se ha demostrado que está conformado hasta por 10 exones en donde potencialmente pueden llegar a existir hasta 36 isoformas diferentes,

sin embargo, todas las isoformas incluyen cuatro dedos de zinc similares, estos dedos de zinc pertenecen a la familia (SPI) que son un grupo de factores transcripcionales de dedos de zinc en los dominios con extremo C-terminales altamente conservados. Participa en el metabolismo del ARN con funciones de regulación post transcripcionales y juega un papel importante como regulador transcripcional dicotómico de genes específicos e interacciona en sociedad con otras proteínas y genes importantes (Toska & Roberts, 2014). En un contexto oncogénico, la eliminación de la proteína WT1 por medio de oligonucleótidos anti sentido genera como consecuencia el aumento de la apoptosis de las células cancerosas y la detención del ciclo celular en la fase G1, en este sentido se demostró que WT1 está regulado de forma transcripcional en altos niveles bajo las condiciones de poco oxígeno por el factor inducible por hipoxia (HIF), además WT1 tiene un importante papel en la angiogénesis tumoral y la vascularización, regulando el nivel de las isoformas anti angiogénicas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también, se han generado vacunas peptídicas que reprimen el crecimiento de los tumores de leucemia, pulmón y cáncer de mama dirigidas a WT1 (Toska & Roberts, 2014). Como supresor tumoral WT1 se encuentra mutado de forma puntual entre los dedos de zinc 2 y 3 en el síndrome de Denys y Drash, una enfermedad genética que es caracterizada por generar nefropatías, tumor de Wilms y anomalías genitales, esta mutación genera proteínas truncadas y aminoácidos sustituidos que actúan de manera negativa y de forma dominante inhibiendo la función de la proteína típica de WT1 expresada en el alelo restante, en este contexto WT1 es capaz de inducir la supresión del crecimiento celular y la carcinogenicidad, para comprobar esta función de WT1, McMaster y colaboradores en 1995 introdujeron de forma estable la isoforma WT1 KTS (+) en células G401, cuya células son derivadas de una línea celular tumoral de riñón ausente de WT1 endógeno, en este estudio provocaron una alteración en la morfología celular y redujeron la formación de tumores en ratones a tímicos desnudos (McMaster *et al* 1995), (Yang *et al.*, 2007). WT1 actúa como represor y activador en los procesos transcripcionales. Las proteínas PINCH1 (Nueva Proteína Rica en Cisteína-Histidina 1) y LIMS1 (dominios similares al antígeno celular senescente 1) las cuales son factores de unión que interactúan con WT1 y además son capaces de regular su actividad transcripcional, LIMS1 ejerce una función adaptadora que se expresa en podocitos, al interactuar con WT1 reprime la expresión del gen Podxl (proteína 1 similar a la podocalixina) cuya función está relacionada directamente con

la adhesión y la migración de células. Por otra parte, la proteína de reclutamiento de membrana AMER1 o WTX (supresor tumoral de wilms en el cromosoma X) también tiene la capacidad de modular la actividad transcripcional de WT1 en la que mejora la activación transcripcional de la anfiregulina (AREG), cuya proteína regula el crecimiento celular y la inflamación en un contexto de daño celular y cancerígeno. WT1 también desarrolla una función como cofactor transcripcional, tras existir daño en los podocitos, la proteína WTIP (proteína de interacción con WT) es expresada en las uniones celulares sobre la superficie celular, sin embargo, se desplaza al núcleo en donde interactúa con WT1, esta interacción genera una represión transcripcional en la que WT1 actúa como correpresor en la lesión de podocitos (Figura 5), en cuanto a este mecanismo se sugiere que la proteína WTIP monitorea el daño en los podocitos y mantiene su integridad, no está claro si existe un papel intermedio para WT1 en citoplasma, lo que sí se sabe es que WT1 puede interactuar con diferentes socios sobre la periferia celular como a nivel nuclear (Toska & Roberts, 2014).

Represión:

Interactúa con factores transcripcionales y genera complejos correpresores



Figura 5. Representación gráfica de la función de WT1 como represor transcripcional. Mecanismo en conjunto con otros factores transcripcionales. (modificado de Hastie 2017).

Durante la regulación transcripcional WT1 interactúa con P53 generando estabilidad a través de la unión con los dedos de zinc, este mecanismo mejora la apoptosis en el daño celular por radiación UV (Figura 6). P53 por su parte también tiene la capacidad de unirse a los dedos de zinc de WT1 y reducir la capacidad transcripcional al disminuir su unión al ADN, lo que sugiere que la unión de WT1 a proteínas como P53 está vinculada a una respuesta al desarrollo de tumores y al estrés. Lo que no está claro es si este mecanismo requiere el

reclutamiento de WT1 en la región promotora de acuerdo con las necesidades de P53, sin embargo, es relevante sobre todo en función de las proteínas de WT1 que carecen del dominio de unión al ADN mutadas (Toska & Roberts, 2014). En el metabolismo del ARN, WT1 también tiene un papel fundamental, en algunas motas nucleares, se descubrió la isoforma WT1 KTS + con antígenos Sm (ribonucleoproteína nuclear pequeña), está presencia de WT1 en motas nucleares es una característica que comparte con los factores de empalme y que interactúa con U2AF65 (regulador de empalme) cuyo factor es preciso para los sitios de corte y empalme en el ARN pre mensajero, WT1 también es socio del factor de empalme WTAP (proteína asociada a WT1), ambos localizados en motas. En este mismo sentido, KTS + interactúa con una proteína de unión al ARN y con RBM4 (proteína de motivo de unión al ARN), por lo que es capaz de inhibir el efecto de RBM4 durante el empalme alternativo y modular a través de sus interacciones el empalme alternativo (Figura 7). (Toska & Roberts, 2014).

Activación

Unión directa al ADN
se une a otros factores de transcripción y
genera complejos coactivadores



Figura 6. Función de WT1 como factor transcripcional. Mecanismo conjunto con un complejo coactivador. (modificado de Hastie 2017).

Regulación postranscripcional

Estabilidad del ARN

unión directa al ARN e interacción directa con 3'UTR del ARN

Rol potencial en el empalme y la traducción

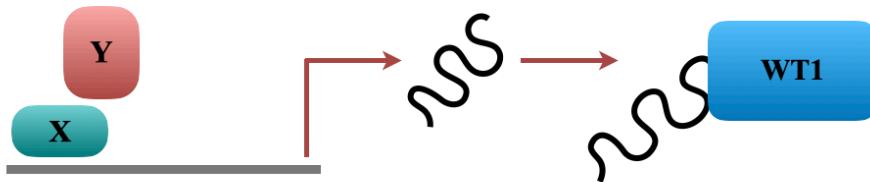


Figura 7. Función post transcripcional de WT1. En este mecanismo WT1 actúa como regulador de la estabilidad en el ARN, así como posiblemente en la degradación, empalme y traducción del ARN. (Modificado de Hastie 2017).

2.9 WT1 en equinos

Los estudios realizados previamente han detectado la expresión del gen WT1 en muestras de riñón equino, piel sana y sangre; sin embargo, en melanoma su expresión por PCR es negativa, contrario a lo que ha sucedido en otras especies. Por un análisis de Dot-Blot se observó positividad en dos muestras de piel sana de equinos en las cuales se comparó con tejidos de melanomas en cuyas neoplasias el resultado fue negativo para la expresión de la proteína de WT1. (Garza, 2015). Se detectó además la presencia de WT1 de forma basal en diferentes estructuras de piel sana a través de un ensayo densitométrico por inmunohistoquímica, en este mismo estudio y contrariamente a lo que se ha reportado en humanos, no se encontró expresión de WT1 en neoplasias de melanoma de equinos (Rangel, 2017). En melanomas de caballos con distintos colores de capas, entre ellos el tordillo, y la piel sana, se analizó la expresión de ARNm de WT1, concluyéndose que éste se expresa en todos los componentes de piel normal del caballo, con una expresión mayor en las tonalidades más oscuras. Se demostró además que el ARNm de WT1 se expresa en el melanoma equino y sus diferentes estadios, con una mayor expresión en las neoplasias menores a 2 cm², así como en caballos de capas distintas al tordillo y en caballos jóvenes de 1 a 4 años, en comparación con los adultos mayores a 8 años. Por inmunohistoquímica, se observaron variaciones en la expresión de la proteína WT1 en la piel y el melanoma, estas variaciones incluyen positividad en melanocitos de la piel sana con un patrón de tipo nuclear y citoplasmático; en cuanto a los melanomas, se observaron diferencias de expresión entre los

estadios de las neoplasias, indicando que se manifiesta en períodos específicos durante el desarrollo del melanoma (Marín, 2021).

2.10 PPAR beta delta

Se han estudiado otros mecanismos de expresión diferencial que tiene WT1, en los que sobresalen las interacciones con los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) que son un grupo de receptores nucleares hormonales de los cuales se generan tres isoformas distintas, estas isoformas son: PPAR β/δ (NR1C2), PPAR α (NR1C1), y PPAR γ (NR1C3), los PPARs ejercen funciones diferentes que dependen de la distribución en el tejido, los cofactores y la disponibilidad de ligandos, se expresan principalmente en el hígado, corazón, riñón, tejido adiposo marrón e intestino, regulan la homeostasis energética que es mediada por el catabolismo de ácidos grasos y además estimulan la gluconeogénesis. Un estudio demostró que PPAR β/δ se heterodimeriza con el gen X de retinoides (RXR) para unirse a ligandos específicos y posteriormente regular la transcripción de WT1 (Figura 9). (Wagner & Wagner, 2020) (Zoete *et al* 2007).

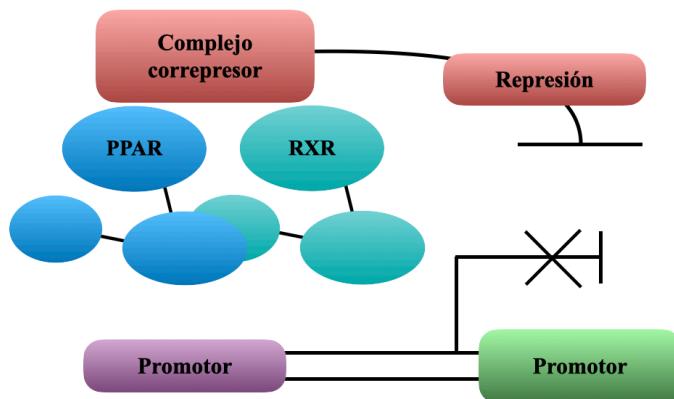


Figura 9. Mecanismo de PPAR β/δ en conjunto con el RXR. Dimerización de PPAR β/δ y el RXR con ligandos específicos al promotor para generar el complejo correpresor de la región de transcripción. (Tafur, 2021) (Zoete *et al* 2007).

En el melanoma humano se ha detectado una alta expresión de PPAR β/δ en comparación con la piel sana, también se ha demostrado que la activación de los PPAR con el uso de GW0742 Y GW501516, ambos agonistas de PPAR, inhiben la proliferación de células de melanoma tras la activación, esta inhibición es directamente debido a la represión transcripcional del gen supresor de tumor de Wilms (WT1) por PPAR β/δ y los genes diana que se expresan río abajo de nestina y zyxina (Wagner & Wagner, 2020). (Michiels *et al.*, 2010).

2.11 PPAR beta delta en equinos

Existe una caracterización del gen del receptor activado por proliferador de peroxisomas beta delta de caballos (PPAR β/δ) cuya función principal es regular la β -oxidación, actúa sobre la transformación de las fibras musculares y la resistencia al esfuerzo extenuante, cuenta con un dominio de dedo de zinc C4 y un dominio de unión a ligandos, cuyas estructuras funcionales se encuentran bien conservadas en el caballo (Cho *et al.*, 2015). Rangel en el 2017, comparó la expresión de la proteína PPAR β/δ en la piel sana de equinos y encontró que la proteína se encuentra expresada en sus diferentes componentes estructurales; glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos, dermis y epidermis, en este estudio también encontraron que existe una marcada inmuno expresión de PPAR β/δ en neoplasias de melanoma de quinos. Otro estudio realizado por medio de PCR en tiempo real comparó la expresión del ARNm PPAR β/δ en muestras de piel sana de caballos con acondicionamiento físico contra caballos sin acondicionamiento físico, incluyendo su expresión en neoplasias de melanoma de equinos. Se demostró que la expresión génica del ARNm de PPAR β/δ es mayor en caballos sometidos a acondicionamiento físico en comparación con los caballos que no estaban expuestos a esfuerzo físico extenuante. En este mismo estudio, también se comparó la expresión entre grupos de caballos de piel sana y melanomas, en el cual se encontró una mayor expresión del ARNm de PPAR β/δ en neoplasias de melanoma en comparación con las muestras de piel sana, indicando así una relación fuerte y estrecha entre PPAR β/δ y el desarrollo de melanomas en equinos, que involucra la posible modulación y aumento de expresión en los caballos que se encuentran sometidos a acondicionamiento físico o rutinas de esfuerzo constantes (Tafur, 2021).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los estudios con respecto a la salud equina han tenido mayor relevancia debido a su espaciado, interés económico, afectivo y social. El melanoma y el sarcoide son neoplasias en equinos que tienden a generar mayores complicaciones clínicas, además de ser un problema estético que los convierte en las quejas más frecuentes para los veterinarios. Actualmente la resección quirúrgica es el tratamiento de elección en la mayoría de estas neoplasias, sin embargo, se debe considerar el período posoperatorio que conlleva, el tamaño del tumor, su ubicación, la variante clínica y su grado de malignidad.

Otro punto importante para considerar son las posibles secuelas y la resolución neoplásica, así como la reincidencia en el caso de las variantes de neoplasias malignas.

Se han hecho estudios en esta línea de investigación enfocados en dilucidar el comportamiento de WT1 en la piel sana de caballos y en neoplasias de melanoma, ya que podría ser utilizado como un objetivo molecular importante involucrado en el desarrollo de neoplasias en la piel sana del equino, marcador diagnóstico y como blanco terapéutico. WT1 es un gen muy versátil en cuanto a su funcionalidad como represor coactivador, activador y correpresor de genes involucrados en la supresión de tumores y también como oncogén, por lo que sus funciones dependen directamente de sus variantes de expresión diferencial. Por lo tanto, identificar los mecanismos de expresión diferencial que influyen directamente sobre sus variantes funcionales como oncogén o como supresor, nos permite dilucidar el rol biológico de WT1 en piel sana con respecto al sarcoide y melanoma equino.

3.1 HIPÓTESIS

Existe una regulación diferencial de la expresión de WT1 entre piel sana con respecto al sarcoide y melanoma equino.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar si WT1 desempeña un rol como gen supresor tumoral en piel sana, en comparación con sarcoide y melanoma equino.

3.2.1 Objetivos específicos

1. Realizar el diagnóstico Histopatológico de los tejidos obtenidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino.
2. Determinar la distribución subcelular de *WT1* y de *PPAR-β/δ* en muestras de tejido de piel sana, sarcoide y melanoma equino en diferentes estadios.
3. Analizar la expresión del ARNm de *WT1* expresión total y sus isoformas (KTS +/-, E5 +/-) en tejidos de piel sana con respecto a melanoma y sarcoide equino.
4. Analizar la metilación *WT1* ubicado en la isla CPG del exón 1 en tejidos de piel sana, con respecto a melanoma y sarcoide equino.
5. Analizar la expresión del ARNm de *PPAR-β/δ* en tejidos de piel sana, con respecto a melanoma y sarcoide equino.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Aprobación ética

Los protocolos del estudio fueron aprobados por los comités de bioseguridad e higiene y bioética y bienestar animal con los números de aprobación RC-CBSH-001 Rev. 00-05/22 y RC-CBYBA-001 03/22, además del consentimiento informado de los propietarios de los caballos considerados en el estudio.

4.2 Lugar de procesamiento de muestras

Este estudio se realizó en los laboratorios de Histopatología, Genética y el Hospital de Grandes Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, todos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.3 Área y tiempo de muestreo

El estudio se realizó con pacientes remitidos al HGE FMVZ de la UANL. Así como caballos pertenecientes a cuadras, criaderos y centros ecuestres del estado de Nuevo León en un lapso de 1 año y 6 meses.

4.4 Metodología

4.4.1 Obtención de las muestras

Todos los caballos candidatos fueron sometidos a una evaluación clínica general, se utilizó un protocolo de sedación y rescisión quirúrgica donde se extirparon las neoplasias y las muestras de piel sana acorde a lo establecido por Knottenbelt en el 2015 y Groom en el 2017. Los tejidos se reclutaron y se conservaron en formol bufferado para los estudios histopatológicos y congelación a -20 °C para el procesamiento molecular, fueron analizados por histopatología, inmunohistoquímica y por RTqPCR.

4.4.2 Rescisión quirúrgica y biopsias

Se utilizaron instrumentos quirúrgicos convencionales bajo protocolos de anestesia de acuerdo con las condiciones, localización y características de las neoplasias. Para las

neoplasias pequeñas en regiones de fácil acceso se realizó un protocolo de sedación con Xilacina 100 mg/ml (0.5 mg/kg IV) o Detomidina 10 mg/ml (0.04 mg/kg IV) combinado con Butorfanol 10 mg/ml (0.02 mg/kg IV), además de un bloqueo con clorhidrato de Lidocaína 20 mg/ml (0.2 mg/kg SC) localmente o sobre ramas nerviosas adyacentes a la neoplasia. Para los pacientes con melanomas de la región perianal y caudal, se realizó un protocolo de extirpación quirúrgica en pie, los caballos que participaron en estos procedimientos fueron evaluados clínicamente y programados para ser abordados quirúrgicamente bajo las siguientes condiciones, se contabilizó el número de nódulos neoplásicos y el tamaño. Mediante palpación rectal se determinó la existencia de invasión de nódulos sobre el recto, también se les realizó ultrasonido transrectal y se evaluó la delineación sobre la serosa rectal. Se administró por sonda nasogástrica 48 y 24 horas previo a la cirugía, agua y Dioctilsulfosuccinato de sodio (DSS) 100 mg/ml (100 mg/kg PO, BID), la dieta fue modificada y durante 5 días posteriores a la cirugía se adicionó en el alimento aceite mineral dos veces al día, el tratamiento postoperatorio se manejó con Flunixin de meglumina 50 mg/ml (1.1 mg/kg IV, BID), Penicilina G procaínica 300,000 UI (22.000UI/kg IM, SID) y Sulfato de Gentamicina 100 mg/ml (6,6 mg/kg IV, SID). El procedimiento anestésico se realizó con Detomidina 10 mg/ml (0.04 mg/kg IV) y en algunos casos se combinó con Butorfanol 10 mg/ml (0.02 mg/kg IV), se colocó un catéter epidural para la administración de Lidocaína 20 mg/ml (0.2mg/kg SID) y se monitoreó la sensibilidad y el monitoreo de actividad del tono parasimpático (PTA) durante el procedimiento. Las neoplasias fueron liberadas cuidadosamente sobre la región perianal por medio de disecciones sobre los márgenes tumorales buscando extirpar las masas en su totalidad. Al final de la recisión se reconstruyeron los planos incididos por medio de suturas. En los sarcoides de la región inguinal y sobre el prepucio de algunos pacientes, se optó por procedimientos quirúrgicos con protocolos de anestesia total intravenosa o inhalada, debido al difícil acceso y el margen tumoral profundo. A estos pacientes se les indujo a la anestesia con Xilacina 100 mg/kg (1.1 mg/kg IV), Diazepam 5 mg/ml (0.03 mg/kg IV) y Ketamina 100 mg/ml (2.2 mg/kg IV), una vez en decúbito dorsal se realizó la rescisión total de las neoplasias y se reconstruyeron los planos anatómicos incididos mediante una técnica de extirpación quirúrgica convencional.

4.4.3 Histopatología

Las muestras obtenidas fueron almacenadas y etiquetadas en frascos de vidrio, se fijaron en formol al 10% bufferado con un pH de 6.9 a 20 °C, 24 horas después se realizó un corte macroscópico en longitudinal y transversal del tejido, los tejidos cortados se procesaron en un histoquinete automático, programado para fijar, deshidratar, aclarar y diafanizar los tejidos respectivamente durante un lapso de 24 horas. De estos tejidos, se generaron cassetes con tejidos incluidos en parafina de los cuales se realizaron cortes microscópicos de 4 mm, los cortes se introdujeron a baño maría y se colectaron del agua con portaobjetos en los cuales se realizó un proceso de fijación, re hidratación, aclaramiento y tinción con hematoxilina y eosina; para los tejidos de melanomas se realizó una despigmentación con permanganato de potasio ($KMnO_4$) y solución de ácido sulfúrico (H_2S0_4) tratada con ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) como lo establecido por Moreira *et al.*, 2019. Se observaron los cortes histológicos bajo un microscopio de luz, y finalmente se identificaron y se diagnosticaron las variantes histológicas en cada una de las laminillas generadas (Meuten, 2017). (Moreira *et al.*, 2019).

4.4.4 Inmunohistoquímica

Para la técnica de inmunohistoquímica, en la cual se buscó la detección de WT1 y PPAR β/δ se utilizó un anticuerpo monoclonal primario de ratón WT1-6FH2 de Bio SB ® y para PPAR β/δ se utilizó un anticuerpo monoclonal primario de ratón F-10 SC-74517 de Santa Cruz Biotechnology ®. La fase preanalítica de la técnica inmunohistoquímica consistió en la obtención de la muestra, la fijación de los tejidos, descalcificación y seccionamiento. En la fase analítica, los tejidos fueron desparafinados a una temperatura de 60° C por un lapso de 20 minutos, una vez desparafinados se sometieron a inmersión en xilol por un tiempo de 5 minutos dos veces, se introdujeron en etanol al 100% por 3 minutos, seguido de una inmersión en etanol al 95% durante 3 minutos, etanol al 70% por 3 minutos y en agua destilada por 3 minutos con la finalidad de rehidratar los cortes, se lavaron los tejidos con solución salina tamponada de Tris (Tween-20) (TBST) durante 3 minutos. Para la recuperación de los antígenos se introdujeron las laminillas en una solución compuesta por 100mM de Tris, 10mM de EDTA a 10x con pH de 9.0 diluida a 1x durante 60 minutos a una temperatura de 100 °C. Con la finalidad de eliminar la peroxidasa endógena de los tejidos, fueron incubados en peróxido de hidrogeno al 3% durante 10 minutos y posteriormente se

lavaron con solución buffer TBST durante 5 minutos dos veces, a cada una de las laminillas se les aplicó un bloqueador de proteínas endógenas incluido en el kit Mouse/Rabbit Immuno-detector DAB HRP Brown® por 30 minutos, para ambas proteínas se utilizó suero anti ratón a una dilución de 480 µl en 1,920 µl de solución salina tamponada y se dejaron escurrir. El anticuerpo primario se añadió en una dilución de 1:100 para WT1 6F-H2 y para PPAR β (F-10) se realizó una dilución de 1:400 los cuales se incubaron durante 16 horas a 4 °C, para los controles negativos se hizo una sustitución del anticuerpo primario por solución salina tamponada, posterior a las 16 horas de incubación se lavaron los tejidos con solución salina tamponada Tween 20 durante 3 minutos dos veces, para cada anticuerpo se añadió en los tejidos un anticuerpo secundario, para WT1 se agregó una dilución de 1:50 de suero anti-ratón y para PPAR- β/δ se utilizó una dilución 1:200 de suero anti-ratón los cuales se dejaron en incubación durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con TBST durante 3 minutos, se añadió estreptavidina-HRP y se dejó incubar durante 30 minutos, después las muestras se lavaron con TBST durante 3 minutos y se les añadió el revelador de sustrato-cromógeno DAB 3'-3-diaminobencidina a una concentración del 5% durante 10 minutos, para generar una contra tinción, las laminillas se lavaron con agua destilada durante 2 minutos 3 veces, se sumergieron en hematoxilina por 2 minutos y se enjaguaron con agua corriente, después se enjuagaron con agua destilada y se deshidrataron gradualmente con etanol al 70%, 90%, 100% y finalmente en Xilol, el exceso de xilol fue removido y secado para finalmente colocar resina sobre el tejido en el portaobjeto y montar el cubreobjetos, una vez terminadas las laminillas se almacenaron en la oscuridad. Para el análisis de cada una de las proteínas en los distintos tejidos, se utilizó un microscopio óptico y una cámara ZEISS Axiocam ® con el software ZEN de ZEIS ®. Los resultados se compararon con controles positivos y fueron cuantificados mediante un análisis densitométrico, el cual permitió evaluar la intensidad de la positividad nuclear y citoplasmática de las proteínas de WT1 y PPAR β/δ con la ayuda del programa ImageJ por triplicado.

4.4.5 Análisis molecular

4.4.5.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se realizó la extracción del ARN mensajero (ARNm) a partir de los tejidos con fenol e isotiocianato de guanidina bajo las condiciones del método Trizol®, el ARNm obtenido fue

cuantificado mediante el kit QuantiFluor ARN System ® para medir la concentración del ARN por el método de espectrofotometría, el cual está diseñado para medir en un rango de; 01-500 ng/μl de ARN a partir de una muestra de ARN de 1μl a 260 nm de absorbancia. Después de obtener un coeficiente de 50 ng/μL de ARN, se generó la síntesis de ADN complementario utilizando y siguiendo las especificaciones por el fabricante del kit comercial GoScrip Reverse Transcription System de Promega® con la clave de producto (A5001). El ADNc sintetizado fue cuantificado con el kit comercial QuantiFluor DNA System de promega ®, y se midió su concentración por medio de espectrofotometría en busca de un coeficiente de 50 ng/μl, suficiente para el análisis de PCR en tiempo real.

4.4.5.2 RTqPCR para WT1 y PPAR β / δ

Para este análisis, se utilizó el kit GoTaq qPCR Máster Mix BRYT Green ®, junto con primers generados en el programa PRIMER-BLAST, a partir de secuencias utilizadas en investigaciones previas (Tabla 2). Como control, se utilizó β-actina equino para amplificar un fragmento de 215 pares de bases (pb). Para cada gen se estandarizó un programa de amplificación de la siguiente forma; un volumen de reacción de 20μl que contenía 50 ng/μl de ADNc, 10μl de GoTaq qPCR Máster Mix ®, 500 nM de primer forward, 500 nM de primer reverse y agua libre de nucleasas para aforar a un total 20 μl. Las condiciones de amplificación para los genes fueron de 40 ciclos, una pre-incubación a 50 °C por 2 minutos, la desnaturización fue a 95 °C por 10 minutos y una extensión de 1 minuto, las temperaturas de alineamiento fueron; 63 °C para β-actina, 55 °C para WT1 expresión total y 60 °C para PPAR β / δ , la isoforma KTS +/- se amplificó a 55 °C y para 17aa +/- la temperatura fue de 60 °C, finalmente en todos los programas se incluyó un paso de elongación a 70 °C durante 1 minuto. Para la amplificación en tiempo real se utilizó un termociclador Applied biosystems 7500 fast real time ® con el software SDS V1.4 Upgrade.

4.4.5.3 Análisis de la metilación

Se utilizaron primers de una secuencia obtenida a partir de un fragmento de 279 pb en el primer exón de WT1 que amplifica sobre una isla CpG, esta región está relacionada con el proceso de silenciamiento de WT1 por hipermetilación, también se utilizaron primers de β-actina equino como normalizador (tabla 2) y el análisis fue realizado por RTqPCR, se utilizaron 50 ng/μl de ADNc sintetizado a partir de 50 ng/μl de ARNm obtenido de tejidos

de piel sana, neoplasias de sarcoide equino y melanoma, se generó un volumen de reacción de 20 μ l por pocillo de los cuales se añadieron 10 μ l de GoTaq qPCR master Mix, 500 nM de primer reverse, 500 nM de primer forward y agua libre de nucleasas para aforar el volumen total, se generó una condición de amplificación a partir de un gradiente a 40 ciclos que se optimizó a una temperatura de fusión de 60 °C, una pre-incubación a 50 °C por 2 minutos, una desnaturización a 95 °C por 10 minutos y una extensión de 1 minuto en un termociclador de Applied biosystems 7500 fast real time ®.

Tabla 2. Secuencias de primers para RTqPCR de las diferentes regiones de interés de WT1, gen constitutivo Beta actina y PPAR β/δ .

Gen	Secuencia
Beta actina equino (104 pb) (Tafur, 2021)	F: TAAGGACCTGTACGCCAACACAGT R: ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT
WT1 expresión total (179 pb) (Garza, 2015)	F: GAGAAACCATAACCAGTGTGA R: GTTTTACCTGTATGAGTCCT
PPAR beta/delta (150 pb) (Cho <i>et al.</i> 2015)	F: AGCAACCTCTCCTCACCGA R: GAGGCTGCGTAGGAACTCAC
WT1 Exón 1 (272 Pb) (Laux <i>et al.</i> 1999)	F: TGGGCAGGTAGGGCGCGTTAGGAA R: CGCTCCTTACGGGTCGTTGG
17AA E5 +/- (471 pb) (Zamora <i>et al.</i> 2007)	F: GACCTGGAATCAGATGAACTTAG R: GAGAACTTCGCTGACAAGTT
KTS +/- (133pb) (Zamora <i>et al.</i> 2007)	F: GTGTGAAACCATTCCAGTGTA R: TTCTGACAACTTGGCCACCG

4.4.6 Análisis de la expresión de las variantes de WT1, PPAR β/δ y metilación.

La base de datos generados a partir la RTqPCR fueron analizados por el método de comparación Delta-Delta Ct ($2\Delta\Delta Ct$), en el cual se observaron los genes de los ARNm sobre expresados o sub expresados en los diferentes grupos de tejidos.

4.4.6 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos provenientes de una distribución normal fueron analizados por un diseño completamente al azar, en el cual se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y posteriormente una prueba de medias con el método de Tukey $p \leq 0.05$ con el siguiente modelo experimental.

La variable de respuesta (gen o proteína de mayor expresión) depende del efecto de la media de todos los datos (unidades experimentales), del efecto de los tratamientos (tejidos) y del error experimental.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : Variable respuesta

μ : Respuesta global del promedio

α_i : Tratamientos

ε_{ij} : Error experimental

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico histopatológico

Se obtuvieron un total de 52 muestras de las cuales 2 se utilizaron como control, 19 melanomas, 12 sarcoides y 19 muestras de piel sana de diferentes caballos con colores de capa distintos, los colores de capa obtenidos en los caballos sanos fueron: tordillo, colorado, cremello, alazán, ruano, bayo y negro. Se realizó un análisis histológico para evaluar la integridad y las diferentes características histológicas entre colores de capa en la piel sana (Figura 10).

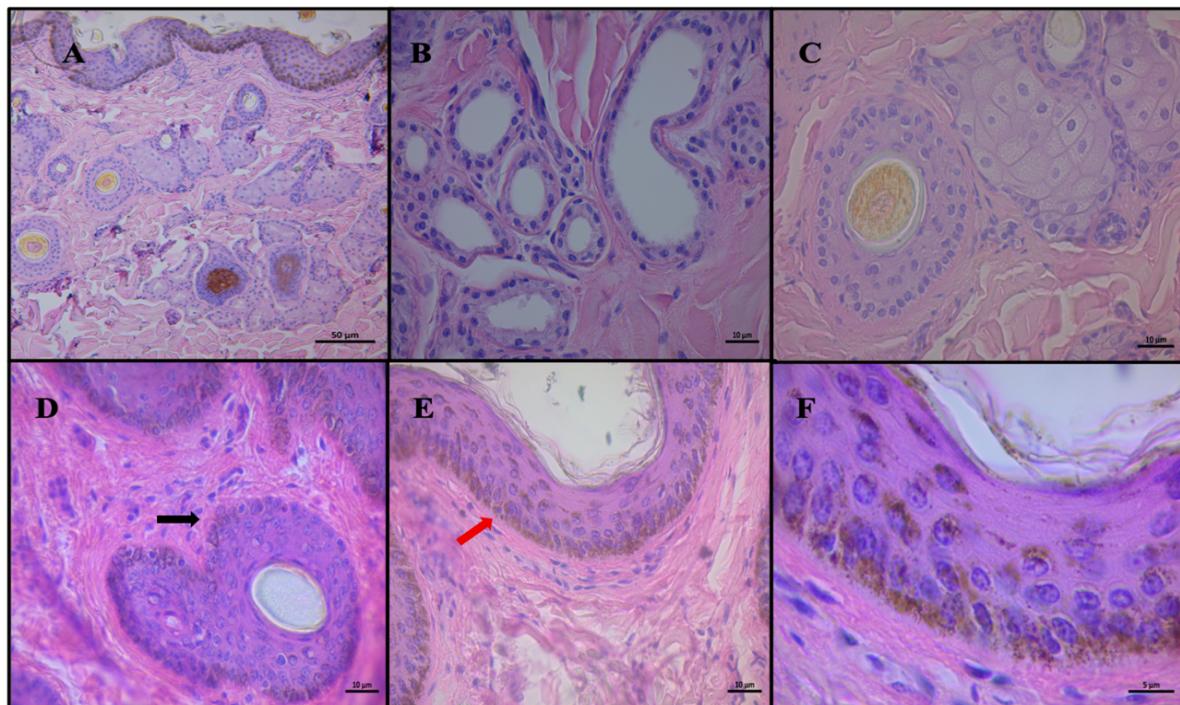
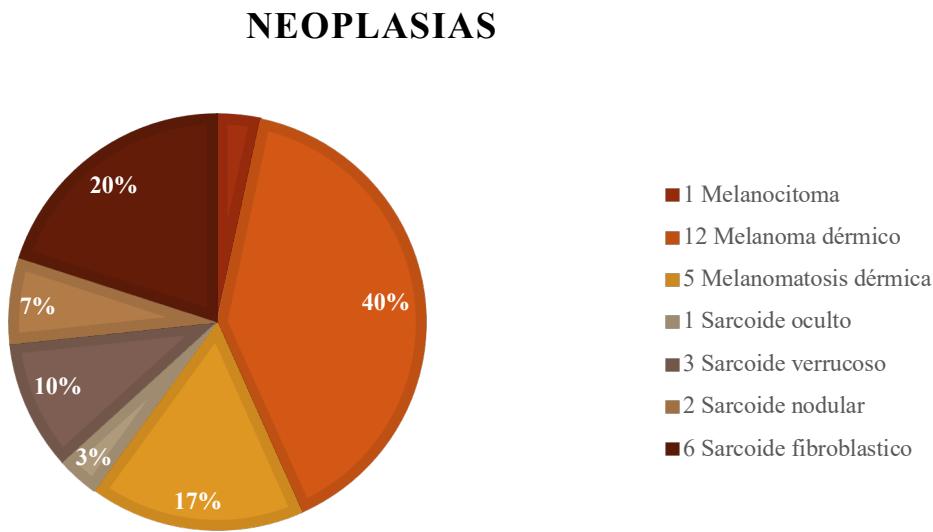


Figura 10. Características histológicas de la piel de equinos sanos. (A–C) Piel: epidermis, dermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. (D–E) Producción de melanina en los folículos pilosos (flecha negra), estrato basal de la epidermis (flecha roja), queratinocitos normales, melanocitos y fibroblastos dérmicos. (F) Síntesis de melanina en epidermis.

5.2 Hallazgos clínicos e histopatológicos de las neoplasias

Se realizó un diagnóstico histopatológico y se caracterizaron las diferencias que existen entre las variantes de neoplasias de sarcoide y melanomas de equinos. Del total de las neoplasias que se refirieron para el estudio la incidencia fue de: un 3% melanocitomas, 40% melanomas dérmicos, 17% de los casos fueron melanomatosis dérmicas, 3% sarcoides ocultos, 10% sarcoides verrucosos, 7 % sarcoides nodulares y el 19 % fueron sarcoides fibroblásticos. (grafica 1).



Gráfica 1. Incidencia de neoplasias referidas para el estudio en un lapso de 1.5 años.

5.2.1 Tipos de melanomas

Se identificaron 19 pacientes con melanomas donde la caracterización clínica para estos pacientes fue la siguiente: se obtuvo la rescisión quirúrgica de 12 neoplasias de melanomas dérmicos, 5 con melanomatosis dérmica, y una variante de nevo melanocítico en un caballo cremello. Todos los melanomas fueron correspondientes a la capa tordilla con la única excepción de la neoplasia de nevo melanocítico. La media de edades para los caballos con melanoma dérmico fue de 12 años, la media de edad de los caballos con melanomatosis dérmica fue de 10 años, el único caso de melanocitoma se presentó en un caballo de 10 años. (Tabla 3).

Tabla 3. Relación entre el tipo de presentación clínica de neoplasias de melanomas, cantidad de tejidos obtenidos, edades y colores de capa predominantes.

Neoplasia	Neoplasias obtenidas	Color de capa predominante	Edad promedio
Nevo melanocítico	1	Cremello	10 años
melanoma dérmico	12	Tordillo	12 años
melanomatosis dérmica	5	Tordillo	10 años

De los cuatro tipos de presentaciones clínicas que la literatura propone para los melanomas, se realizó una correlación entre las características clínicas e histopatológicas de 3 variantes, incluida una variante poco común de nevo melanocítico. (tabla 4)

Tabla 4. Variantes histopatológicas más sobresalientes de los diferentes tipos de presentaciones clínicas en las neoplasias obtenidas de melanomas.

Neoplasia	Características Histopatológicas
melanocitoma (nevo azul celular)	Entrelazamiento de haces fasciculares de células tumorales en forma de huso en forma transversal con células sin pigmento, invasión hacia la dermis superficial de células melanocíticas.
melanoma dérmico	Nódulos dérmicos de células melanocíticas hiperpigmentadas, pleomórficas, variables, infiltradas en el tejido conectivo.
melanomatosis dérmica	Presencia de melanófagos de tamaño intermedio y grandes llenos de pigmento granular grueso. Nódulos de tamaño variable y células melanocíticas con vesículas de melanina, islas apoptóticas y núcleos periféricos.

5.2.2 Tipos de Sarcoïdes

Las presentaciones clínicas de los sarcoïdes encontrados fueron; 1 sarcoïde oculto, 3 sarcoïdes verrucosos, 2 sarcoïdes de tipo nodular, y 6 sarcoïdes fibroblásticos. El 50 % de los caballos fue de capa colorada, el 25% fueron caballos appaloosa y el 25 % restante fue en caballos alazanes, las medias de edades de los caballos con sarcoïdes fueron de 7 años para el caballo con sarcoïde oculto, 10 años para los caballos con sarcoïde verrucoso, 8 años para los caballos con sarcoïde nodular y 6.5 años para los caballos con sarcoïdes fibroblásticos. (Tabla 5).

Tabla 5. Relación entre el tipo de presentación clínica de neoplasias de sarcoïdes, cantidad de tejidos obtenidos, edades y colores de capa predominante.

Neoplasia	Neoplasias obtenidas	Color de capa predominante	Edad promedio
Sarcoide oculto	1	Colorado	7 años
Sarcoide verrucoso	3	Colorado	10 años
Sarcoide nodular	2	Colorado	8 años
Sarcoide fibroblástico	6	Colorado	6.5 años

De las 7 variantes clínicas documentadas de sarcoïdes en caballos, se identificaron 4 variantes, sarcoide oculto, verrucoso, nodular y fibroblástico. Para estos tipos de neoplasias no existe una asociación entre las características clínicas y las lesiones histopatológicas por lo que se generó una base de datos morfológicos y se correlacionaron las características clínicas con los cambios histopatológicos más sobresalientes de forma individual en cada una de las variantes de presentaciones clínicas encontradas en nuestro estudio. (Tabla6).

Tabla 6. Variantes histopatológicas más sobresalientes de los diferentes tipos de presentaciones clínicas en las neoplasias obtenidas de sarcoïdes.

Neoplasia	Características Histopatológicas
Sarcoide oculto	Hiperplasia epidérmica, ligera hiperqueratosis e infiltración de fibroblastos dérmicos hacia la epidermis.
Sarcoide verrucoso	Hiperqueratosis profusa, formación de proyecciones epiteliales (vayas de piquete), formación de vórtices sobre vasos sanguíneos y fibras de colágeno.
Sarcoide nodular	Fibras de colágena exuberante, hiperplasia dérmica, fibroblastos dérmicos densos con anisocitosis y anisocariosis.
Sarcoide fibroblástico	Epidermis ulcerada, Infiltración de células inflamatorias, fibroblastos y fibras de colágena densos, presencia de células redondas mononucleares polimorfonucleares y neoformación de vasos sanguíneos.

5.2.3 Sarcoide oculto

La lesión observada clínicamente de la variante oculta se caracterizó por ser extensa en forma de parche, la cual cubría en el paciente áreas muy grandes en el tejido cutáneo, se presentó sobre todo en el área de la base del cuello, con pequeños nódulos o áreas verrucosas en la misma piel afectada (Figura 11).

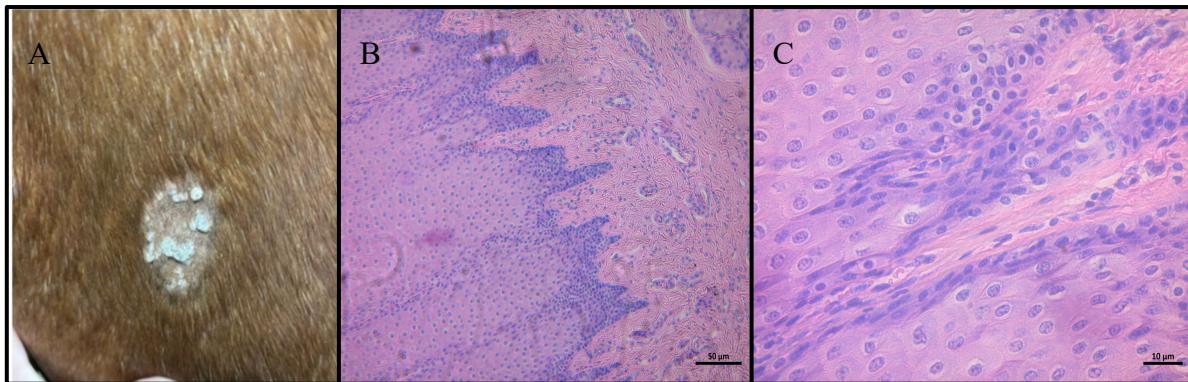


Figura 11. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide oculto. (A) Lesión plana y alopécea en cuello de caballo. (B) Micrografía H&E 10x: hiperplasia epidérmica y fibroblastos densos. (C) H&E 40x: fibroblastos dérmicos formando patrón en vallas.

5.2.4 Sarcoide verrucoso

Esta lesión neoplásica aparecía como una verruga sobre el pliegue cutáneo de la ingle, se trata de una lesión plana que sobresale a la piel, la superficie es escamosa y queratinizada en forma de cúmulo, además de ser alopécea la cual aparentemente no generaba dolor ni prurito (Figura 12).

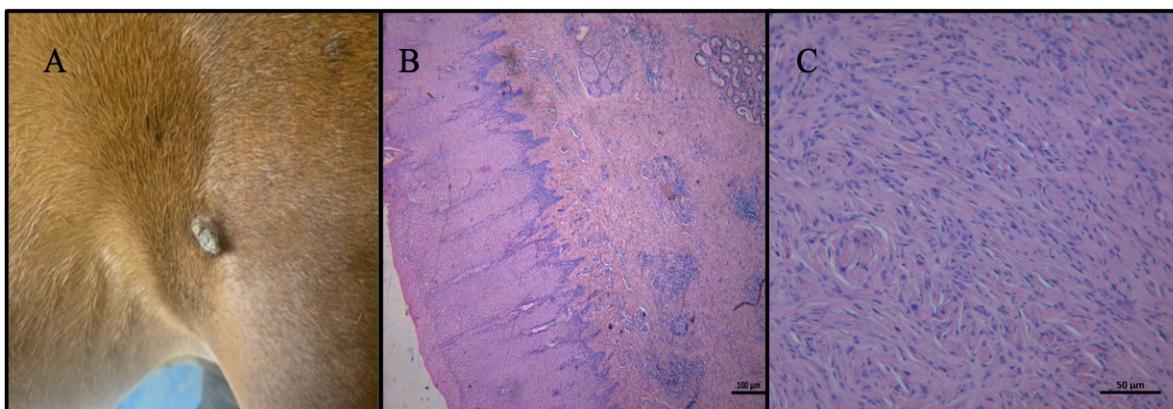


Figura 12. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide verrucoso. (A) Lesión verrugosa, seca y difusa con hiperqueratosis. (B) Micrografía H&E 4x: hiperplasia epidérmica e hiperqueratosis con proyecciones epiteliales. (C) H&E 10x: fibroblastos dérmicos neoplásicos en vórtices alrededor de colágeno y vaso sanguíneos.

5.2.5 Sarcoide nodular

Clínicamente esta neoplasia se divide en dos tipos y tiene una subdivisión de acuerdo con el alcance de su cápsula. Los subtipos para esta neoplasia son: Sarcoide nodular tipo A; Sarcoide nodular tipo A1, Sarcoide nodular tipo A2, Sarcoide nodular tipo B; Sarcoide nodular tipo B1, Sarcoide nodular tipo B2, los sarcoides nódulares obtenidos en nuestro estudio se caracterizaron por ser nódulos firmemente unidos al tejido adyacente, sin conexión entre la neoplasia y la piel en la región del cuello característicos como sarcoideos tipo A (Figura 13).

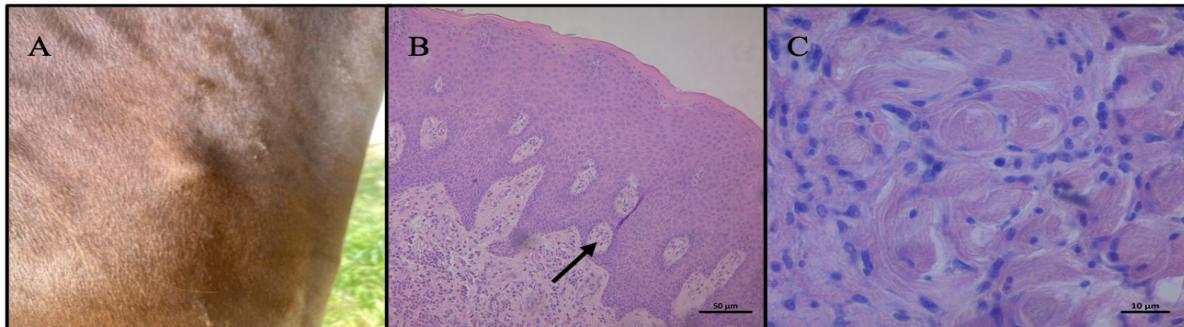


Figura 13. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide nodular. (A) Nódulo tipo A en cuello de caballo, móvil respecto a la piel. (B) Micrografía H&E 10x: aumento de fibroblastos, zonas apoptóticas e infiltración dérmica (flecha negra). (C) H&E 100x: proliferación fibroblástica con anisocitosis y anisocariosis.

5.2.6 Sarcoide fibroblástico

Estas lesiones presentan una apariencia carnosa, úlceras y exudado de forma excesiva, además de tejido de granulación exuberante como consecuencia del constante trauma debido a su localización, además de la presencia de infección y la hemorragia en algunas regiones. (Figura 14).

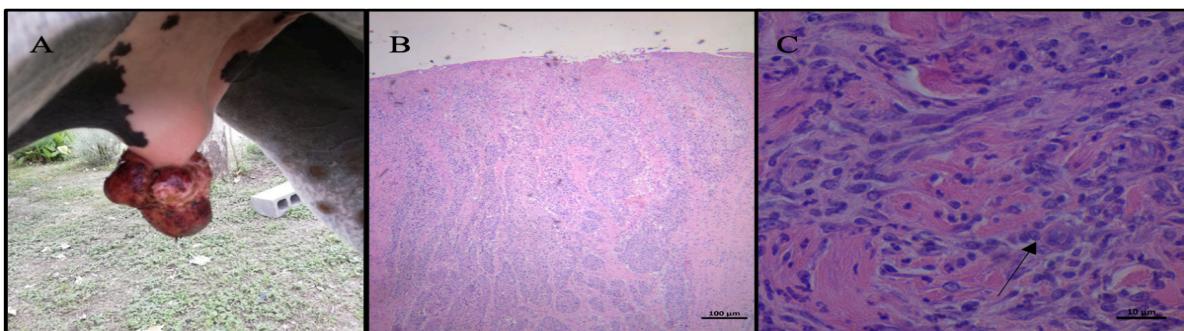


Figura 14. Características clínicas e histopatológicas del sarcoide fibroblástico. (A) Tumor pedunculado ulcerado en prepucio. (B) Micrografía H&E 4x: infiltrado inflamatorio, colágeno hiperplásico y falla en epitelización. (C) H&E: células mononucleares y polimorfonucleares (flecha) formando cordones en matriz de colágeno.

5.2.7 Nevo melanocítico (Nevo azul celular)

Es la forma más común de nevo respecto a la afección intradérmica, en su mayoría des pigmentados, la neoplasia fue identificada en un caballo de capa cremello de 10 años, las variantes de nevos son: nevo melanocítico, nevo melanocítico común intradérmico, nevo azul celular y nevo azul celular combinado, la única forma de diferenciar las variantes de nevos es por medio de histopatología, en este caso los hallazgos histopatológicos fueron contundentes para definir el tipo de melanocitoma como un nevo azul celular. (Figura 15).

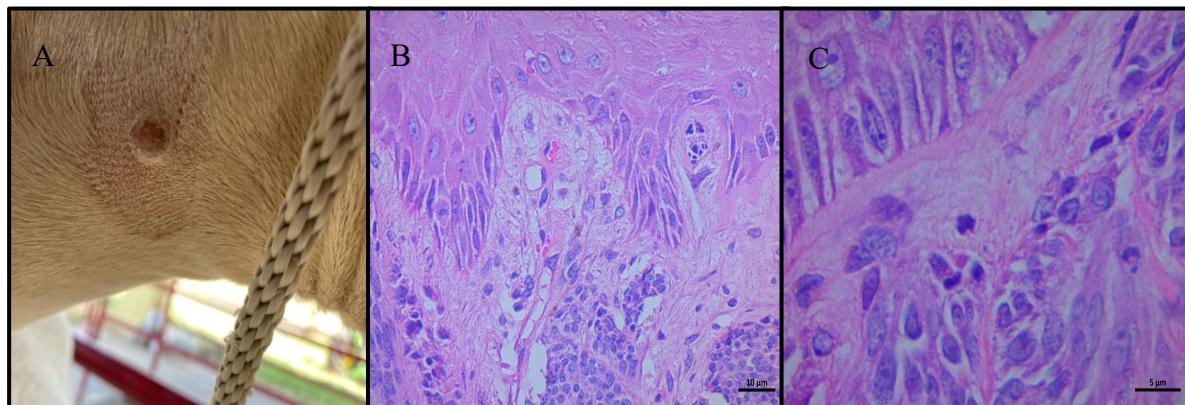


Figura 15. Características clínicas e histopatológicas de un nevo melanocítico.

A) Nevo azul celular en cuello, con bordes redondeados y uniformes, con hiperqueratosis y ausencia de pigmento (B) H&E 10x: proliferación de melanocitos fusiformes con mitosis y patrón en huso. (C) H&E 40x: melanocitos hiperplásicos con anisocitosis y células binucleadas.

5.2.8 Melanoma dérmico

Se presentaron en la mayoría de los pacientes una neoplasia en forma de nódulos discretos de 1 o 2 masas localizadas, todas sobre la base de la cola. (Figura 16).

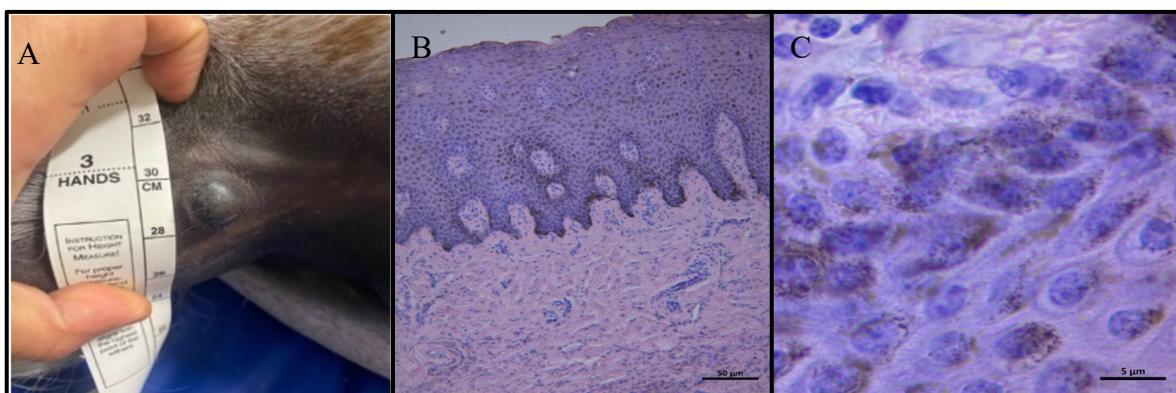


Figura 16: Características clínicas e histopatológicas de un melanoma dérmico.

(A) Nódulo pigmentado único en base de la cola. (B) H&E 10x: infiltración melanocítica, exceso de melanina y apoptosis epidérmica. (C) H&E 40x: mitosis abundante y melanocitos con vesículas pigmentadas.

5.2.9 Melanomatosis dérmica

Los pacientes remitidos en nuestro estudio presentaron en esta variante múltiples nódulos cutáneos, los bordes fueron bien definidos y esféricos, frecuentemente en la región perianal y sobre la base de la cola, las masas neoplásicas variaron desde tamaños pequeños de pocos milímetros hasta más de 20 cm de diámetro, algunos despigmentados, otros hiperpigmentados e incluso ulcerados (Figura 17).

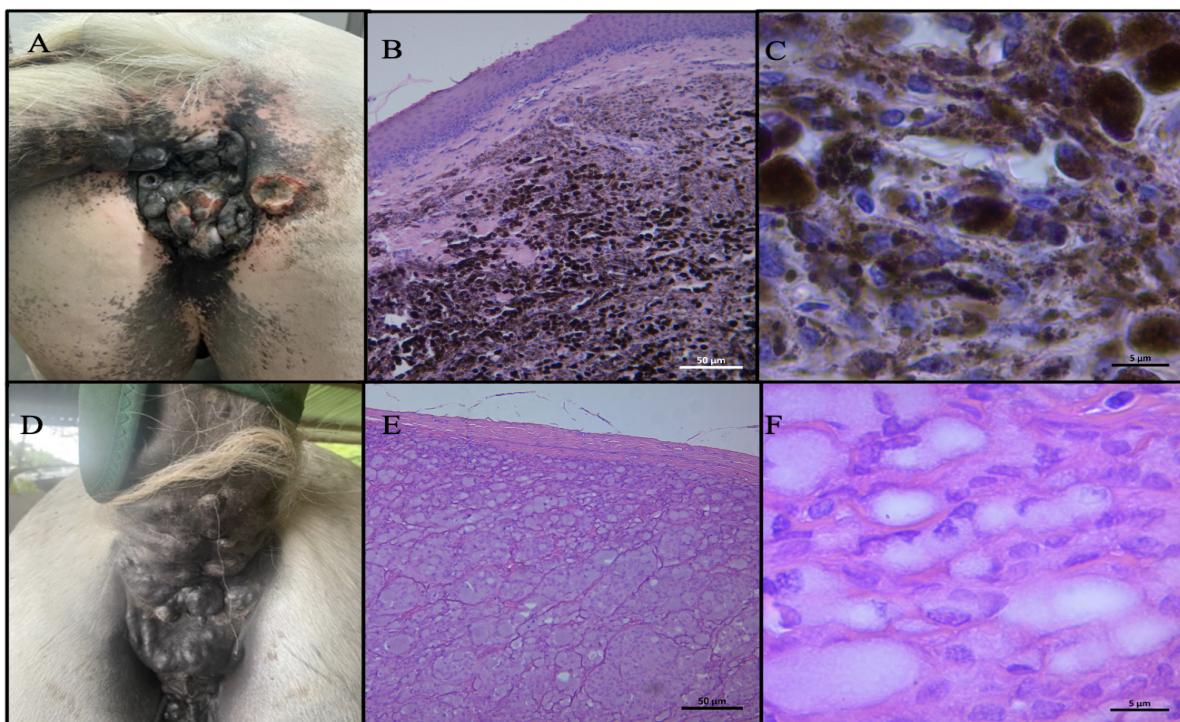


Figura 17. Características clínicas e histopatológicas de la melanomatosis dérmica. (A) Múltiples nódulos pigmentados y ulcerados en región perianal y base de la cola. (B) H&E 10x: nódulos de melanocitos en dermis. (C) H&E 100x: proliferación celular alta con macrófagos cargados de melanina. (D) Yegua con múltiples nódulos perianales. (E–F) H&E con despigmentación: morfología celular definida con anisocitosis y anisocarriosis.

5.3 Inmunohistoquímica

Del total de los tejidos obtenidos, se realizó el análisis inmunohistoquímico de 21 tejidos para la detección de las proteínas de WT1 y de PPAR β/δ con los anticuerpos WT1-6FH2 monoclonal y anticuerpo monoclonal PPAR β F-10 SC-74517. Se analizó la distribución subcelular de 7 tejidos de piel sana de caballos de diferentes colores de capa, 7 fueron de sarcoides de diferentes tipos (oculto, verrucoso, nodular y fibroblástico) y 7 de melanomas correspondientes a tres variantes clínicas (nevó melanocítico, melanoma dérmico y

melanomatosis dérmica). Como control positivo interno se utilizaron tejidos de riñón para PPAR β/δ y testículo para WT1 (Figura 18).

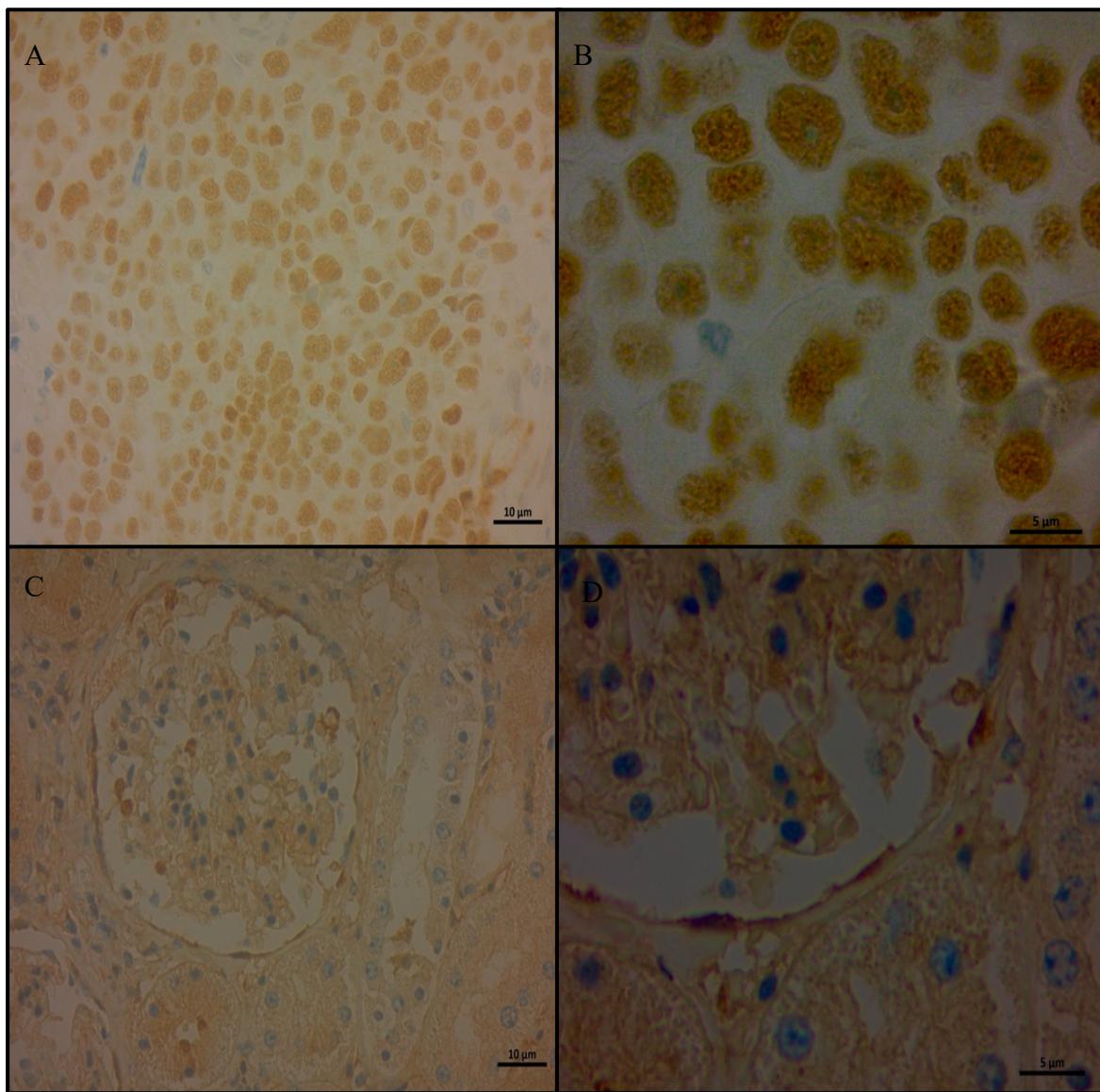


Figura 18. Inmunohistoquímica en órganos de control positivo interno para los anticuerpos WT1 6FH2 monoclonal en Testículo y PPAR β/δ polyclonal C-20 en riñón. (A–B) Testículo: expresión nuclear y citoplasmática de WT1 en células espermatogénicas. (C–D) Riñón: expresión heterogénea de PPAR β/δ en células mesangiales, podocitos y epitelio parietal.

5.3.1 Expresión Inmunohistoquímica de WT1 en la piel sana sarcoide y melanoma

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína WT1 se encuentra distribuida en la piel sana de los equinos y que presenta mayor densidad sobre los núcleos de las células de la epidermis y la dermis. La proteína WT1 también se encuentra expresada sobre las células de los diferentes componentes estructurales de la piel, mayormente en células de los folículos pilosos, células basales de la epidermis, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas (Figura 19, A y B). En el sarcoide, la proteína de WT1 presenta muy poca densidad de expresión a nivel citoplasmático y ausencia a nivel nuclear, las células en las cuales se observa ligera expresión son algunas células queratinizadas sobre la epidermis y en menor grado algunos fibroblastos dérmicos (Figura 19, C y D). En las neoplasias de melanomas la expresión de la proteína WT1 es limitada, sin embargo, está presente en la variante de nevo melanocítico en donde se encuentra expresada a nivel citoplasmático en las células basales de la epidermis y algunos fibroblastos dérmicos, además se observa la presencia de WT1 en melanocitos que se encuentran sobre algunos nichos de células neoplásicas (Figura 19, E y F)

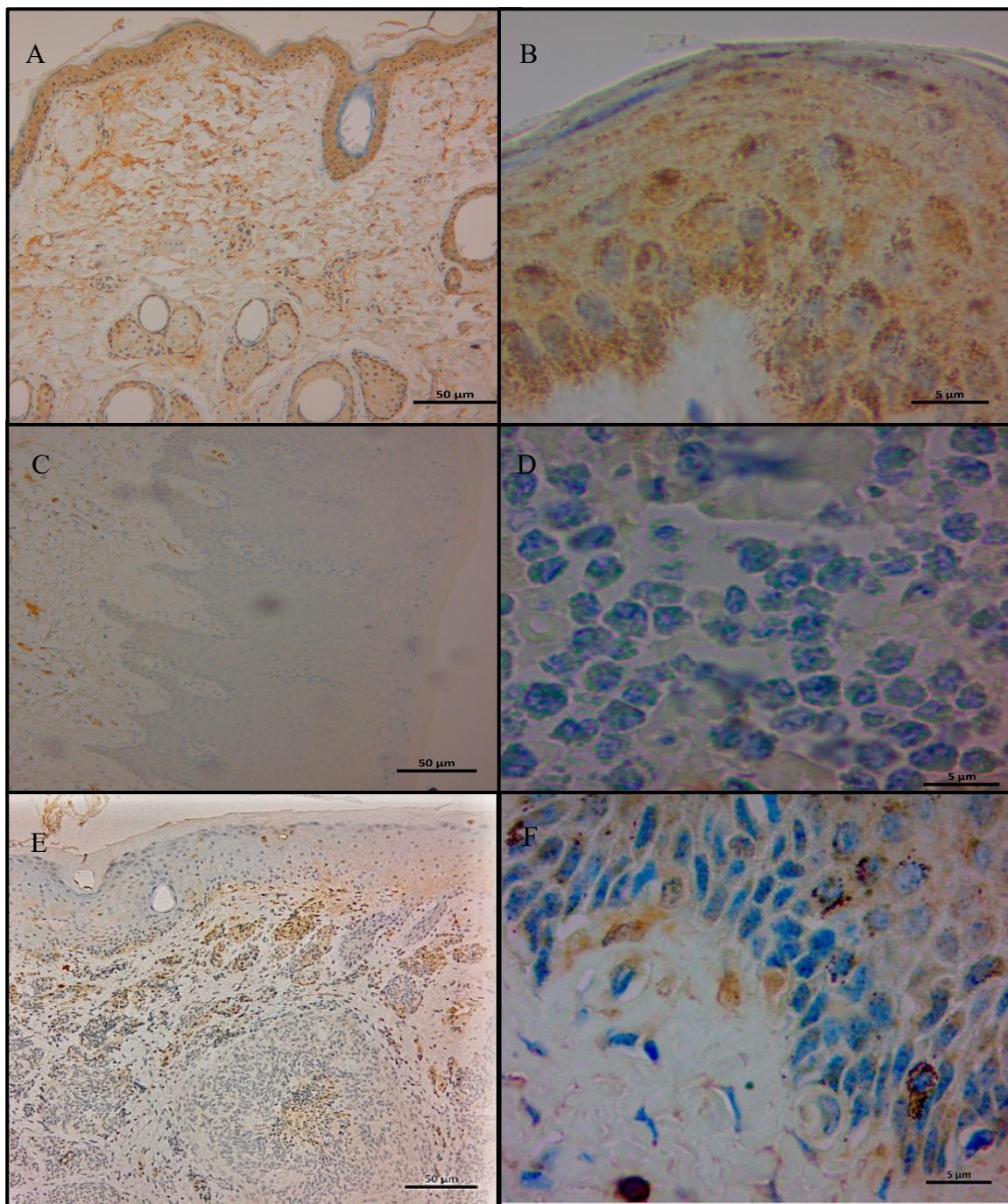


Figura 19. Comparación de la expresión de WT1 en tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino.
(A-B) Piel sana: expresión en epidermis, fibroblastos, folículos y glándulas. (C-D) Sarcoide: expresión limitada en epidermis y dermis. (E-F) Nevo melanocítico: expresión ligera en epidermis y melanocitos dérmicos.

5.3.2 Expresión Inmunohistoquímica de WT1 en las variantes de piel sana, variantes clínicas de neoplasias de sarcoide y variantes clínicas de melanoma.

En las variantes de colores de capas en la piel sana de equinos, WT1 se encuentra con mayor densidad en la capa tordilla, seguido del ruano y en menor densidad en los caballos colorados a nivel nuclear (Figura 20), (Gráfica 2).

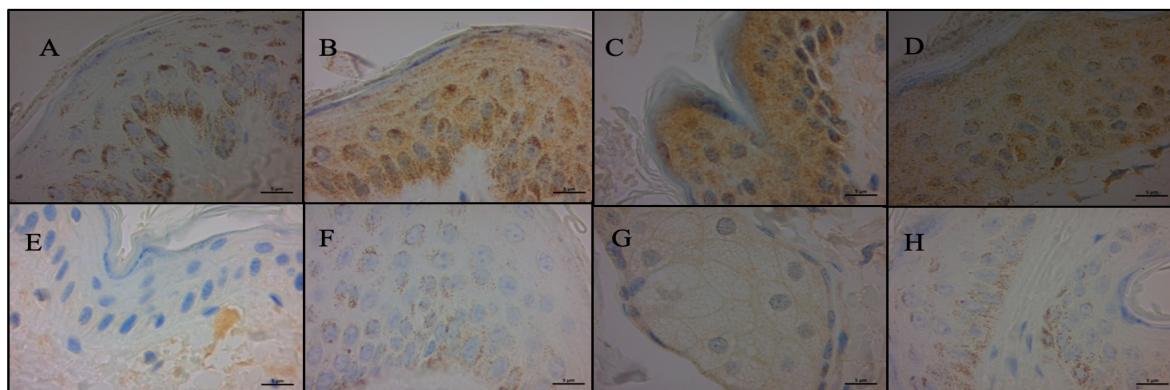
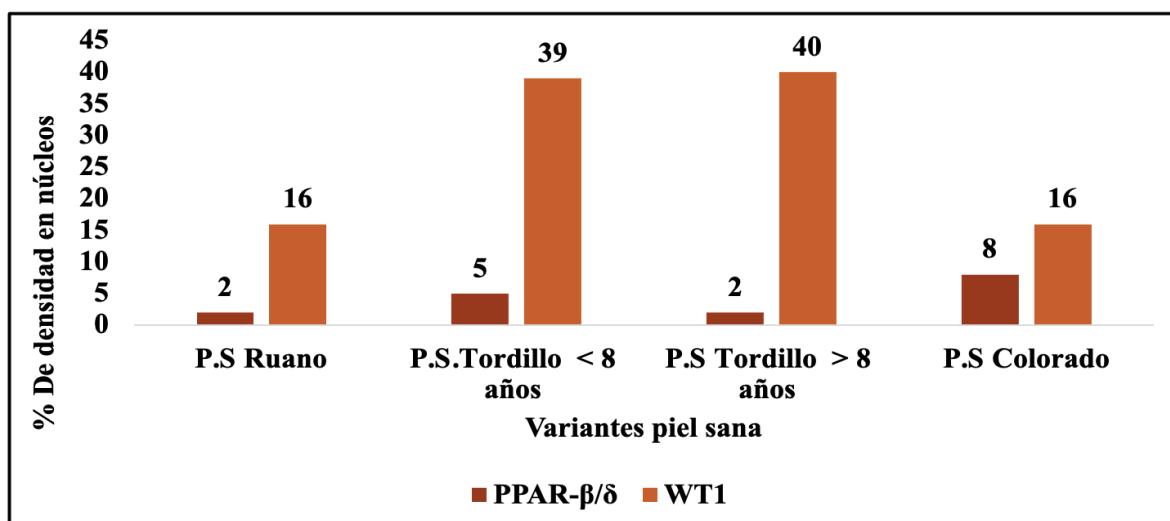


Figura 20. Densidad de expresión nuclear en variantes de piel sana de WT1 y PPAR β/δ . IHQ 100x (A) P.S Ruano WT1 (B) P.S Tordillo < 8 a WT (C) P.S Tordillo > 8 años WT1 (D) P.S Colorado WT1 (E) P.S Ruano PPAR β/δ (F) P.S Tordillo < 8 a PPAR β/δ (G) P.S Tordillo > 8 años PPAR β/δ (H) P.S Colorado PPAR β/δ



Gráfica 2. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de piel sana.

En cuanto, a nivel citoplasmático, la mayor densidad de WT1 sobresale en la capa tordilla, seguido de los caballos de capa colorada y el ruano en los que la densidad de expresión es igual (Figura 21), (Gráfica 3).

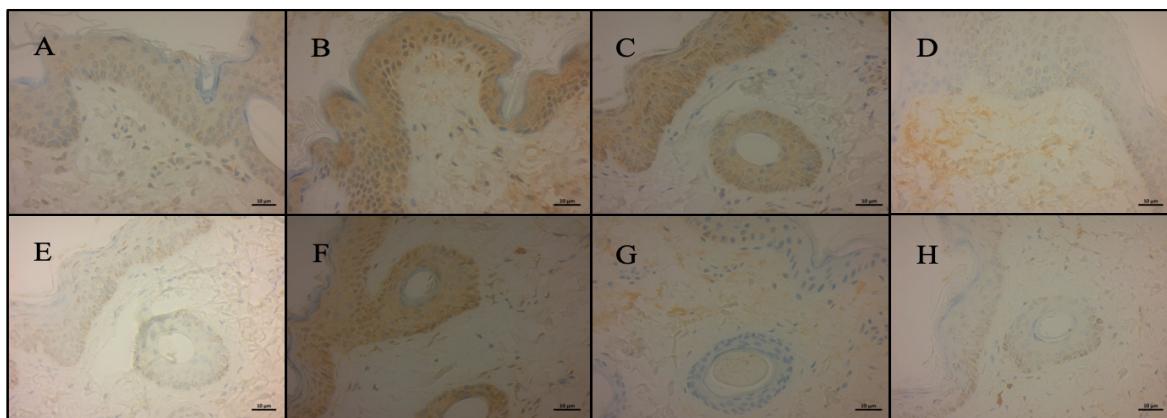
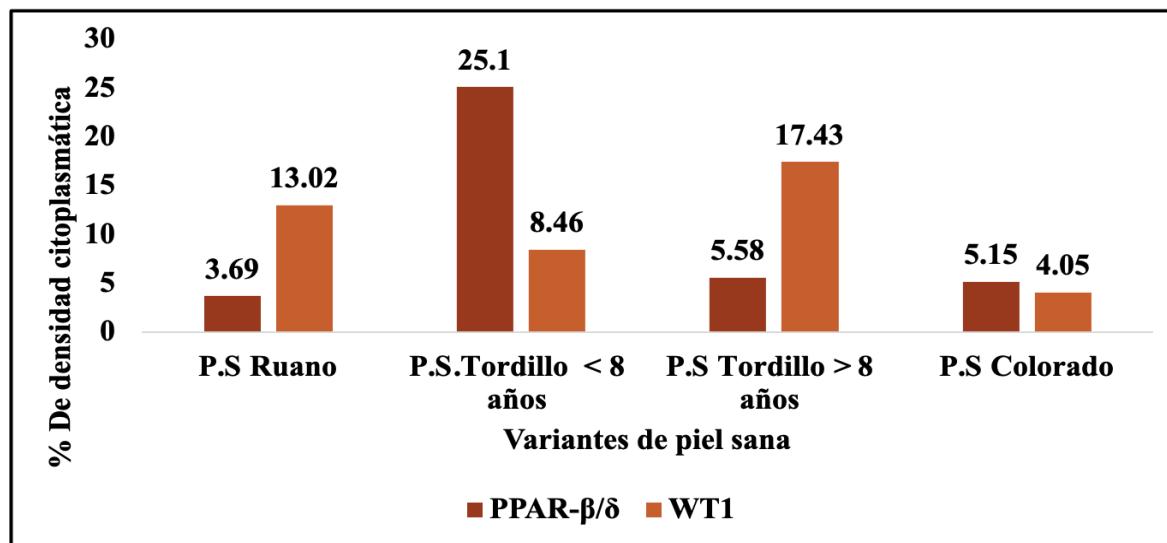


Figura 21. Densidad de expresión citoplasmática en variantes de piel sana de WT1 y PPAR β/δ . IHQ 40x
 (A) P.S Ruano WT1 (B) P.S Tordillo < 8 a WT (C) P.S Tordillo >8años WT1 (D) P.S Colorado WT1 (E) P.S Ruano PPAR β/δ (F) P.S Tordillo < 8 a PPAR β/δ (G) P.S Tordillo >8años PPAR β/δ (H) P.S Colorado PPAR β/δ .



Gráfica 3. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de piel sana.

A nivel nuclear la expresión de WT1 es negativa en el sarcoide fibroblástico y el sarcoide oculto, y muy pobre en el sarcoide nodular y el sarcoide verrucoso. (Figura 22), (Gráfica 4).

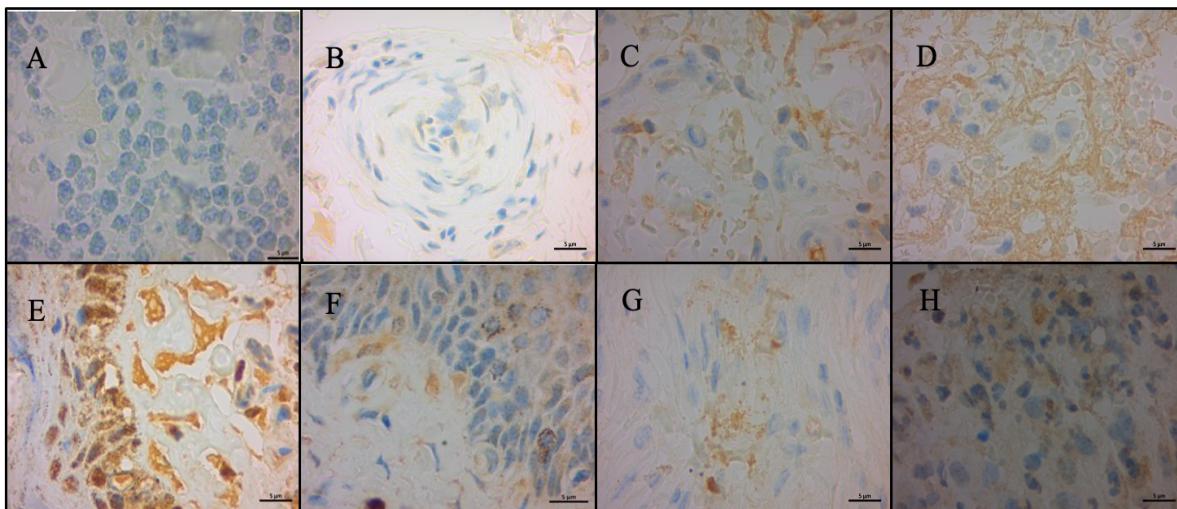
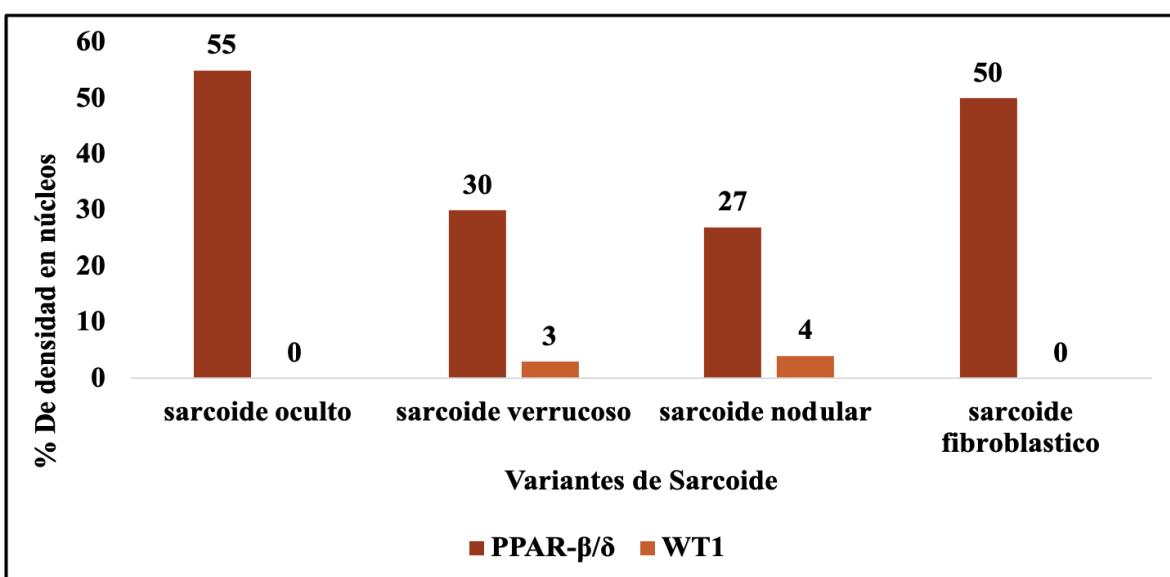


Figura 22. Densidad de expresión nuclear en variantes Sarcoide. IHQ 100x (A) sarcoide Oculto WT1 (B) sarcoide verrucoso WT1 (C) sarcoide nodular WT1 (D) sarcoide fibroblástico WT1 (E) sarcoide Oculto PPAR β/δ (F) sarcoide verrucoso PPAR β/δ (G) sarcoide nodular PPAR β/δ (H) sarcoide fibroblástico PPAR β/δ .



Gráfica 4. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de sarcoideos.

En cuanto a la densidad de expresión en las diferentes variantes de sarcoides, WT1 se encuentra expresado con mayor densidad en los sarcoides nodulares, seguido del sarcoide oculto, el sarcoide verrucoso y posteriormente el sarcoide fibroblástico a nivel citoplasmático (Figura 23) (Gráfica 5).

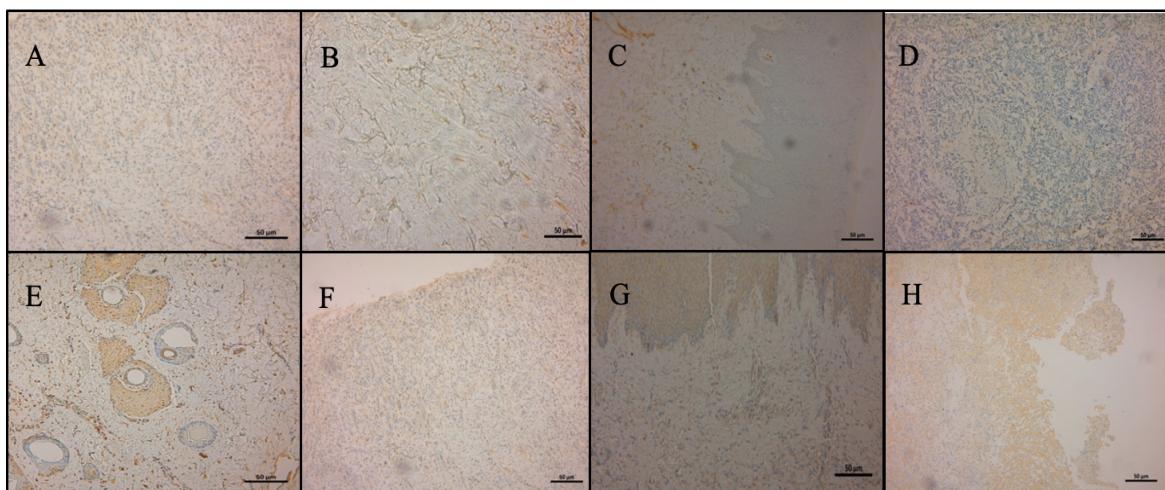
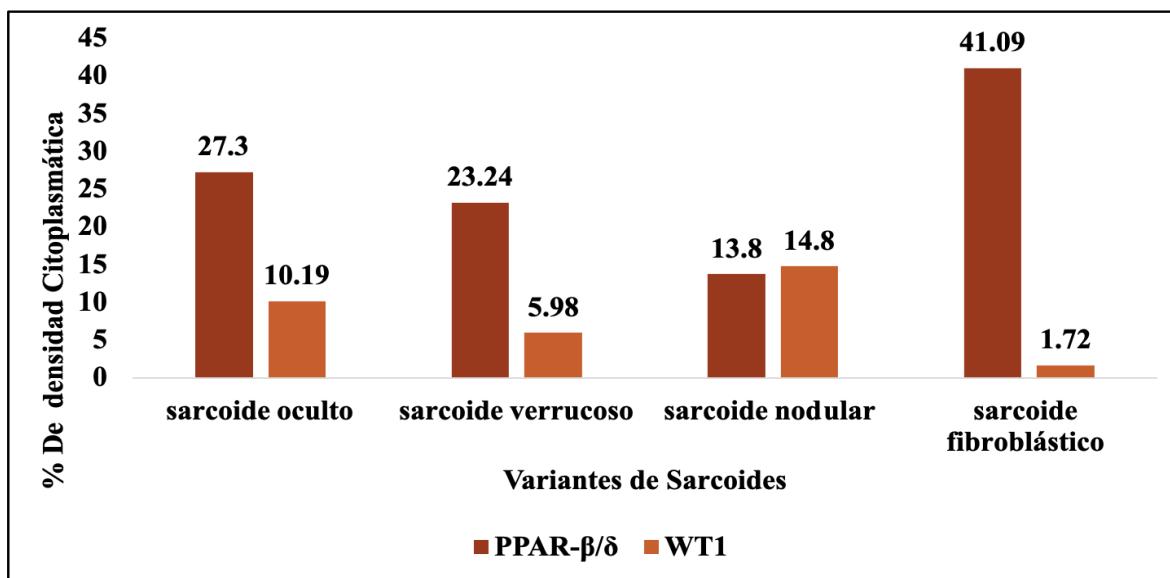


Figura 23. Densidad de expresión citoplasmática en variantes Sarcoide. IHQ 10x (A) sarcoide Oculto WT1 (B) sarcoide verrucoso WT1 (C) sarcoide nodular WT1 (D) sarcoide fibroblástico WT1 (E) sarcoide Oculto PPAR β/δ (F) sarcoide verrucoso PPAR β/δ (G) sarcoide nodular PPAR β/δ (H) sarcoide fibroblástico PPAR β/δ .



Gráfica 5. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de sarcoides.

En las neoplasias de melanoma, la expresión de la proteína WT1 no se encuentra expresada a nivel nuclear en el melanoma dérmico y tampoco en la melanomatosis dérmica, sin embargo, existe ligera expresión de la proteína en los núcleos de la variante de nevo melanocítico (Figura 24), (Gráfica 6).

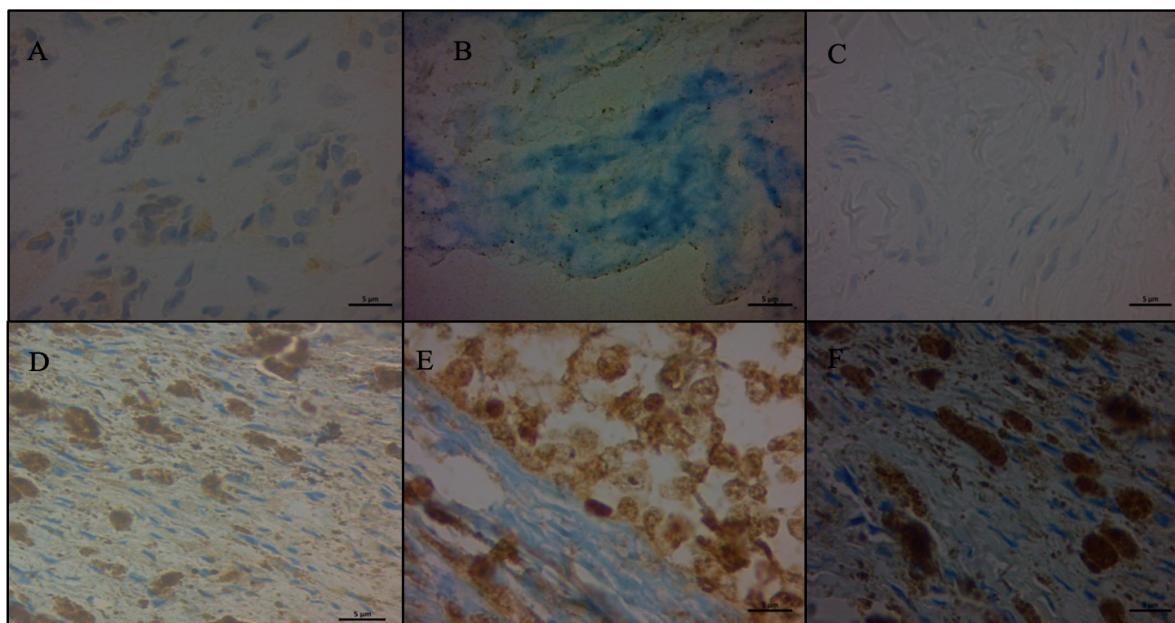
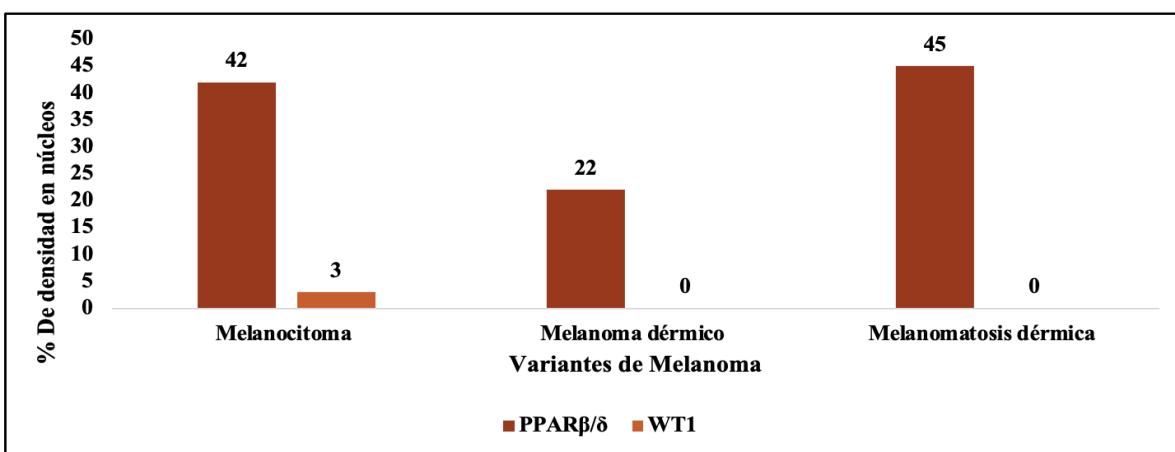


Figura 24. Densidad de expresión nuclear en variantes de melanomas. WT1 (B) melanoma dérmico WT1 (C) melanomatosis dérmica WT1 (D) melanocitoma PPAR β/δ (E) melanoma dérmico PPAR β/δ (F) melanomatosis dérmica PPAR β/δ .



Gráfica 6. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión nuclear de WT1 y PPAR β/δ en variantes de melanomas.

En cuanto a nivel citoplasmático, la proteína WT1 en las variantes neoplasias de melanoma se encuentra expresada, mayormente en la neoplasia de melanoma dérmico, seguido con menor abundancia en el nevo melanocítico (melanocitoma) y en menor cantidad en las neoplasias de melanomatosis dérmica. (Figura 25), (Gráfica 7)

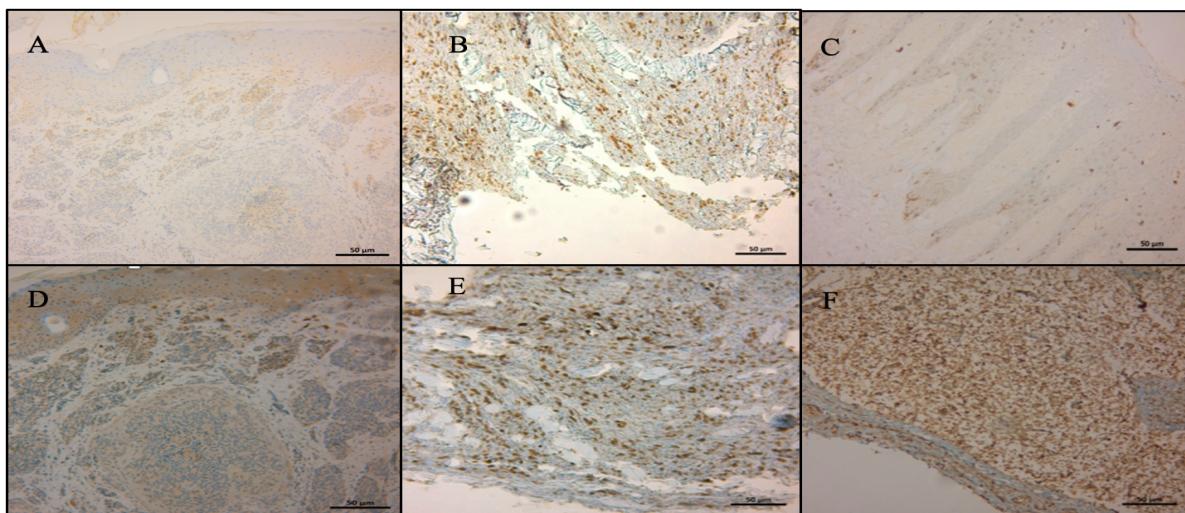
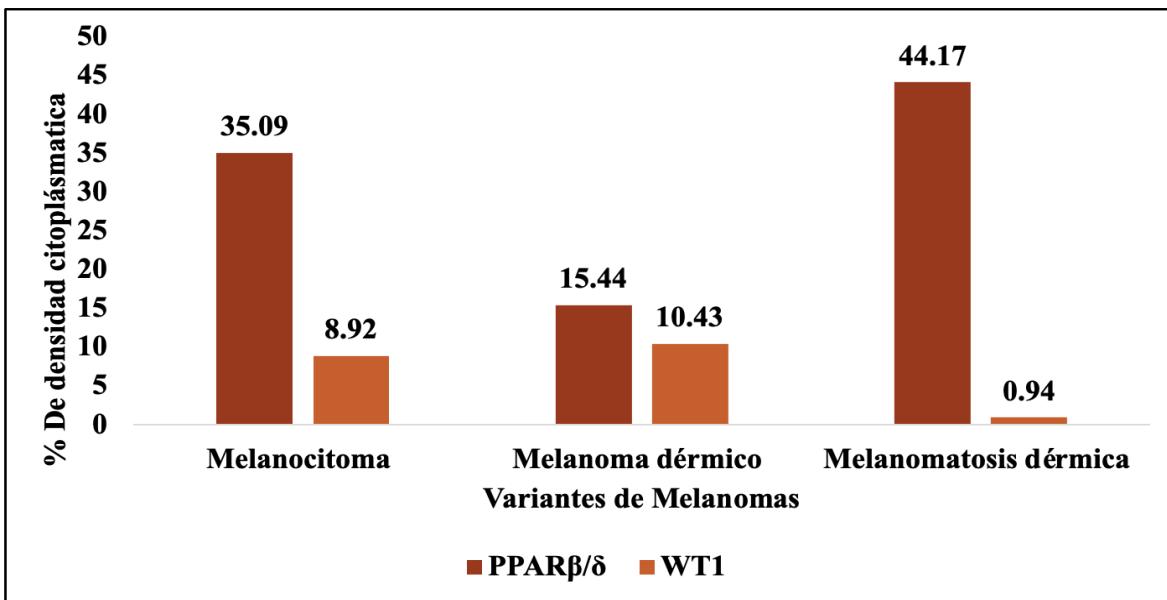


Figura 25. Densidad de expresión citoplasmática en variantes de melanoma. IHQ 10x (A) melanocitoma WT1 (B) melanoma dérmico WT1 (C) melanomatosis dérmica WT1 (D) melanocitoma PPAR β/δ (E) melanoma dérmico PPAR β/δ (F) melanomatosis dérmica PPAR β/δ .



Gráfica 7. Cuantificación del análisis densitométrico del porcentaje de expresión citoplasmática de WT1 y PPAR β/δ en variantes de melanomas.

5.3.3 Expresión Inmunohistoquímica de PPAR β/δ en las variantes de piel sana, variantes clínicas de neoplasias de sarcoide y variantes clínicas de melanoma.

El patrón de expresión es distinto para las variantes de diferentes capas en la piel sana a nivel de expresión nuclear, sin embargo sobresale la limitada expresión en todas las variantes, a nivel nuclear PPAR β/δ se encuentra con mayor densidad en caballos con capa colorada, posteriormente le sigue la capa de caballos tordillos mayores de 8 años con menor expresión y finalmente los caballos tordillos menores de 8 años y el ruano en los cuales existe la misma densidad de expresión (Figura 20) (Gráfica 2). En cuanto a las variantes de expresión diferencial en los tejidos cutáneos de diferentes colores de capa, la proteína PPAR β/δ se encuentra expresada en mayor densidad a nivel citoplasmático en la capa tordilla. Al comparar la expresión entre caballos tordillos jóvenes contra caballos tordillos adultos, se vio que existe mayor grado de densidad en caballos adultos mayores a 8 años, por otra parte, en caballos menores a 8 años se encuentra expresada en menor densidad, en caballos de capa colorado se expresa en menor densidad que el tordillo, seguido del ruano cuyo color de capa es el de menor expresión, (Figura 21) (Gráfica 3). A nivel nuclear el patrón de comportamiento es distinto y se observa que la proteína de PPAR β/δ se encuentra mayormente expresado en el sarcoide oculto en comparación con el resto de las variantes, la variante que le sigue es el sarcoide fibroblástico, posteriormente el sarcoide verrucoso y finalmente el sarcoide de tipo nodular (Figura 22) (Gráfica 4). También existe diferencia de expresión en las variantes de sarcoideos en la que PPAR β/δ se encuentra mayormente expresado en el sarcoide fibroblástico con relación al resto de las variantes, en el sarcoide oculto PPAR β/δ se encuentra con mayor densidad con relación al sarcoide verrucoso, cuya variante presenta mayor densidad de PPAR β/δ en comparación con la variante de sarcoide nodular a nivel citoplasmático (Figura 23) (Gráfica 5). En las neoplasias de melanoma la expresión de la proteína PPAR β/δ presenta un patrón de expresión homogéneo, siendo mayor la densidad de expresión en la variante clínica de melanomatosis dérmica, seguido del melanocitoma y menor expresión en la variante de melanoma dérmico a nivel citoplasmático como nuclear. (Figuras 24 y 25) (Gráficas 6 y 7).

5.3.4 Expresión Inmunohistoquímica de PPAR β/δ en la piel sana, sarcoide y melanoma

La abundancia de expresión diferencial fue correlacionada con la clasificación clínica de las neoplasias, destacando que en las neoplasias menos agresivas existe mayor abundancia de la proteína WT1 a nivel nuclear. Existe una estrecha relación entre la expresión de WT1 y una modulación negativa por medio de PPAR β/δ analizada en estudios previos, por lo que para este estudio se analizó la expresión de WT1 y se realizó una correlación en la expresión de PPAR β/δ con las diferentes variantes de tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma de equinos donde se encontró que PPAR β/δ se encuentra expresado en la piel sana de equinos en diferentes células a nivel citoplasmático, se observó también que PPAR β/δ está presente en células basales de la epidermis y fibroblastos dérmicos y células basales de los folículos pilosos (Figura 26 A y B). En los sarcoides existe expresión mayormente en los fibroblastos dérmicos y epidérmicos que invaden el estrato epidérmico de la piel (Figura 26 C y D), en las neoplasias de melanoma existe una sobreexpresión sobresaliente en las células neoplasias tanto a nivel citoplasmático como nuclear con un patrón homogéneo (Figura 26 E y F).

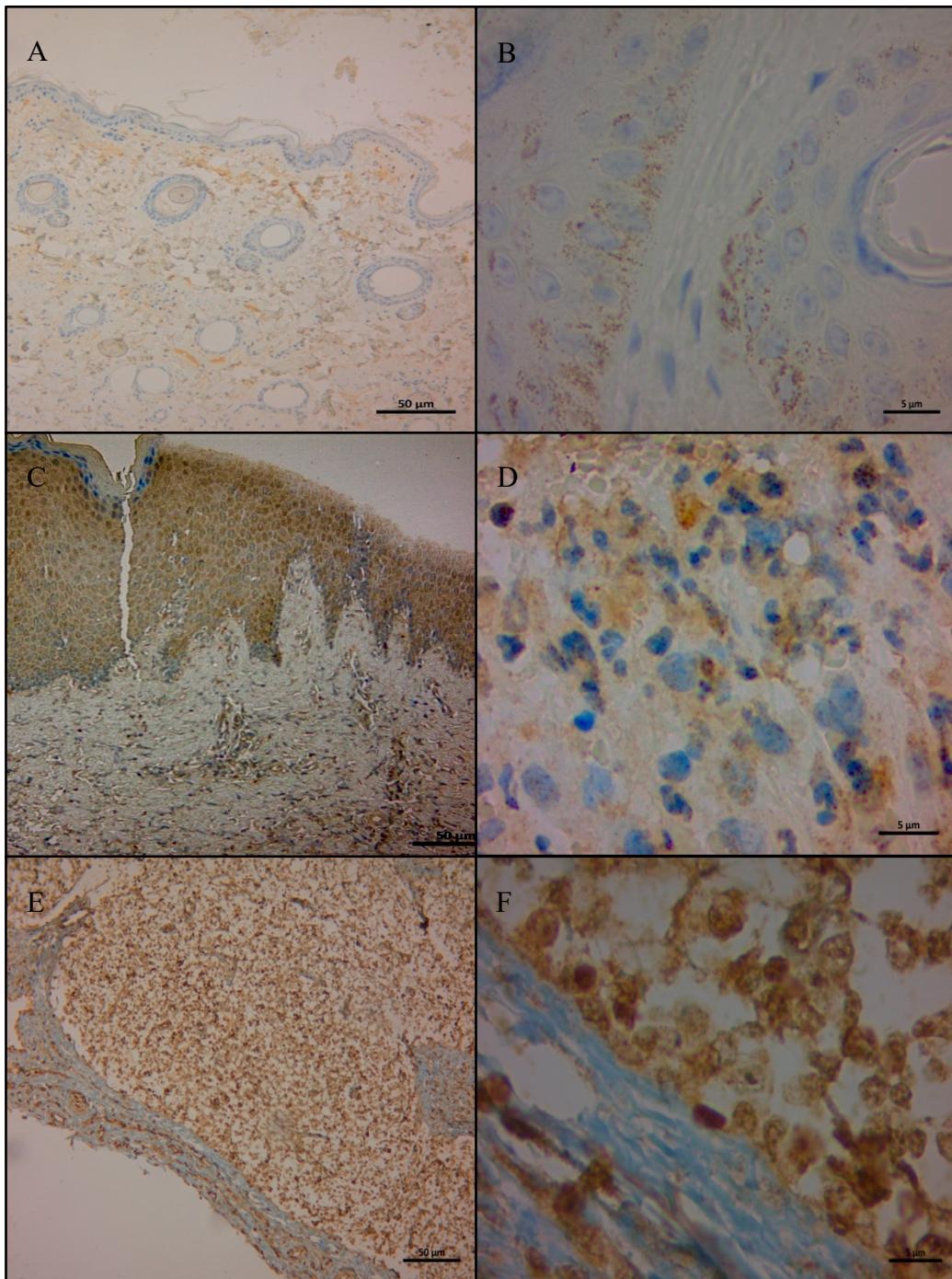
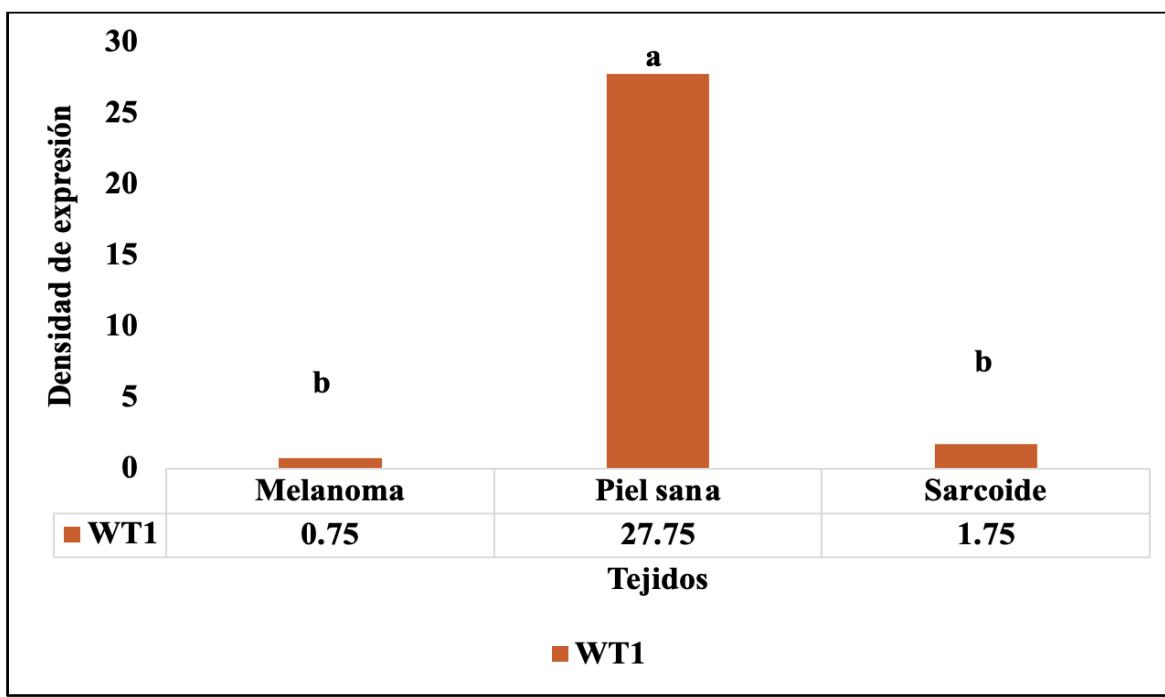


Figura 26. Comparación de la expresión de PPAR β/δ en tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino.
(A–B) Piel sana: expresión positiva en epidermis, dermis y folículos pilosos. (C–D) Sarcoide: abundancia de PPAR β/δ en epidermis hiperplásica y fibroblastos dérmicos. (E–F) Melanoma: expresión abundante en células neoplásicas y endoteliales, con patrón nuclear y citoplasmático.

5.3.5 Cuantificación de la densidad inmunohistoquímica de WT1 y PPAR β/δ

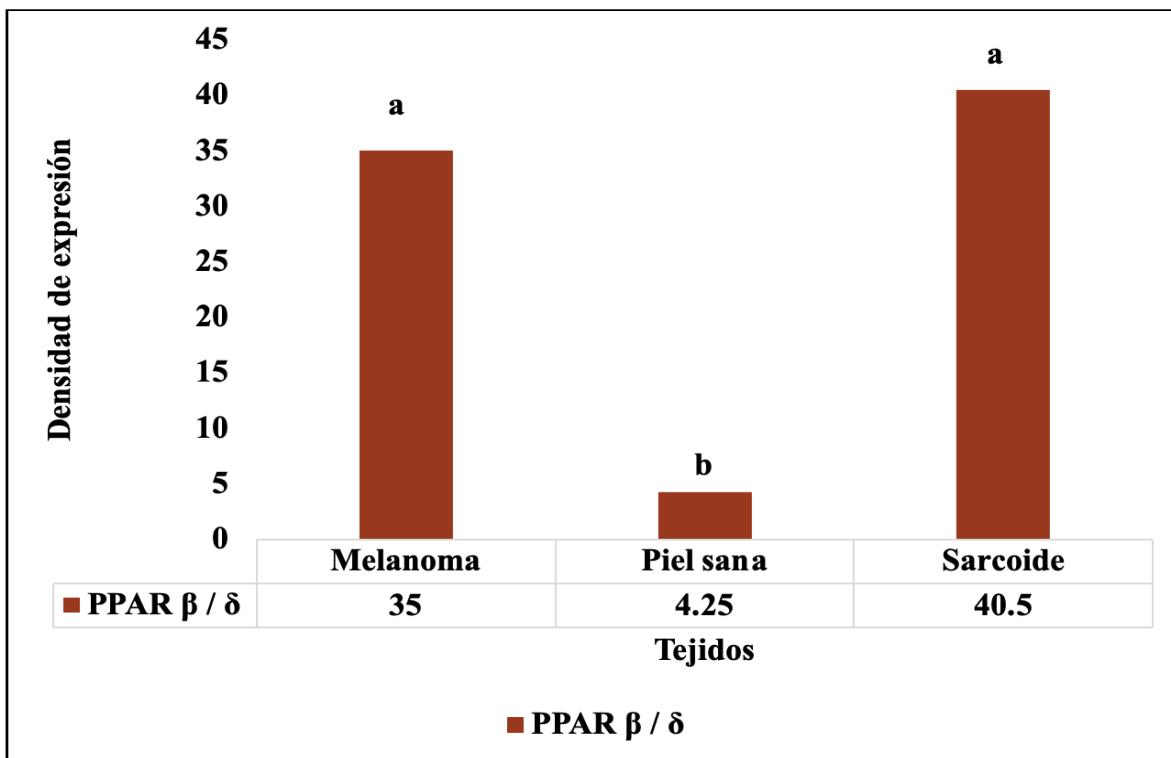
Se realizó el análisis de la proteína WT1 para comparar la densidad nuclear de los grupos de tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino por el método densitométrico con el programa ImageJ. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza con ($p \leq 0.05$) en el cual se observó diferencia mínima significativa de (P-Value = 0.001) y una prueba de medias con el método de Tukey ($p \leq 0.05$). Encontramos que la diferencia estadística entre los tres grupos sobresale para los tejidos de piel sana en la cual existe mayor densidad de expresión, los grupos de sarcoide y melanoma mantienen un comportamiento similar expresándose en menor cantidad en comparación con la piel sana. (Gráfica 8).



Gráfica 8. Expresión de la proteína WT1 en piel sana, sarcoide y melanoma equino. La densidad de expresión de WT1 es significativamente mayor en piel sana en comparación con sarcoide y melanoma.

Después de analizar en los tres grupos de tejidos la proteína de WT1, comparamos la densidad de expresión de la proteína PPAR β/δ en los mismos tejidos mediante una técnica densitométrica con el programa ImageJ, con los datos que se obtuvieron se realizó una prueba de ANOVA ($p \leq 0.05$) en el cual existe diferencia mínima significativa de (P-Value = 0.002), posteriormente se realizó una comparación de medias por el método de Tukey en el que se

encontró que PPAR β/δ se comporta similar en las neoplasias, siendo más abundante en los tejidos de sarcoide y melanoma en comparación con la piel sana. (Gráfica 9).



Gráfica 9. Expresión de la proteína PPAR β/δ en piel sana, sarcoide y melanoma equino. La densidad de expresión de PPAR β/δ es mayor en tejidos de sarcoide y melanoma en comparación con piel sana.

5.3.6 Correlación de la expresión inmunohistoquímica de WT1 y PPAR β/δ en piel sana sarcoide y melanoma equino

Los resultados obtenidos de la distribución de WT1 y de PPAR β/δ se resumen en la Tabla 7 que describe el comportamiento de las proteínas en las neoplasias de sarcoide y melanoma con respecto a la piel sana mediante la cuantificación y el análisis de la densidad inmunohistoquímica. Se determinó que la proteína WT1 se encuentra más sobreexpresada en la piel sana con respecto a las neoplasias de sarcoide y melanoma en donde se encuentra con menor expresión a nivel nuclear. En cuanto a PPAR β/δ , se encuentra sobreexpresado en las neoplasias de sarcoide y melanoma con respecto a la piel sana, donde se expresa en niveles basales.

Tabla 7. Comportamiento de la localización nuclear por inmunohistoquímica de las proteínas de WT1 y PPAR β/δ en las neoplasias de melanoma y sarcoide con respecto a la piel:

Localización	Piel sana	Sarcoide	Melanoma
WT1 Nuclear	S	Sb	Sb
PPARβ/δ Nuclear	E	S	S

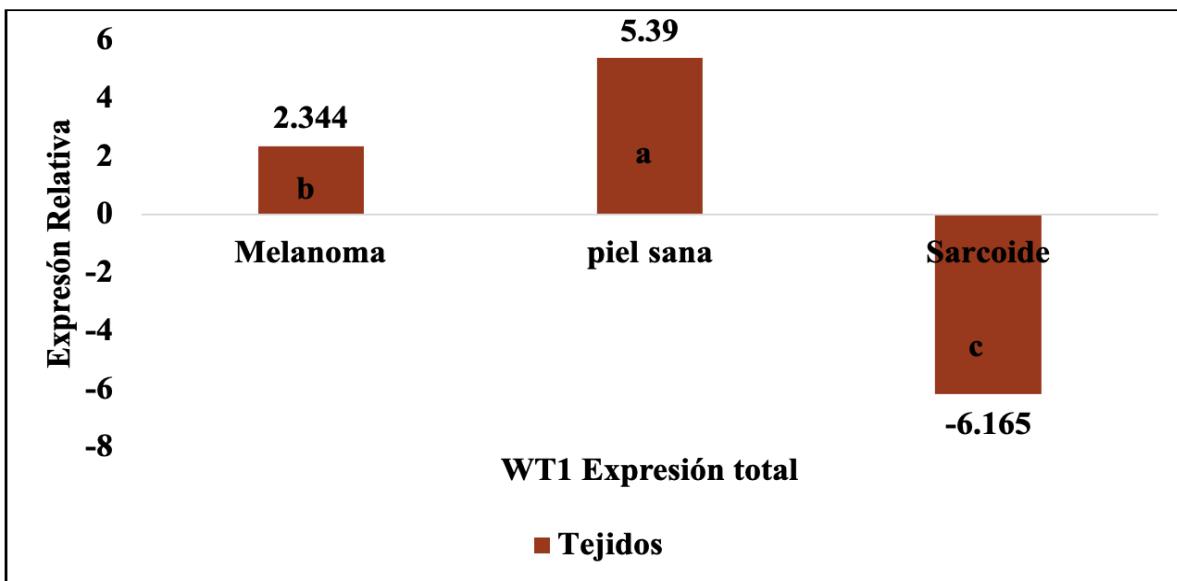
E: expresado S: sobreexpresado Sb: subexpresado.

5.4 RTqPCR

5.4.1 Análisis de las variantes de expresión de WT1 (17AA +/-, KTS +/-)

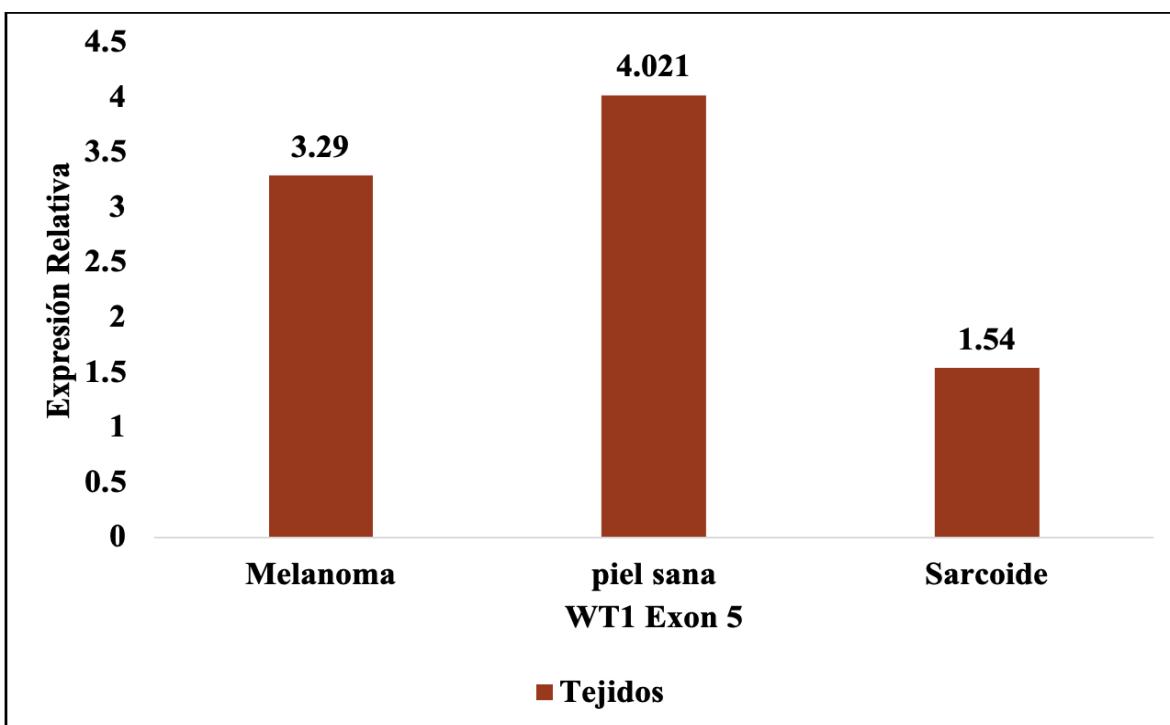
Se analizaron por RTqPCR las variantes de expresión diferencial de WT1, entre estas variantes se determinó el nivel de expresión relativa de los ARNm de WT1 expresión total, WT1 (17 AA +/-) exón 5, WT1 (KTS +/-), los resultados se analizaron por el método $2^{\Delta\Delta Ct}$ para el cual también se realizó el análisis de expresión de β -actina como gen constitutivo en los mismos tejidos de interés (piel sana, sarcoide y melanoma). Para el análisis del ARNm de WT1 expresión total, se observó una diferencia mínima significativa de (P-Value de 0.0001) mediante un ANOVA tomando como nivel de significancia a ($p \leq 0.05$) entre los tres grupos de tejidos.

Está diferencia de medias ($p \leq 0.05$) por el método de Tukey mostró que WT1 se comporta de forma diferente entre los tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma, el ARNm de WT1 expresión total, se expresa mayormente en la piel sana, seguido del melanoma y subexpresado en el sarcoide (Gráfica 10).



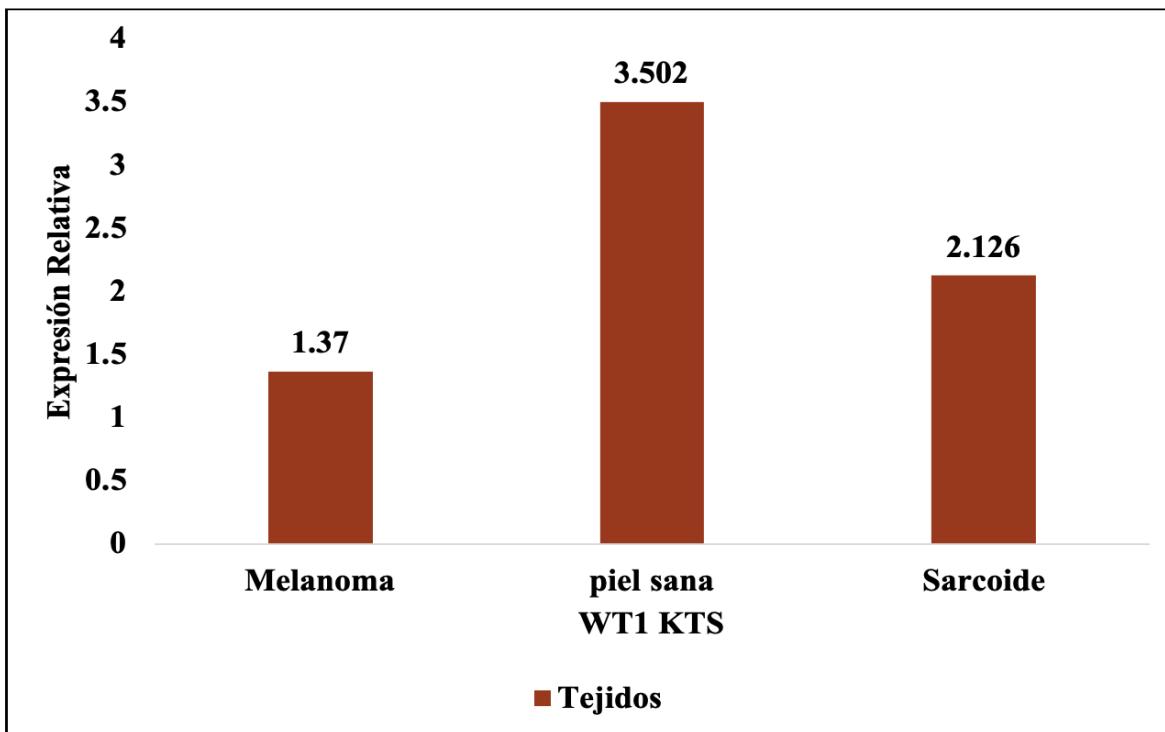
Gráfica 10. Análisis del ARNm de WT1 expresión total. Diferencia de expresión en los tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma por el método $2^{\Delta\Delta Ct}$, ANOVA ($p \leq 0.05$) y Tukey ($p \leq 0.05$).

El análisis de expresión de la variante de empalme en el exón 5 (17 AA +/-) de WT1 no mostró diferencia mínima significativa mediante un análisis de varianza con un nivel de confianza de ($p \leq 0.05$), por lo tanto, se considera que la expresión del ARNm de WT1 E5 +/- es similar en los tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma equino con un ($P\text{-value} = 0.514$). Sin embargo, existe una diferencia numérica en los diferentes grupos, donde la tendencia es mayor en la piel sana (5.021 UER), posteriormente el melanoma (3.29 UER) y por último el sarcoide (1.54 UER). (Gráfica 11).



Gráfica 11. Expresión del ARNm de la variante WT1 E5 en tejidos equinos. No se observaron diferencias significativas entre grupos; la expresión fue mayor en piel sana, seguida de melanoma y sarcoide.

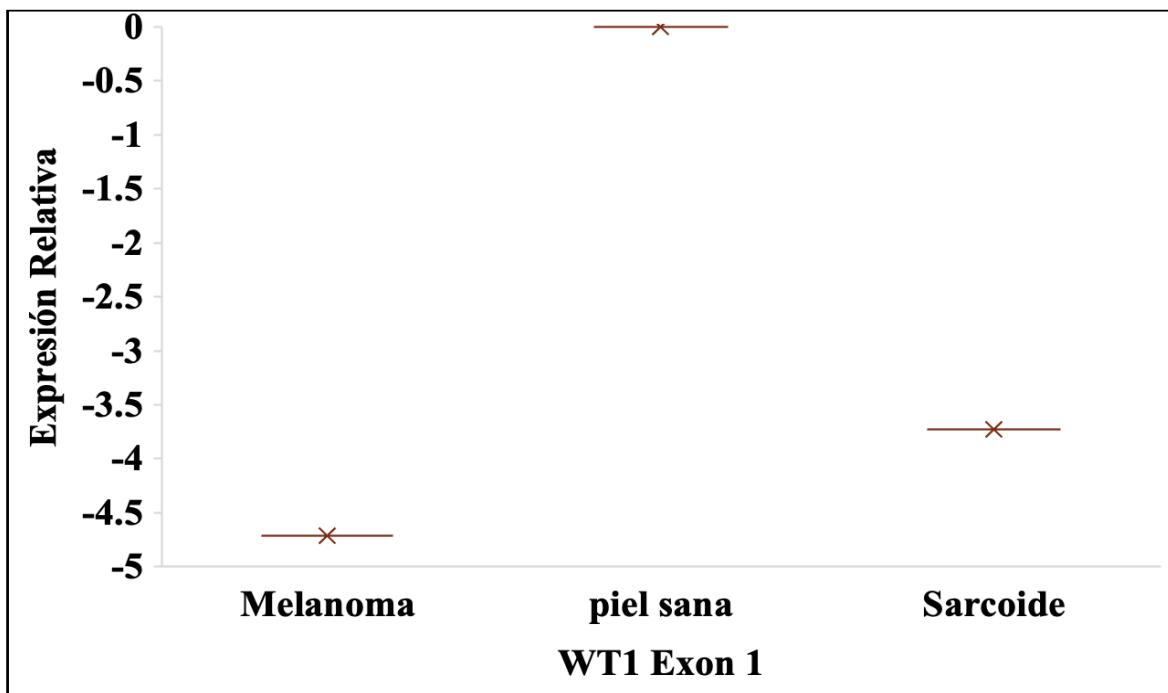
La isoforma de WT1 (KTS +/-) tampoco mostró una diferencia mínima significativa al realizar el análisis de varianza entre los grupos de sarcoide, piel sana y melanoma equino, con un nivel de significancia de ($p \leq 0.05$), para este análisis el resultado de P-Value fue (P-Value = 0.661), por lo que su comportamiento es similar entre los tres grupos. La tendencia numérica en esta isoforma muestra que el ARNm de la isoforma KTS se encuentra expresado en los tres diferentes tejidos, mayormente en la piel sana (3.502 UER), seguido del sarcoide (2.126 UER) y posteriormente en las neoplasias de melanoma equino (2.126 UER), (Gráfica 12).



Gráfica 12. Expresión del ARNm de la variante WT1 KTS en tejidos equinos. No se observaron diferencias significativas entre grupos; la expresión fue más alta en piel sana, seguida de sarcoide y melanoma.

5.4.2 Análisis de la metilación de WT1 Exón 1 por RTqPCR

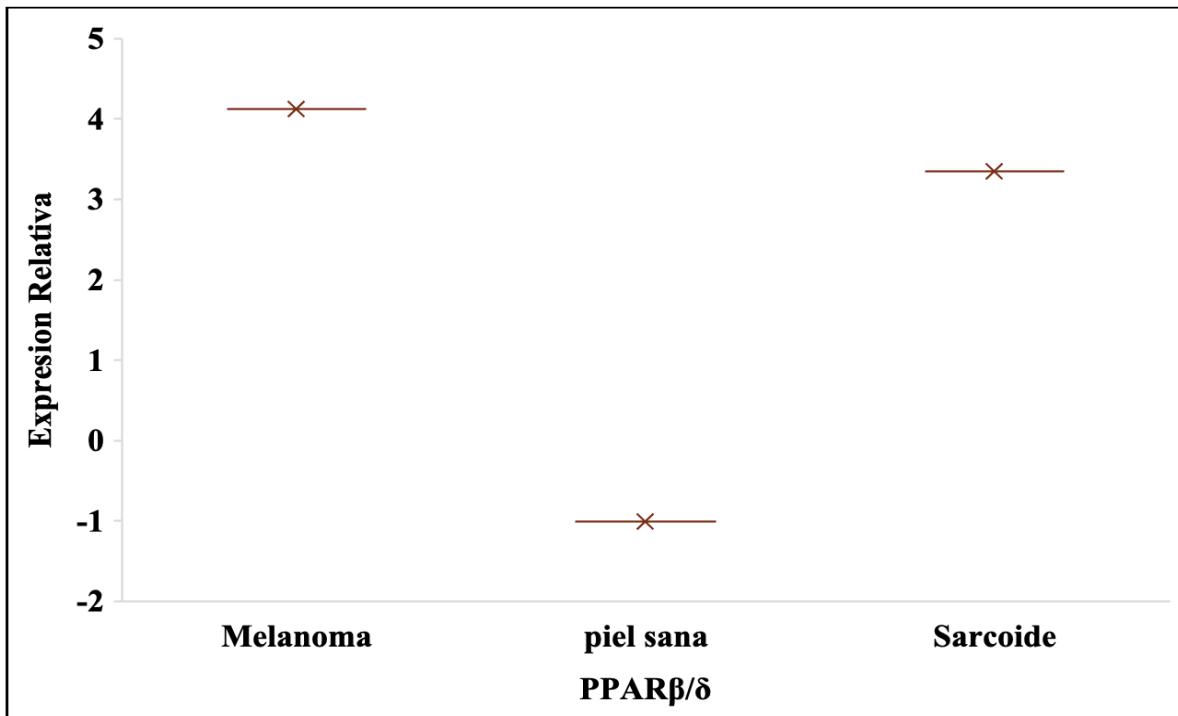
En el exón 1, se encuentra el promotor de WT1, cuya región se encuentra asociada a la metilación del ADN, siendo una variante de expresión diferencial importante de identificar, el análisis de esta región mediante una prueba de ANOVA ($p \leq 0.05$) no mostró diferencia mínima significativa entre los tres grupos de tejidos para el ARNm de WT1 exón 1, P-Value para este análisis fue de (P-Value = 0.149). Por otra parte, si existe una diferencia numérica en la que podemos encontrar que WT1 E1, se encuentra a nivel basal en la piel sana (0.00 UER), subexpresado en el sarcoide (-3.733 UER) y subexpresado en el melanoma (- 4.714 UER) (Gráfica 13).



Gráfica 13. Expresión del ARNm de la variante WT1 Exón 1 en tejidos equinos. No se observaron diferencias significativas; se registró expresión basal en piel sana y subexpresión en sarcoideos y melanomas.

5.4.3 Análisis de la expresión de PPAR β/δ por RTqPCR

Otra de las variantes de la expresión diferencial es por medio de la interacción que putativamente pudiese estar existiendo entre PPAR β/δ y WT1, se ha propuesto que esta interacción genera una regulación negativa de WT1, por lo que se analizó la expresión de PPAR β/δ y se correlacionó con la expresión en los tejidos de piel sana, sarcoide y melanoma, el ANOVA para este análisis mostró un ($P\text{-Value} = 0.072$), considerando un nivel de significancia de ($p \leq 0.05$), a pesar de que no hay diferencia estadística significativa de expresión entre las medias de los tres grupos de tejidos para el ARNm de PPAR β/δ , si existe una diferencia numérica que muestra una expresión positiva mayor en el melanoma (4.130 UER), seguido del sarcoide donde PPAR β/δ se expresa ligeramente menos con (3.344 UER) y mostrándose subexpresado en la piel sana con (-1.007 UER), (Gráfica 14).



Gráfica 14. Análisis de la expresión del ARNm de la variante de PPAR β/δ . Numéricamente PPAR β/δ se encuentra sobreexpresado en las neoplasias de melanoma, seguido de las neoplasias de sarcoide y subexpresado en la piel sana de equinos

5.4.4 Correlación de los mecanismos de expresión diferencial de WT1 en piel sana sarcoide y melanoma equino.

Los resultados finalmente obtenidos para el análisis de las variantes involucradas en la expresión diferencial de WT1 se resumen en la Tabla 8, en la cual se puede observar el comportamiento mediante el análisis del ARNm de cada una de ellas. El ARNm de WT1 expresión total se encuentra sobreexpresado en la piel sana, subexpresado en el sarcoide y expresado en el melanoma. La variante del E5 se encuentra igualmente expresada en la piel sana, en el sarcoide y en el melanoma, también la variante KTS se encuentra expresada en los tres tejidos. Por otra parte, el análisis de la metilación en el Exón 1 demostró que se encuentra en nivel basal en la piel sana, subexpresado en el sarcoide y en las neoplasias de melanoma. Para la variante de expresión diferencial mediada por la interacción con PPAR β/δ observamos que se encuentra subexpresado en la piel sana, sobreexpresado en el sarcoide y melanoma. (Tabla 8).

Tabla 8 Comportamiento de las variantes de expresión diferencial de WT1:

Variante	Piel sana	Sarcoide	Melanoma
WT1 Ex Total	S	Sb	E
E5	E	E	E
KTS (+)	E	E	E
E1 (Metilación)	B	Sb	Sb
PPAR-β/δ	Sb	S	S

B: basal, **E:** expresado, **S:** sobreexpresado, **Sb:** subexpresado.

6. DISCUSIÓN

La identificación clínica e histopatológica de las neoplasias ayudan al diagnóstico, pronóstico y tratamiento, pero sobre todo a tener un mejor panorama y ampliar las consideraciones para un abordaje adecuado. Existen diferentes localizaciones de acuerdo con el tipo de neoplasia, grados de malignidad y agresividad, por lo que esto debe ser considerado para generar un protocolo de tratamiento oportunamente. Particularmente en los sarcoides se logró categorizar y relacionar las lesiones típicas clínicas con las lesiones histopatológicas encontradas en las neoplasias de los pacientes remitidos con respecto a reportes o hallazgos documentados por otros autores. El sarcoide oculto, presenta características histopatológicas muy similares a los sarcoides verrucosos, sin embargo, en este estudio se destaca la infiltración de células hacia los órganos anexales en la dermis, así como la hiperplasia epidérmica en las lesiones ocultas a diferencia de las lesiones verrucosas. En cuanto a las lesiones verrucosas resalta la hiperqueratosis y uno de los hallazgos más sobresalientes encontrados fue la formación de vórtices, no solo sobre las fibras de colágena como lo reportado por Funiciello & Roccabianca en el 2020, sino que además estos vórtices se observaron sobre vasos sanguíneos con exuberantes fibras de colágena a su alrededor, que denotan una estructura característicamente engrosada. Por otra parte, en el sarcoide oculto, sobresale la formación de zonas apoptóticas sobre la región basal de la epidermis, reportado en otras neoplasias como en el melanoma y los sarcoides fibroblásticos ulcerados, no así en sarcoides nodulares donde la epidermis no presenta tantos cambios patológicos ni lesiones ulcerativas externas. Los hallazgos obtenidos en los sarcoides fibroblásticos coinciden con los cambios histopatológicos reportados por Knottenbelt y colaboradores en el 2015, presentando una alta tasa de células inflamatorias infiltrativas sobre el tejido de granulación y la hiperplasia de células fibroblásticas con tejido mixomatoso exuberante, que en principio dificultan el diagnóstico histopatológico, razón por la que coincidimos en que es más conveniente utilizar el inmunomarcaje en busca de la proteína E del VPB tipo II, debido a la falta del patrón repetitivo clásico de los sarcoides.

Los melanocitos no mantienen el pigmento melanocítico en paquetes celulares, estos la envuelven en las vesículas y la expulsan hacia las células epidérmicas, normalmente hacia los queratinocitos o hacia los fibroblastos dérmicos o células epiteliales (Knottenbelt, 2019), en nuestros hallazgos observamos a las células dendríticas y macrófagos circundantes de forma típica, tal y como lo han reportado otros autores, es importante destacar que la donación de vesículas hacia los sebocitos y las células epiteliales tanto de los folículos pilosos como las glándulas anéxales no se encuentran reportados, la melanina gruesa fagocitada por los melanófagos también es un hallazgo que se mantiene en común entre la melanomatosis dérmica y los nódulos localizados de melanomas dérmicos (Moore *et al.*, 2013), donde resalta esta característica en común. Es importante mencionar que existen muy pocos casos reportados en la literatura de nevos melanocíticos sin pigmento en la especie equina en contraste a las neoplasias en humanos. En este estudio se realizó la identificación histopatológica de una neoplasia de nevo melanocítico de células poligonales en forma de huso mitótico, se encontró una tasa de mitosis alta con pleomorfismo leve y la formación de nódulos con migración de células melanocíticas de la base de la epidermis hacia la dermis superficial, cambios celulares histopatológicos característicos del nevo azul celular reportado por Knottenbelt y colaboradores en el 2015. Durante este estudio no se logró identificar ningún caso de sarcoide mixto y sarcoide maligno anaplásico, en cuanto a la presentación clínica de melanomatosis dérmica se obtuvieron bloques de tejido embebido en parafina y cortes histológicos en los cuales logramos identificar las características histopatológicas en tejido de vasos sanguíneos e infiltración de melanocitos posterior al blanqueamiento con permanganato de potasio, cuyo tratamiento facilitó la identificación de las características celulares y la tasa de mitosis en este tipo de neoplasia, es destacable ya que este procesamiento es de mucha importancia para el diagnóstico histopatológico en los melanomas no solo en otras especies sino que también facilitan el diagnóstico en neoplasias melanocíticas en equinos.

El gen WT1 es considerado un objetivo terapéutico y de diagnóstico dual de acuerdo con su contexto biológico, su comportamiento se basa en sus funciones oncogénicas y supresoras, cumple funciones biológicas y moleculares específicas en la piel y sus componentes celulares. Las isoformas de 62 KDa, 54-56 KDa se localizan en el núcleo celular y se han relacionado con la capacidad de mediar la represión transcripcional y están asociadas a una

función supresora en los tejidos sanos. Las proteínas WT1 62 KDa y 54-56 KDa se encuentran ligadas al dominio -NH₂ y sugieren sitios de iniciación translacional alternativos que poseen actividad como factores transcripcionales de genes supresores de tumores en los aminoácidos 180 al 294, asociados en la activación transcripcional y desde los aminoácidos 84 al 179 asociado con la represión. (Dalloso *et al.*, 2004). Diversos estudios han examinado la presencia de WT1 en múltiples tumores: Tumores del sistema gastrointestinal y pancreático, órganos genitales, mama, pulmón, cerebro piel, tejidos blandos y hueso por hallazgos inmunohistoquímicos. Un estudio realizado por (Nakatsuka *et al.*, 2006) utilizaron el inmunomarcaje con anticuerpos dirigidos a la región amino y carboxilo terminales (6F-H2) y (C-19) respectivamente, y detectaron el anticuerpo (C-19) en el 35-100% de los tumores y con el anticuerpo (6F-H2) detectaron del 5-88% de los casos. En ese estudio concluyeron en que la diferencia en la inmunorreactividad entre C-19 y 6F-H2 podría deberse a los empalmes aberrantes y la desregulación por las alteraciones en la expresión génica de WT1 (Nakatsuka *et al.*, 2006). En el tumor de cáncer mamario canino (CBT), con la finalidad de vincular a WT1 con la actividad oncogénica se realizó el análisis de neoplasias de cáncer de mama canino benigno y maligno en el que detectaron la presencia de WT1, así como la presencia en la glándula mamaria sana, encontraron la evidencia de localización nuclear, contraste a la existencia de abundante inmunorreactividad citoplasmática positiva en biopsias de tumor de cáncer mamario maligno (Carranza *et al.*, 2019). Por otra parte, se sugiere que el hallazgo positivo para WT1 en la inmunohistoquímica como factor transcripcional, se debe presentar a nivel nuclear, no así en neoplasias, donde la fosforilación del dominio de unión al ADN de WT1 altera la afinidad del ADN y como consecuencia la retención de WT1 en el citoplasma (Nakatsuka *et al.*, 2006). En nuestro estudio se sugiere un fenómeno similar ya que en nuestros hallazgos encontramos una presencia abundante de la proteína WT1 en la piel sana a nivel nuclear y citoplasmático, contrario a la presencia limitada de la proteína WT1 en las neoplasias de sarcoide y melanoma a nivel nuclear. De igual forma pensamos que la relación con la presencia en citoplasma se debe a la utilización del anticuerpo monoclonal 6F-H2, que como se sabe reconoce un sitio que abarca desde el primer aminoácido al 181, nuestros hallazgos demuestran que WT1 en la piel sana del equino se encuentra en mayor proporción localizado a nivel nuclear, en relación con las neoplasias de sarcoide y melanoma, consideramos que su detección pudiera estar influencia por los

diferentes mecanismos de expresión diferencial en las neoplasias de melanoma y sarcoide equino lo que sugiere fuertemente que WT1 se encuentra llevando a cabo una función como supresor tumoral en la piel sana de equinos. De los mecanismos de expresión diferencial de WT1 que existen, uno de los más sobresalientes es la interacción que existe con el gen PPAR- β/δ , cuyo gen está involucrado en un mecanismo correpresor con el receptor X de retinoides, el cual reprime la actividad promotora de WT1 tras unirse a un oligonucleótido de 26 pb ubicado en el promotor de WT1, este promotor abarca a partir de una secuencia de 767 pb, involucrando la región -513 a la región + 254 nucleótidos de WT1 (Wagner *et al.*, 2003b) y (Michiels *et al.*, 2010). Existe una caracterización del gen del receptor activado por proliferador de peroxisomas beta delta de caballos (PPAR β/δ) un regulador conocido de la β -oxidación, la transformación de la fibra muscular y la resistencia a la carrera, en el cual demostraron que los dominios dedo de zinc C4 y el dominio de unión al ligando, están bien conservados en el caballo (Cho *et al.*, 2015). En nuestros resultados coincidimos con lo reportado por (Rangel 2017) en donde se demuestra la expresión heterogénea de la proteína PPAR- β/δ en la piel sana de equinos que involucra diferentes estructuras de la piel como; las células basales de la epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. En nuestros resultados encontramos que la proteína PPAR- β/δ se encuentra en mayor abundancia en las neoplasias de sarcoide y melanoma de equinos con relación a la piel sana. Para fortalecer esta asociación correlacionamos la expresión de PPAR- β/δ y WT1 en los tejidos de piel sana contra sarcoide y melanoma equino, donde encontramos que existe diferencia mínima significativa de expresión ($p \leq 0.05$) en donde PPAR- β/δ se comporta similar en las neoplasias (sobre expresado) con relación a la piel sana. Esto sugiere una inhibición de la expresión de WT1 limitada por PPAR- β/δ en las neoplasias de melanoma y de sarcoide de equinos. Datos obtenidos por Tafur en el 2021, comprueban la expresión del ARNm de PPAR- β/δ en muestras de piel sana de caballos con acondicionamiento físico, los cuales muestran mayor expresión del ARNm de PPAR- β/δ con relación a caballos sin acondicionamiento físico, también se compararon los niveles de expresión de PPAR- β/δ en melanomas de equinos y se demostró que existe un aumento de expresión en melanomas con respecto a la piel sana. Por RTqPCR buscamos una correlación en la expresión del ARNm de PPAR- β/δ en la piel sana en contraste a las neoplasias de sarcoide y melanoma, en este análisis no se encontró diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre las medias de los

tres grupos, pero sí una diferencia numérica que muestra una mayor expresión de PPAR- β/δ en los tejidos de melanoma y sarcoide con respecto a la piel sana. Además de la interacción con PPAR- β/δ , WT1 genera diferentes sitios funcionales en los que destacan: los dominios de reconocimiento del ADN y ARN por 4 dedos de zinc en la región carboxilo terminal, cuyo dominio se encuentra localizado a nivel nuclear, la ausencia de tres aminoácidos KTS (lisina, treonina y serina) en el exón 9 lo relacionan como un factor transcripcional para genes supresores de tumores, además de un dominio represor en el exón 5 vinculado a inserción de 17aa, un dominio de activación y represión ligado a la región amino terminal, así como un dominio de auto asociación (Scharnhorst et al., 2001) (Zhang et., al 2020). En un estudio detectaron sitios aberrantes metilados en el primer intrón del gen WT1 sobre las islas CpG asociadas con el silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores en las neoplasias, en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama y pacientes con cáncer de mama primario. La hipermetilación se asoció con el silenciamiento de la expresión del ARNm de WT1 longitud completa en células de cáncer de mama en los cuales los niveles de ARNm de WT1 conocidos de 3.0kb disminuyeron significativamente o no fueron detectados en algunas células, este proceso se restauró parcialmente tras ser tratadas con un agente desmetilante, posterior al tratamiento se expresó una transcripción de WT1 de 2.5 Kb en niveles altos, este proceso lo confirmaron tras diseñar cebadores que amplifican un fragmento del exón 1 de 274 pb para comparar la expresión por RT-PCR en las células de MDA-MB-231, dicho fragmento derivado del exón 1 no fue detectado en las células cancerígenas no tratadas con el agente desmetilante desoxicitidina C. Un estudio realizado por Marín en el 2021 analizó la expresión del ARNm de WT1 expresión total en la piel sana de caballos de diferentes tonalidades de piel, demostrando que WT1 se encuentra mayormente expresado en la piel de equinos diferentes a la oscura. También se analizó la diferencia de expresión de WT1 expresión total en neoplasias de melanoma de diferentes tamaños y se encontró que el ARNm de WT1 se expresa en el melanoma, siendo mayor la expresión en tumores menores a 2 cm². En este estudio se buscó la diferencia de expresión del ARNm de diferentes sitios funcionales de WT1 en la piel sana; expresión total, Exón 5, KTS y la región metilante del exón 1, se compararon las expresiones con las neoplasias de melanoma y sarcoide y se identificó que en la piel sana de equinos existe la expresión del ARNm de todas las variantes analizadas de WT1. Se encontró que existe mayor expresión de WT1 expresión total en la

piel sana, además de la expresión del exón 5 y la isoforma KTS. Por otra parte, se identificó que existe una expresión a nivel basal del fragmento esperado de la región dirigida a la isla CPG del exón 1 (posición 361-785). En la neoplasia de sarcoide equino el ARNm de WT1 expresión total se encontró subexpresado al igual que el fragmento esperado del exón1, las isoformas KTS y E5 se expresaron en niveles bajos en comparación con la piel sana en esta neoplasia. En la neoplasia de melanoma equino las variantes de expresión total, E5 y KTS se expresaron en niveles bajos en comparación con la piel sana, sin embargo, el fragmento esperado del exón 1 demostró una marcada subexpresión en relación con el resto de las variantes, así como en relación con la piel sana. El ARNm de PPAR- β/δ por otra parte se encontró sobreexpresado en las neoplasias y no en la piel sana, cabe destacar que la interacción que existe entre PPAR- β/δ y WT1 se da en la actividad promotora de un oligonucleótido de 26 pb en el promotor de WT1 que involucra una secuencia de 767 pb desde la región -513 hasta a la + 254 nucleótidos de WT1(Wagner *et al.*, 2003a), y que posterior a ella se encuentra la isla CpG en el exón 1(Laux *et al.*, 1999), por lo que los resultados de expresión para la secuencia esperada del exón 1 para el análisis de la metilación pudiese estar influenciado por la inhibición de PPAR- β/δ previo a este sitio.

7. CONCLUSIONES

En función de la apariencia morfológica relacionamos los niveles de agresividad histopatológica con la sobreexpresión de PPAR- β/δ , por lo que podríamos considerar que PPAR- β/δ funciona como un marcador diagnóstico para las variantes clínicas de sarcoide y melanoma equino. WT1 se encuentra expresado en la piel sana de equinos y su localización nuclear lo vinculan con una función como supresor tumoral.

Los mecanismos de regulación diferencial de WT1 en las neoplasias de melanoma y sarcoide equino, generan una atenuación de la expresión completa de WT1, la cual es influenciada por un mecanismo de metilación en el exón 1, que afecta su expresión en los tumores.

Otra posibilidad es que este mecanismo de regulación diferencial en los tumores se debe a un proceso regulado por la presencia de la proteína PPAR- β/δ al influir en la transcripción de la proteína típica de WT1 limitando así su función supresora.

Sería importante que futuros estudios pudieran enfocarse en diferenciar entre estos mecanismos de expresión diferencial y detectar la interacción física entre WT1 y PPAR- β/δ . Por otra parte, la secuenciación del gen WT1 en la piel sana de equino, sarcoide y melanoma, sería muy útil para definir su estado en estos tejidos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alečković, M., McAllister, S., Polyak, K. (2019). Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1872 (89–102). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.06.002>.
- Aktipis, C.A., Boddy, A. M., Jansen, G., Hibner, U., Hochberg, M. E., Maley, C. C., & Wilkinson, G. S. (2015). Cancer across the tree of life: Cooperation and cheating in multicellularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370 (1673). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0219>.
- Billi, T., Karadima, V., Tyrnenopoulou, P., Apostolopoulou, E., Brellou, G., Diakakis, N. (2021). Surgical excision of a malignant metastatic melanoma located in a skeletal muscle of the lateral thorax of a horse. *Veterinary Medicine and Science*, 7 (297–302). <https://doi.org/10.1002/vms3.366>.
- Boddy, A., Abegglen, L., Pessier, A., Aktipis, A., Schiffman, J., Maley, C., & Witte, C. (2020). Lifetime cancer prevalence and life history traits in mammals. En *Evolution, Medicine and Public Health* 1 (187–195). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOAA015>.
- Carranza, B., D., Zamora, Salas, D., Soto, A., (2019) WT1 Expression as a potential biomarker of malignancy in canine breast tumor. *Int. J. Morphol.*, 37 (190-195).
- Cho, H., Shin, S., Park, J., Choi, J., Kim, N., Lee, W., Lee, H., Song, K., Cho, B. (2015). Molecular characterization and expression analysis of the peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR δ) gene before and after exercise in horse. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28 (697–702). <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0575>.
- Dallosso, A., Hancock, A., Brown, K., Williams, A., Jackson, S., Malik, K. (2004). Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows derugulation in Wilm's tumours. *Human Molecular Genetics*, 13 (405–415). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh038>.
- Davies, R., Bratt, E., Hastie, N. (2000). Did nucleotides or amino acids drive evolutionary conservation of the WT1 ±KTS alternative splice? *Human Molecular Genetics* 9 (8).
- Funiciello, B., Roccabianca, P. (2020). Equine Sarcoid. *Equine Science*. Intech Open. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91013>.

Garza, O. (2015). Análisis de la expresión del gen wt1 (tumor de wilms) en melanoma (tesis de maestría), Universidad Autónoma De Nuevo León Posgrado conjunto Agronomía-Veterinaria.

Groom, L., Sullins, K. (2017). Surgical excision of large melanocytic tumours in grey horses: 38 cases (2001–2013). Equine Veterinary Education, 30 (438–443). <https://doi.org/10.1111/eve.12767>.

Hastie, N. (2017). Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. Development Cambridge, 144 (2862–2872). <https://doi.org/10.1242/dev.153163>.

Hollis, A. (2024). Equine melanoma Updates. En Veterinary Clinics of North America Equine Practice 40 (431–439). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2024.07.008>.

Knottenbelt, D., McGarry, J. (2009). Pascoe's principles & practice of Equine dermatology (2^a ed.). Saunders Elsevier (4-9).

Knottenbelt, D., Patterson-kane, J., Snalune., K. (2015) Clinical Equine Oncology. (1st ed.). England Elsevier (237-246).

Knottenbelt, D. (2019). The Equine melanoma. Dermatology and lumpology. AAEP proceedings 65 (28-38)

Laux, D. E., Curran, E. M., Welshons, W. V, Lubahn, D. B., & H-M Huang, T. (1999). Hypermethylation of the Wilms' tumor suppressor gene CpG island inhuman breast carcinomas. En Breast Cancer Research and Treatment (vol.56).

Marín, A. (2021) Análisis de la expresión de wt1 en piel normal y melanomas de caballos tordillos y otros colores de capade (tesis de maestría), Universidad Autónoma de Nuevo León, Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria.

Metcalfe, L., O'Brien, P., Papakonstantinou, S., Cahalan, S., McAllister, H., Duggan, V. (2013). Malignant melanoma in a grey horse: Case presentation and review of equine melanoma treatment options. Irish Veterinary Journal 66 (1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-66-22>.

McMaster, M., Gessler, M., Stnanbridge, E., Weissman, B., (1995) WT1 expression alters tumorigenicity of the G401 kidney-derived cell line. Cell Growth & Differentiation: the Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research. 12. (1509-1617).

- Meuten, J. (2017) Tumors in Domestic Animals.
- Michiels, J., Perrin, C., Leccia, N., Massi, D., Grimaldi, P., & Wagner, N. (2010). PPAR β activation inhibits melanoma cell proliferation involving repression of the Wilms' tumour suppressor WT1. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459 (689–703). <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0776-6>.
- Moore, J., Shaw, C., Shaw, E., Buechner-Maxwell, V., Scarratt, W., Crisman, M., Furr, M., Robertson, J. (2013). Melanoma in horses: Current perspectives. *Equine Veterinary Education*, 25 (144–151). <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00368.x>.
- Moreira, T., Blanca, W., Gundim, L., Castro, I., Medeiros -Rochi, A. (2019) Melanin bleaching with potassium permanganate for melanocytic lesions diagnosis in veterinary medicine. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 71 (1497-1505) <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10258>.
- Munday, J., Lewis, M., Leyland, M. (2024). Sarcoid within the oral cavity of a horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1 (133). <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2024.105003>.
- Nakatsuka, S., Oji, Y., Horiuchi, T., Kanda, T., Kitagawa, M., Takeuchi, T., Kawano, K., Kuwae, Y., Yamauchi, A., Okumura, M., Kitamura, Y., Oka, Y., Kawase, I., Sugiyama, H., Aozasa, K. (2006). Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology*, 19 (804–814). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800588>.
- Phillips, J., Lembcke, L. (2013). Equine melanocytic tumors. En *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 29 (673–687). <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2013.08.008>.
- Rangel, I. (2017) Análisis de la expresión del gen wt1 (tumor de wilms) y su asociación con PPAR- β/δ en piel sana y melanoma de equino. (tesis de maestría) Universidad Autónoma De Nuevo León, Posgrado conjunto Agronomía-Veterinaria.
- Ross, H., Pawlina, W. (2015) Histología texto y atlas, correlación con biología celular y molecular. (7^a ed). (529-555).
- Scharnhorst, V., Van Der Eb, A., Jochemsen, A. (2001). WT1 proteins: functions in growth and differentiation. 1 (141-161) www.elsevier.com/locate/gene.
- Semik-Gurgul, E. (2020). Molecular approaches to equine sarcoids. *Equine Veterinary Journal*, 53 (221–230). <https://doi.org/10.1111/evj.13322>.

- Tafur, L. (2021). 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 de maestría), Universidad Autónoma de Nuevo León Posgrado conjunto Agronomía-Veterinaria.
- Toska, E., Roberts, S. (2014). Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochemical Journal* 461 (15–32). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20131587>.
- Wagner, K., Wagner, N., Schedl, A. (2003a). The complex life of WT1. *Journal of Cell Science*, 116 (1653–1658). <https://doi.org/10.1242/jcs.00405>.
- Wagner, K., Wagner, N., Wellman, S., Schley G., Bondke, A., Theres, H., Scholz H. (2003b) Oxygen-regulated expression of the Wilmsí tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) The *faseb Journal express article*. 10.1096/fj.02-1065fje.
- Wagner, N., Wagner, K. (2020). PPAR Beta: Delta and the Hallmarks of Cancer Enhanced Reader. *Cells* 9 (1133) Doi:10.3390/cells9051133.
- Wang, X., Zhao, J., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, J., Shi (2023). Molecular mechanism of Wilms' tumor (Wt1) (+/-KTS) variants promoting proliferation and migration of ovarian epithelial cells by bioinformatics analysis. *Journal of Ovarian Research*, 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01124-2>.
- Yang, L., Han, Y., Suarez F., (2007) A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story, *Leukemia* 21 (868-876). doi: 10.1038/sj.leu.2404624.
- Zamora, D., Franco, M., Trejo, M., Rodriguez, C., Reséndez, D. (2007) RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research* 17 (341-348).
- Zhang, Y., Yan, W., Yang, Z., Li, T., Jiang, J., Zhang, Y. (2020). The role of WT1 in breast cancer: Clinical implications, biological effects and molecular mechanism. *International Journal of Biological Sciences*, 16 (8), 1474–1480. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39958>.
- Zoete, V., Grosdidier, A., Michelin, O. (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 (915–925). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007>.