



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

"FRECUENCIA DEL REARREGLO DE LINE-1/c-myc EN MUESTRAS DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE OBTENIDAS DE PERROS DE LA ZONA CONURBANA DE TOLUCA"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CRISTIAN GUSTAVO ZUPPA GUTIÉRREZ

ASESOR DE TESIS

DR. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA

COASESOR

DR. OSWALDO HERNÁNDEZ GALLEGOS

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Julio 2021

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. MARCO TEÓRICO:	
1.1 CÁNCER	5
1.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES	9
1.2.1 p53	10
1.3 ONCOGENES	12
1.3.1 myc	14
1.4 TIPOS DE MUTACIONES ONCOGÉNICAS	18
1.4.1 Mutaciones puntuales	18
1.4.2 Deleciones	18
1.4.3 Translocaciones	19
1.4.4 Elementos Transponibles	21
1.5 TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE CANINO (TVTC)	25
1.5.1 Características citológicas y morfológicas	25
1.5.2 Origen	28
1.5.3 Transmisión	29
1.5.4 Importancia del TVTC como modelo de estudio ..	30
2. HIPÓTESIS	34
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL Y MÉTODOS	35
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	51
8. ANEXOS	52
9. BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

El Tumor Venéreo Transmisible Canino (TVTC), también llamado sarcoma venéreo transmisible, sarcoma de Sticker, granuloma venéreo y sarcoma infeccioso, es un tumor venéreo contagioso de perros (Ganguly et al., 2013). El TVTC es el único tumor naturalmente contagioso que se transmite durante el coito o las conductas sociales (Setthawongsin et al., 2016).

Primero descrito por Hujard en 1820 en Europa, el TVTC es el tumor más comúnmente observado en perros que están en contacto cercano entre sí, o en perros callejeros y salvajes que exhiben actividad sexual desenfrenada (Ganguly et al., 2013).

En 1876, por primera vez en la historia de la oncología, el veterinario ruso Novinsky demostró el trasplante del tumor de un perro a otro infectándolos con células tumorales. Hasta el momento, solo se conocen tres tumores contagiosos transmisibles de forma natural en los mamíferos: el TVTC, la enfermedad del tumor facial del demonio de Tasmania (DFTD) y un tumor similar de los hámsters sirios (Ganguly et al., 2013).

Citológicamente, las células TVTC tienen una apariencia de forma redonda a ovalada y, a menudo, contienen figuras mitóticas, con agrupación de cromatina y uno o dos nucleolos prominentes. El hallazgo citológico más sorprendente es la presencia de múltiples vacuolas citoplásmicas claras (Ganguly et al., 2013).

El cariotipo normal del perro doméstico (*Canis familiaris*, $2n = 78$) comprende 38 pares de autosomas acrocéntricos, más los cromosomas sexuales X y Y submetacéntricos. Por el contrario, las células TVTC presentan de 57 a 59 cromosomas, de los cuales 16-18 se consideran metacéntricos y el resto acrocéntricos, lo que indica un tremendo grado de reorganización estructural (Thomas et al., 2009).

Según la ubicación del tumor, el diagnóstico de TVT genital (TVTG) es comparativamente más fácil que en el área extragenital (TVTE), ya que el TVTE se diagnostica comúnmente de manera incorrecta. Afortunadamente, las células TVTC contienen un elemento nuclear intercalado largo (LINE, del inglés Long Interspersed Nuclear Element), insertado cerca del gen *myc*, lo que permite un análisis de detección basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Setthawongsin et al., 2016).

Debido a que este rearrreglo genético en el genoma del TVTC, es una porción estable, y como produce un resultado constante con la técnica de PCR, se puede predecir que esta técnica es apropiada para el diagnóstico molecular del tumor (Liao et al., 2003).

Aunque la característica más importante del tumor es el rearrreglo LINE-1/c-*myc*, en Toluca, no se ha generalizado una técnica específica para su diagnóstico, empleándose diversos estudios, como los citológicos e histopatológicos, pudiendo confundirse con otras células tumorales de apariencia y características similares.

En este estudio, la técnica de PCR y los oligoiniciadores asociados con la inserción LINE fueron usados en 200 muestras tumorales, obtenidas de perros de la zona conurbana de Toluca, entre 2010 y 2018, para investigar si las células de dichas masas tumorales son positivas para el rearrreglo LINE-1/c-*myc*, y con la misma técnica se compararon con tejidos normales del mismo perro, y con tejidos tumorales que no son TVTC. Por ello, y como ya se mencionó anteriormente, si el rearrreglo LINE-1/c-*myc* está presente únicamente en todas las muestras tumorales de los TVTC de la zona conurbana de Toluca de este estudio, su identificación con la técnica de PCR podría ser usado como marcador diagnóstico para confirmar clínicamente si un tumor es un TVTC.

MARCO TEÓRICO

1.1 CÁNCER

El cáncer se puede definir, de manera simplificada, como un crecimiento anormal de células. El cáncer surge de cualquier órgano o estructura corporal y está compuesto por células diminutas que han perdido la capacidad de dejar de crecer. Ocasionalmente, el cáncer puede detectarse "de manera incidental" mediante una prueba de laboratorio o una prueba radiológica de rutina o por otras razones. En general, el cáncer debe alcanzar un tamaño de 1 cm, o estar compuesto por aproximadamente 1 millón de células, antes de ser detectado. En este punto, puede denominarse "masa", "crecimiento", "tumor", "nódulo", "bulto" o "lesión". Las excepciones a esta regla general incluyen los cánceres de la sangre y la médula ósea (leucemias y linfomas), que con frecuencia no producen una "masa", pero que serán evidentes en las pruebas de laboratorio (Roy y Saikia, 2016).

La transformación de una célula normal en una cancerosa probablemente no sea un evento tan crítico en la génesis del cáncer; más bien es la incapacidad de las células inmunes del cuerpo para identificar y destruir las células cancerosas recién formadas cuando son pocas. El riesgo de cáncer se multiplica en aquellos organismos, cuyo sistema inmunológico está inhibido por cualquier factor que incluye estrés crónico, vejez, enfermedad debilitante crónica, uso previo de quimioterapia y abuso de fármacos como analgésicos, antibióticos y corticoesteroides (Roy y Saikia, 2016).

Actualmente se acepta que el cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones en los genes que controlan directamente la proliferación y/o muerte celular. Pero los mecanismos mediante los cuales estas mutaciones se generan son objeto de debate continuo. Se ha sugerido que las tasas normales de mutación, junto con la velocidad de expansión clonal, son suficientes para generar una alteración en el proceso normal en los organismos e inducir cáncer,

pero que es a partir de un mecanismo de evasión en la corrección de estas mutaciones lo que origina a las células tumorales transformadas. Es importante recalcar que la inestabilidad genética es necesaria para que un tumor se desarrolle, pero no son exactamente los mismos cambios los que ocurren en todos los tipos de tumores (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2017).

Numerosas anormalidades cromosómicas, y por consecuencia genéticas, han sido relacionadas con los tumores. La gran mayoría de esas alteraciones han sido asociadas con genes y proteínas que forman parte de la maquinaria del ciclo celular. Muchos tipos celulares diferentes pueden sufrir la transformación a un estado maligno. Existe un mecanismo general común que consiste en la acumulación de múltiples mutaciones en una sola célula que provocan su proliferación descontrolada. Algunas de estas mutaciones pueden transmitirse de padres a hijos a través de la línea germinal. Otras surgen nuevas en el linaje celular somático de una célula determinada (Rodríguez et al., 2004).

En el año 2000, los investigadores Hanahan y Weinberg propusieron agrupar, bajo el término “sellos del cáncer”, seis características de las células neoplásicas que aseguran la progresión tumoral, en interacción con el microambiente tumoral. En ese trabajo de revisión, aparecido en la revista “Cell”, los autores consideraron que los sellos del cáncer incluyen señales proliferativas constitutivas, potencial replicativo sostenido, inhibición de señales antiproliferativas, resistencia a la apoptosis, inducción de neoangiogénesis y capacidad metastásica. Adicionalmente, los autores otorgaron la categoría de cualidad habilitante a la inestabilidad genética, como característica imprescindible para que se instauren los sellos del cáncer. Sin embargo, una actualización del tema publicada por los mismos autores en 2011, incrementó a ocho los sellos del cáncer, al incluir la reprogramación metabólica y la evasión a la vigilancia del sistema inmune. Asimismo, la inflamación crónica se incluyó junto a la inestabilidad genética como cualidad habilitante. Estas consideraciones reflejan la acumulación de evidencias acerca de la influencia del sistema inmune sobre la progresión tumoral (De León y Pareja, 2019).

Estos sellos o rasgos, hoy en día son blancos de múltiples investigaciones con la finalidad de caracterizar molecularmente al cáncer y desarrollar nuevas herramientas terapéuticas dirigidas específicamente contra los mecanismos celulares y vías de señalización que se encuentran alterados en esta patología (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2017).

Las células normales están programadas para morir si se ven sujetas a distintos estímulos que produzcan estrés no fisiológico; si se aíslan de su medio, las células son incapaces de recibir señales de supervivencia específicas del tejido, produciendo expresión de oncogenes (genes que codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de genes supresores de tumor (genes que codifican proteínas que frenan el ciclo celular) de manera espontánea (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2017).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características importantes, incluyendo la pérdida de diferenciación, el incremento de su capacidad para invadir otros tejidos u órganos y una pérdida de su sensibilidad hacia los fármacos, todo esto debido a una evolución celular causada por múltiples cambios genéticos provocados por la acumulación de mutaciones en el genoma. Alteraciones en el cariotipo, pérdida total de un cromosoma o ganancia de otro, cambios en la ploidía y una gran variedad de aberraciones cromosómicas son comunes en células cancerosas (Hartwell y Kastan, 1994).

Defectos en la revisión del ADN puede ser responsable de rearrreglos cromosómicos tales como deleciones, amplificaciones y translocaciones (como el rearrreglo LINE-1/c-myc). Defectos en la revisión del huso mitótico puede causar la no disyunción mitótica, produciendo la ganancia o la pérdida de cromosomas completos. Por último, defectos en la revisión de los polos del huso mitótico pueden causar cambios en la ploidía del genoma. Estas tres categorías de cambios genómicos, arreglos cromosomales, aneuploidías y poliploidías, son comunes durante la evolución de la

célula cancerosa. Aunado a lo anterior, la revisión de secuencias teloméricas que se pierden durante la senescencia pueden ser importantes en las señales de células somáticas para detener la proliferación (Hartwell y Kastan, 1994).

La idea actual del desarrollo del cáncer es que las células normales son transformadas en células tumorales por mutaciones secuenciales que activan los oncogenes promotores del cáncer, o inhiben genes que suprimen tumores o que provocan inestabilidades genéticas. De cualquier forma, algunas células tumorales pueden comportarse como agentes infecciosos y moverse de un hospedero a otro (Dingli y Nowak, 2006). Este es el caso del TVTC (Tumor Venéreo Transmisible Canino), que nos ocupa y que se abordará más adelante.

1.2 GENES SUPRESORES

Se puede definir a los genes supresores de tumor como genes que codifican proteínas que frenan el ciclo celular de manera espontánea (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2017).

Los genes supresores tumorales están implicados en diversos procesos de división celular: la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, programación de la muerte celular y estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular; de modo que se produce una proliferación más o menos incontrolada de la célula, lo cual conduce, en ocasiones, al desarrollo de neoplasias y a la evolución de las mismas hacia procesos tumorales más agresivos (García et al., 2018).

Las mutaciones en los genes supresores de tumores que promueven la formación de tumores son mutaciones recesivas con pérdida de función. Es decir, este tipo de mutación hace que los productos génicos codificados pierdan gran parte o toda su actividad (es decir, la mutación es una mutación nula). Además, para que se desarrolle el cáncer, la mutación debe estar presente en ambos alelos del gen. Algunos genes supresores de tumores codifican reguladores negativos cuya función normal es inhibir el ciclo celular. Otros codifican reguladores positivos que normalmente activan la apoptosis o muerte celular de una célula dañada. Otros son actores indirectos del cáncer, con un papel normal en la reparación del ADN dañado o en el control de la longevidad celular (Griffiths et al., 2015).

Las mutaciones en el gen p53 están asociadas con muchos tipos de tumores. De hecho, se estima que el 50 por ciento de los tumores humanos carecen de un gen p53 funcional. La proteína p53 activa es un regulador transcripcional que se activa en respuesta al daño del ADN (Griffiths et al., 2015).

1.2.1 p53

Se aborda un poco acerca de este gen, ya que es uno de los genes supresores más importantes. Este gen, en condiciones de normalidad, codifica una fosfoproteína nuclear que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular mediante una acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis. Cuando ocurren mutaciones en p53, se produce una síntesis anormal de proteína, proteína p53 mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo. Esta proteína mutada pierde su capacidad supresora del crecimiento celular. La regulación negativa del p53 sobre la replicación ocurre ante diferentes tipos de agresiones en el ADN, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata del incremento p53 es la detención del ciclo celular en G1, mientras los mecanismos de reparación del ADN actúan (García et al., 2018).

Si la reparación del ADN es satisfactoria, p53, activará a un gen denominado mdm2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo celular. Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 puede inducir el inicio de muerte celular programada (apoptosis). De esta forma, la proteína p53 actúa como un verdadero guardián de la integridad del genoma, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN, previniendo la inestabilidad genómica (García et al., 2018).

La pérdida de dicha proteína y por lo mismo de las señales apoptóticas, pueden contribuir a la inestabilidad genómica y a la tumorigénesis por la pérdida de un mecanismo para eliminar células con daño genético. Esto puede ocurrir a principios de la progresión del cáncer, provocando inestabilidad genética por células sobrevivientes o genéticamente dañadas (Hartwell y Kastan, 1994).

Cuando los daños en el ADN han sido reparados, el proceso de inhibición se revierte mediante una caída de los niveles de p53 tras la reparación del ADN y el cese de la

inhibición de la actividad quinasa del complejo cdk-ciclina, lo que se traduce en el desbloqueo del punto de control G1-S, y el ciclo continúa. Cambios simples de aminoácidos en largas regiones de la molécula de p53 pueden tener influencias marcadas en su función (Schafer, 1998).

A partir de lo analizado anteriormente se puede apreciar que la mayoría de los tumores se desarrollan como resultado de la acumulación de errores genéticos; las mutaciones y acumulación en el interior de la célula del gen supresor de tumores p53, es lo más común en el cáncer. Esto da lugar a una sobreproducción de la proteína p53 inactiva que se acumula en las células epiteliales perdiendo su capacidad supresora (García et al., 2018).

Solo en raras ocasiones, células que carecen de la función normal de p53 continúan a través del ciclo celular a pesar de que el ADN esté dañado. Por lo tanto, la capacidad de la célula para reparar el daño al ADN antes de entrar en mitosis es reducida o nula, y después de realizar la mitosis, el daño se fija en el genoma (Schafer, 1998). Por tanto, las mutaciones en estos genes interfieren con la reparación del ADN. Promueven el crecimiento tumoral indirectamente al elevar la tasa de mutación, lo que hace que sea mucho más probable que surjan una serie de mutaciones oncogénicas y supresoras de tumores, que corrompen la regulación normal del ciclo celular y la muerte celular programada (Griffiths et al., 2015).

1.3 ONCOGENES

Los oncogenes codifican formas mutadas de proteínas celulares normales que dan como resultado mutaciones dominantes, generalmente debido a su activación inapropiada. Esa afirmación sugiere dos características clave de las mutaciones oncogénicas. En primer lugar, las proteínas codificadas por oncogenes suelen activarse en las células tumorales y, en segundo lugar, la mutación debe estar presente en un solo alelo para contribuir a la formación del tumor. El gen en su forma normal sin mutaciones se llama protooncogén (Griffiths et al., 2015).

La actividad de los oncogenes celulares puede verse influenciada de varias formas, como resultado de lo cual el oncogén puede adquirir la capacidad de contribuir a la transformación de células tumorales. Los principales mecanismos implicados en la inducción de la actividad transformadora de los oncogenes celulares son: 1) la integración de un genoma retrovírico en un oncogén celular y el consiguiente aumento en el nivel de expresión del oncogén; 2) generación de una mutación puntual en la región codificante del oncogén que conduce a la formación de un producto génico alterado; 3) amplificación de genes, mediante la cual el número de copias del oncogén puede aumentar muchas veces; y 4) translocación del oncogén a otro cromosoma (Katzir et al., 1985).

Los oncogenes codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular o a la inactivación de genes supresores de tumor, e inducen cáncer, y que actualmente se pueden diagnosticar puntualmente los cambios a nivel de mutaciones y dirigir la terapia a estos blancos moleculares específicos para el tratamiento de pacientes con esta patología (Pérez-Cabeza de Vaca et al., 2017).

En general, aquellas proteínas que estimulan el ciclo celular se denominan oncoproteínas, codificadas por oncogenes. La ocurrencia de traslocaciones genéticas, mutaciones puntuales o amplificaciones en la secuencia de los oncogenes conduce a la transcripción y traducción de oncoproteínas con actividad

constitutiva, independiente de ligando. Los receptores de factores de crecimiento y las moléculas que transducen la señal de estos al núcleo celular actúan como oncoproteínas. En muchos casos, estas moléculas tienen actividad tirosina-quinasa, cuya activación constitutiva estimula la división celular (De León y Pareja, 2019).

Entre las oncoproteínas con mayor relevancia para la progresión de diversos tipos de tumores se incluyen Src, Abl, c-Kit, c-myc, intermediarios de señalización de la ruta de quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés Mitogen- Activated Protein Kinases) como RAS y RAF, y PI3K (De León y Pareja, 2019).

1.3.1 myc

En este estudio, nos interesa abordar las proteínas myc, que forman una pequeña familia de oncoproteínas estrechamente relacionadas, tres de las cuales (c-myc, N-myc, L-myc) han sido implicadas en la génesis de múltiples tumores humanos (Dejure y Eilers, 2017).

Las oncoproteínas myc pertenecen a una familia de los denominados "factores de supertranscripción" que potencialmente regulan la transcripción de al menos el 15% de todo el genoma. Los principales efectores posteriores de myc incluyen aquellos involucrados en la biogénesis de ribosomas, la traducción de proteínas y la progresión y metabolismo del ciclo celular, orquestando una amplia gama de funciones biológicas como la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la vigilancia inmunológica (Chen et al., 2018).

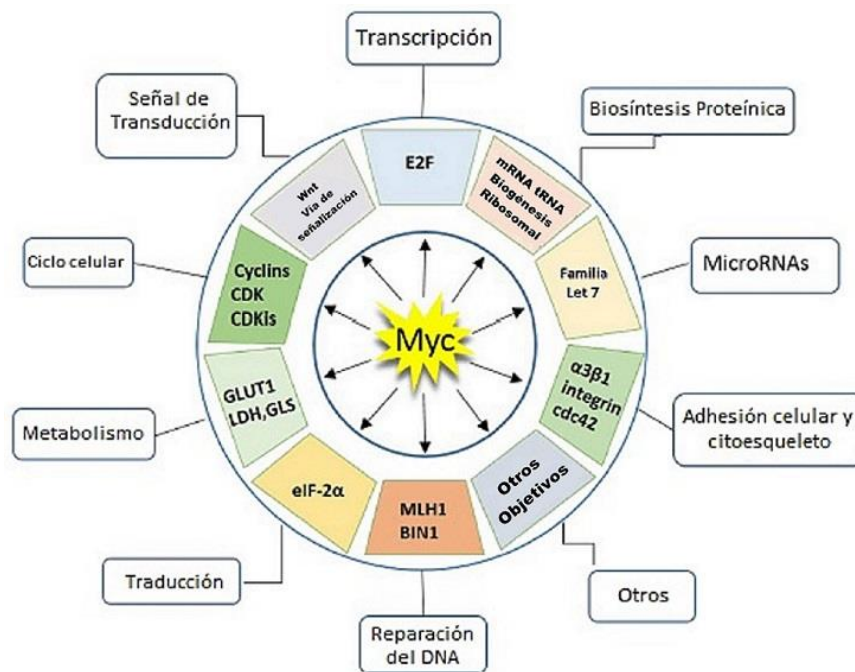


Figura 1. myc regula un espectro de funciones celulares. myc regula una gran cantidad de genes codificadores o no codificadores de proteínas que están involucrados en distintas funciones celulares, incluyendo el ciclo celular, la biogénesis de proteínas, la adhesión celular, el metabolismo, la transducción de señales, la transcripción y la traducción, entre otros (Chen et al., 2018).

Su expresión está estrechamente controlada por señales dependientes del factor de crecimiento en células normales y se regula y mejora a través de múltiples mecanismos en las células tumorales. Una gran cantidad de evidencia demuestra inequívocamente que la expresión mejorada de myc es una fuerza impulsora principal de la tumorigénesis y que tanto los tumores impulsados por myc como los tumores impulsados por otros oncogenes, por ejemplo, por RAS mutante, dependen continuamente de los niveles elevados de myc para el crecimiento (Dejure y Eilers, 2017).

Oncogenes transformantes, tal como c-myc, pueden simultáneamente estimular la proliferación celular y la apoptosis. Por lo tanto, la muerte programada de células es afectada por muchos de los mismos productos génicos que controlan la progresión del ciclo celular, resultando ambas en el incremento de la inestabilidad genómica y el incremento de la supervivencia de células anormales (Hartwell y Kastan, 1994).

En el cáncer, el tumor escoge frecuentemente la expresión y/o actividad de myc, lo que da como resultado una expresión elevada de ARN y proteína de myc; en consecuencia, myc ha sido identificado como uno de los oncogenes más comúnmente desregulados en una amplia variedad de tipos de cáncer. Esta expresión aberrante, o desregulación, de myc y los miembros de la familia myc en transformación (N-myc y L-myc) pueden tomar muchas formas diferentes, lo que refleja la complejidad de la regulación biológica de myc. En términos generales, la desregulación de myc puede clasificarse como alteraciones que dan como resultado productos de ARN o proteína de myc que no responden a estímulos reguladores negativos, lo que resulta en una expresión sostenida de myc o en niveles basales elevados de expresión de myc (Kalkat et al., 2017).

En contraste, bajos niveles de c-myc están asociados con células que no se dividen y diferenciadas. En suma, c-myc puede inducir apoptosis cuando esta sobre expresado bajo condiciones de crecimiento desfavorables (Sears, 2004).

La amplificación genética de myc es el marcador más comúnmente observado de la desregulación de myc en el cáncer. La duplicación de genes, que tiene lugar mediante duplicación del genoma o duplicaciones en tándem, es el mecanismo subyacente para las “alteraciones del número de copias” (CNA por sus siglas en inglés) en varios oncogenes. La evidencia de la amplificación de myc se identificó por primera vez en la línea celular de leucemia humana HL60 en 1982. Poco después, se descubrieron amplificaciones de N-myc y L-myc en líneas celulares y tumores de neuroblastoma y cáncer de pulmón de células pequeñas, respectivamente, siendo el cáncer de pulmón de células pequeñas el primer cáncer en tener amplificaciones de los tres miembros de la familia myc en transformación. En la última década, la mayoría de estudios de secuenciación de todo el genoma de tumores primarios, permitidos por los avances tecnológicos en la secuenciación de siguiente generación y el análisis de datos, establecieron el myc como uno de los genes amplificados con mayor frecuencia en los cánceres humanos y revelaron nuevos tipos de cáncer que albergan amplificaciones c-myc, N-myc y L-myc (Kalkat et al., 2017).

Se ha categorizado el cáncer en dos clases, una dominada por mutaciones somáticas y la otra por CNA. En la última clase, compuesta principalmente de cánceres de pulmón de ovario, mama y células escamosas, la amplificación de myc fue el principal CNA (Kalkat et al., 2017).

Los estudios en modelos de ratones transgénicos han demostrado que incluso la inactivación transitoria de myc provoca regresión tumoral, lo que sugiere que la regulación de myc oncogénico podría aprovecharse para tratar a pacientes con cáncer (Chen et al., 2018).

Sin embargo, el desarrollo de fármacos dirigidos directamente a myc ha resultado desafiante. Primero, como factor de transcripción, myc carece de un sitio activo específico para moléculas pequeñas, lo que dificulta la inhibición funcional de sus

actividades utilizando estrategias similares a las utilizadas para las quinasas. En segundo lugar, myc se encuentra predominantemente en el núcleo, por lo tanto, atacar a myc nuclear con anticuerpos monoclonales específicos es técnicamente poco práctico. Para superar estos obstáculos, se han investigado ampliamente enfoques alternativos para derogar indirectamente las funciones oncogénicas de myc (Chen et al., 2018).

Ahora, con un mejor entendimiento de cómo los niveles de proteína c-myc son regulados, podríamos estar más cerca de terapias más efectivas que estabilicen o desestabilicen la proteína c-myc.

1.4 TIPOS DE MUTACIONES ONCOGÉNICAS

1.4.1 Mutaciones Puntuales

A los intercambios puntuales de bases que emergen de la replicación se les llama mutaciones “puntuales o espontáneas” y tienen un carácter local. Muy raramente la máquina de replicación se salta o adiciona nucleótidos, o pone T por C, o A por G. Cada tipo de cambio del ADN constituye una mutación que se copia en las siguientes generaciones como la secuencia correcta (León, 2016).

Evidentemente, una mutación puntual no es suficiente para convertir una célula típicamente saludable en cancerosa. Muchas líneas de evidencias indican que la génesis del cáncer requiere que ocurran varios accidentes raros en una misma célula (León, 2016).

1.4.2 Deleciones

En una deleción, ocurre una rotura en el ADN que provoca la pérdida del mismo, o incluso de parte de un cromosoma junto con los genes de ese segmento. Una deleción puede ocurrir al final de un cromosoma o en una parte interna de él. A veces, los cromosomas se rompen y no se vuelven a unir. Tales rupturas dan como resultado deleciones de tan solo unos pocos pares de bases hasta un brazo cromosómico completo. Como es de esperar, las deleciones grandes son generalmente letales, mientras que las deleciones pequeñas pueden no tener ningún efecto o pueden causar trastornos humanos reconocibles. Un trastorno por deleción (1 de cada 20 000 a 50 000 nacidos vivos) es el síndrome de Cri Du Chat, en el que se elimina parte del brazo corto del cromosoma 5 (Solomon et al., 2018).

Las deleciones ocurren principalmente a nivel cromosómico, causando la pérdida de una parte de un brazo del cromosoma. El proceso de deleción requiere dos roturas cromosómicas para cortar el segmento intermedio. El fragmento eliminado

no tiene centrómero; en consecuencia, no se puede jalar hacia algún polo mediante el huso mitótico en la división celular y se pierde. Los efectos de las eliminaciones dependen de su tamaño. Una pequeña delección dentro de un gen, llamada delección intragénica, inactiva el gen y tiene el mismo efecto que el de otras mutaciones nulas de ese gen. Las delecciones multigénicas, son aquellas en las que faltan varios o muchos genes. Las consecuencias de estas delecciones son más graves que las de las delecciones intragénicas, y la combinación es casi siempre letal (Griffiths et al., 2015).

1.4.3 Translocaciones

La fusión génica, o translocación ocurre cuando un segmento de ADN o cromosoma, se puede mover a un segmento de ADN o cromosoma diferente. Hay varios tipos de translocaciones, pero las translocaciones recíprocas son el tipo más simple y común. Se forma cuando dos fragmentos de ADN se intercambian por dos roturas simultáneas (Griffiths et al., 2015).

En algunos casos de translocación, un fragmento de cromosoma se rompe y se adhiere a un cromosoma no homólogo. En una translocación recíproca, dos cromosomas no homólogos intercambian segmentos (Solomon et al., 2018).

A veces, las roturas del ADN que preceden a la formación de un reordenamiento ocurren dentro de los genes. Cuando lo hacen, interrumpen la función del gen porque parte del gen se mueve a una nueva ubicación y no se puede realizar una transcripción completa. Además, las secuencias de ADN a ambos lados de los extremos reunidos de un cromosoma reordenado son secuencias que normalmente no se yuxtaponen. A veces, la unión se produce de tal manera que la fusión produce un gen híbrido no funcional compuesto por partes de otros dos genes (Griffiths et al., 2015).

Las consecuencias de las translocaciones varían considerablemente. Incluyen deleciones, en las que faltan algunos genes, y duplicaciones, en las que están presentes copias adicionales de ciertos genes. En aproximadamente el 4% de los individuos con síndrome de Down, solo hay 46 cromosomas presentes, pero uno es anormal. El brazo grande del cromosoma 21 se ha translocado al brazo grande de otro cromosoma, generalmente el cromosoma 14. Las personas con síndrome de Down por translocación tienen un cromosoma 14, un cromosoma 14/21 combinado y dos copias normales del cromosoma 21. Por tanto, todo o parte del material genético del cromosoma 21 está presente por triplicado (Solomon et al., 2018).

El cáncer suele ser causado por una mutación en la secuencia codificadora o reguladora de un gen cuya función normal es regular la división celular. Estos genes se denominan protooncogenes. Sin embargo, los reordenamientos cromosómicos, especialmente las translocaciones, también pueden interferir con la función normal de dichos protooncogenes (Griffiths et al., 2015).

La translocación reubica un protooncogén junto a un nuevo elemento regulador. El linfoma de Burkitt proporciona un buen ejemplo. El protooncogén de este cáncer codifica la proteína myc, un factor de transcripción que activa los genes necesarios para la proliferación celular. Normalmente, el gen myc se transcribe solo cuando una célula necesita experimentar proliferación, pero, en las células cancerosas, el protooncogén myc se reubica junto a la región reguladora de los genes de inmunoglobulina (Ig). Estos genes de inmunoglobulina se transcriben de forma constitutiva; es decir, están encendidos todo el tiempo. En consecuencia, el gen myc se transcribe en todo momento y los genes de proliferación celular se activan continuamente (Griffiths et al., 2015).

Muchos tipos de tumores se caracterizan por la presencia de translocaciones (o fusiones) cromosómicas específicas o de deleciones de regiones cromosómicas concretas. En algunos casos, estas reorganizaciones cromosómicas están tan invariablemente asociadas a un tipo determinado de cáncer que pueden utilizarse

con fines diagnósticos. Por ejemplo, un 95% de los pacientes de leucemia mielogénica crónica (LCM) presentan una translocación característica entre los cromosomas 9 y 22, denominada *cromosoma Filadelfia*. Sin embargo, no todas las mutaciones que inducen tumores son específicas de un tipo de cáncer. Es bastante frecuente que las mismas mutaciones aparezcan asociadas a muchos tipos diferentes de cáncer (Griffiths et al., 2002).

1.4.4 Elementos Transponibles

Los elementos transponibles son fragmentos de ADN que pueden moverse a nuevas posiciones dentro del mismo cromosoma o incluso a un cromosoma diferente. La secuenciación del ADN de los genomas de una variedad de microbios, plantas y animales indica que existen elementos transponibles en prácticamente todos los organismos. Sorprendentemente, son, con mucho, el componente más grande del genoma humano, y representan casi el 50 por ciento de nuestros cromosomas. A pesar de su abundancia, no se conoce con certeza el papel genético normal de estos elementos (Griffiths et al., 2015).

Hay dos tipos de elementos transponibles en los procariontes: 1) Secuencias cortas llamadas elementos IS que pueden moverse a nuevas posiciones, pero no portan genes distintos a los necesarios para su movimiento; 2) Secuencias más largas llamadas transposones que no solo portan los genes que necesitan para su movimiento, sino que también portan otros genes. La transposasa es necesaria para catalizar el movimiento de todo el transposón (Griffiths et al., 2015).

Por otro lado, hay 2 tipos de elementos transponibles (TE) para los eucariotes: 1) Retroposones (TE Clase 1), que codifican para una reversa transcriptasa creando ADN de su ARN transcrito, e integran el ADN a nuevos sitios. 2) ADN transposones (TE Clase 2), codifican para una transposasa y manipulan directamente al ADN. Los retroposones conocidos (Clase 1) incluyen a Alu, Ty y LINE o L1, entre otros (Liao et al., 2003).

Los elementos transponibles en los eucariotas se parecen a una clase bien caracterizada de virus animales llamados retrovirus. Un retrovirus es un virus de ARN monocatenario que emplea un intermedio de ADN bicatenario para la replicación. El ARN es copiado en ADN por la enzima transcriptasa inversa. El ADN de doble hebra se integra en los cromosomas del huésped, a partir de los cuales se transcribe para producir el genoma viral de ARN y proteínas que forman nuevas partículas virales. Algunos retrovirus, como el virus del tumor mamario del ratón (MMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV), son responsables de la inducción de tumores cancerosos. Para MMTV, esto sucede cuando se inserta aleatoriamente en el genoma junto a un gen cuya expresión alterada conduce al cáncer (Griffiths et al., 2015).

Los retrotransposones se desestabilizan en todo el genoma celular y causan proliferación celular, diferenciación e interacción con el microambiente, lo que conduce a la transformación maligna de las células (Vural et al., 2018).

Afortunadamente, el TVTC tiene una característica molecular única basada en un reordenamiento del gen *c-myc* que está ausente en las células somáticas y gametos normales, y otras células tumorales. Este reordenamiento se deriva de la inserción de un elemento nuclear largo intercalado (LINE) o un elemento de ADN repetido largo intercalado, elemento retroposón. Por lo tanto, la presencia de este elemento LINE cerca de *c-myc* (LINE-1/*c-myc*) se ha utilizado como herramienta de diagnóstico para hacer un diagnóstico definitivo de casos de TVTC utilizando la reacción en cadena de la polimerasa in situ (PCR) y la PCR convencional en casos controvertidos (Setthawongsin et al., 2016).

Los elementos nucleares largos intercalados (LINE, por sus siglas en inglés), que son retrotransposones, se localizan en la región 5' del exón del locus *c-myc* de las células TVTC (Vural et al., 2018).

El análisis de varias muestras de TVTC de varias partes del mundo mediante transferencia Southern, reveló que en todos los tumores la inserción del mismo elemento repetitivo LINE se produjo en las proximidades del gen c-myc (Amariglio et al., 1991).

Es tentador especular que esta inserción pudo haber estado causalmente involucrada en el origen del tumor, pero esto aún no se ha probado experimentalmente (Rebbeck et al., 2009).

En el caso de los TVTC, la fusión del retrotransposón LINE-1 con el gen c-myc, provoca un fenotipo dominante de ganancia de función, causando que c-myc esté constantemente sobre expresada, aumentando la proliferación celular descontrolada, y la transformación de células malignas.

El fragmento LINE-1 en TVTC, es un retroposón, el cuál mide 1.6 kb (kilobases) de longitud. Dicho elemento ha sido secuenciado con anterioridad, y contiene un inserto de 1378 pb, rodeado por una secuencia repetitiva de 10 pb del gen c-myc (Liao et al., 2003).

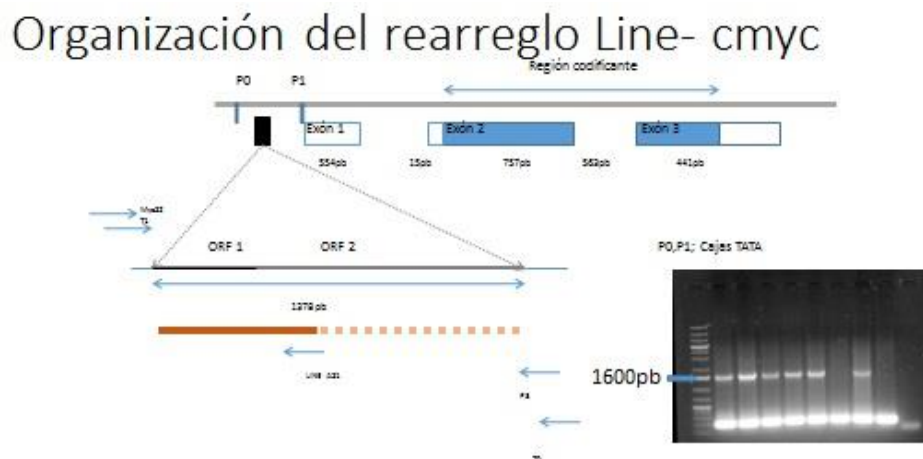


Figura 2. Organización del rearreglo LINE-1/c-myc (Bautista, 2011), y gel con iniciadores T1 y P3 que generan una banda de 1600 pb.

Sin embargo, los productos de PCR de los primers varían en longitud. Pero existe una porción estable de la inserción del gen LINE de 550 pb, la cual produce un resultado constante. Esta porción es excelente para identificar células TVTC por medio de PCR (Liao et al., 2003).

Organización del rearreglo Line- cmyc

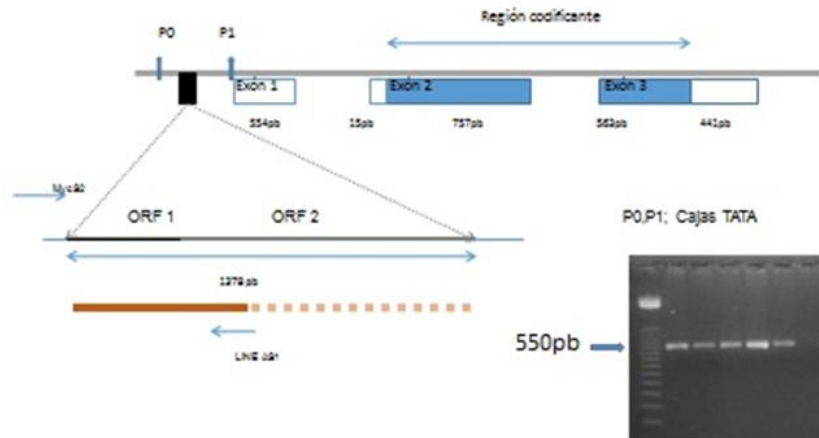


Figura 3. Organización del rearreglo LINE-1/c-myc (Bautista, 2011), y gel con iniciadores mycS-2 y LINE AS-1 que generan una banda de 550 pb.

Cambios en la detección de LINE-1 se observaron en algunos casos de regresión de TVTC. Se deduce que la evaluación del retrotransposón de LINE-1 podría ser útil al evaluar la transmisión tumoral. Recientemente, la presencia de retrotransposones de LINE-1 se utiliza como marcador de diagnóstico para TVTC (Vural et al., 2018).

1.5 TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE CANINO (TVTC)

1.5.1 CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS

Las células TVT tienen una apariencia de forma redonda a ovalada y, a menudo, contienen figuras mitóticas, con agrupación de cromatina y uno o dos nucleolos prominentes. El hallazgo citológico más sorprendente es la presencia de múltiples vacuolas citoplásmicas claras. La vacuolación aumenta durante las primeras etapas de la regresión a medida que las células TVT experimentan degeneración. Durante la degeneración, las cantidades de retículo endoplásmico y ribosomas también aumentan, al igual que la hinchazón y la vacuolación de las mitocondrias. Las células degenerativas a menudo contienen numerosos gránulos y agrupamientos unidos a la membrana (Ganguly et al., 2013).

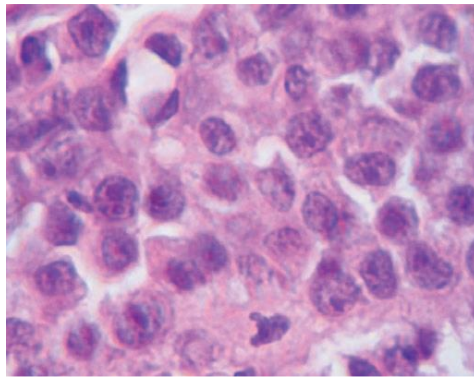


Figura 4. Numerosas células redondas u ovaladas están presentes con citoplasma multivacuolado; muchas células muestran más de un nucléolo; la apariencia granular del carioplasma se debe a la aglomeración de la cromatina y el aumento de la relación núcleo-citoplasma son características citológicas del TVTC (Ganguly et al., 2013).

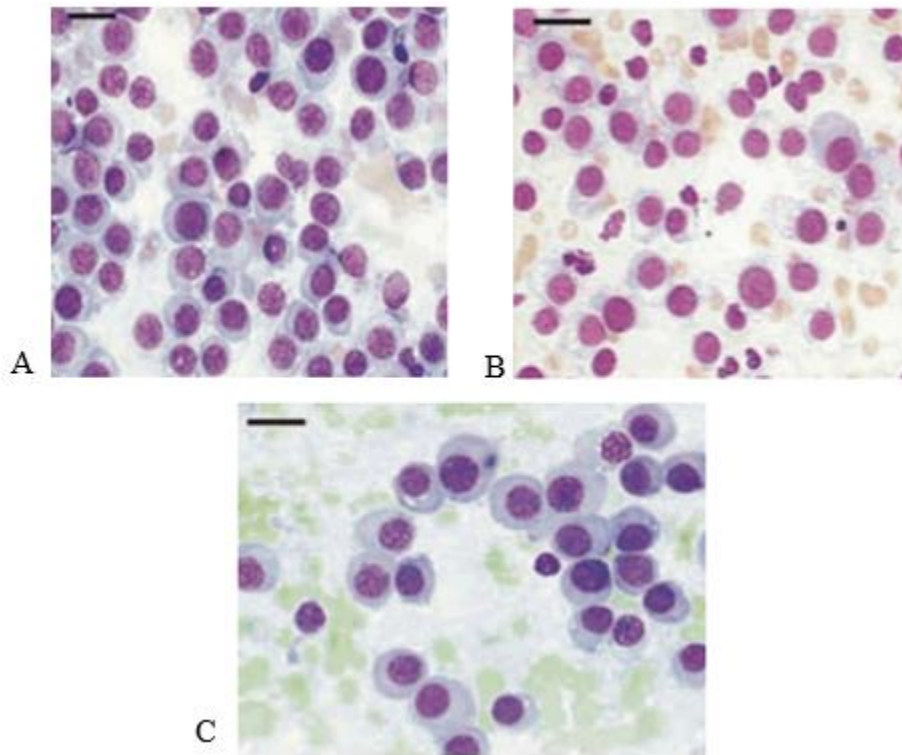


Figura 5. Muestras citológicas de tumores venéreos transmisibles de diferentes tipos citomorfológicos: (A) patrón linfocítico (predominio de células redondas, citoplasma escaso y núcleo grande, con relación al citoplasma); (B) patrón plasmocítico (predominio de células ovoides, citoplasma amplio y núcleo excéntrico); (C) Patrón mixto (Presencia de ambos tipos morfológicos sin predominio de ninguno. Giemsa, barra = 20 μ m (Birhan y Chanie, 2015).

El TVTC se clasifica en dos tipos según su ubicación anatómica: TVT genital (TVT_G) y TVT extragenital (TVT_E). El TVT_G, es fácil de diagnosticar desde su ubicación y su característica de masa de coliflor, pero el diagnóstico de TVT_E es más ambiguo debido a la masa en forma de botón en la piel o la apariencia de las masas nasales y orales (Figura 6). Dado que el TVTC es un tumor de células redondas, necesita un diagnóstico diferencial de otros tumores de células redondas, como el tumor de células cebadas, el tumor histiocítico, el linfoma, el melanoma amelanótico y otros carcinomas pobremente diferenciados (Setthawongsin et al., 2016).

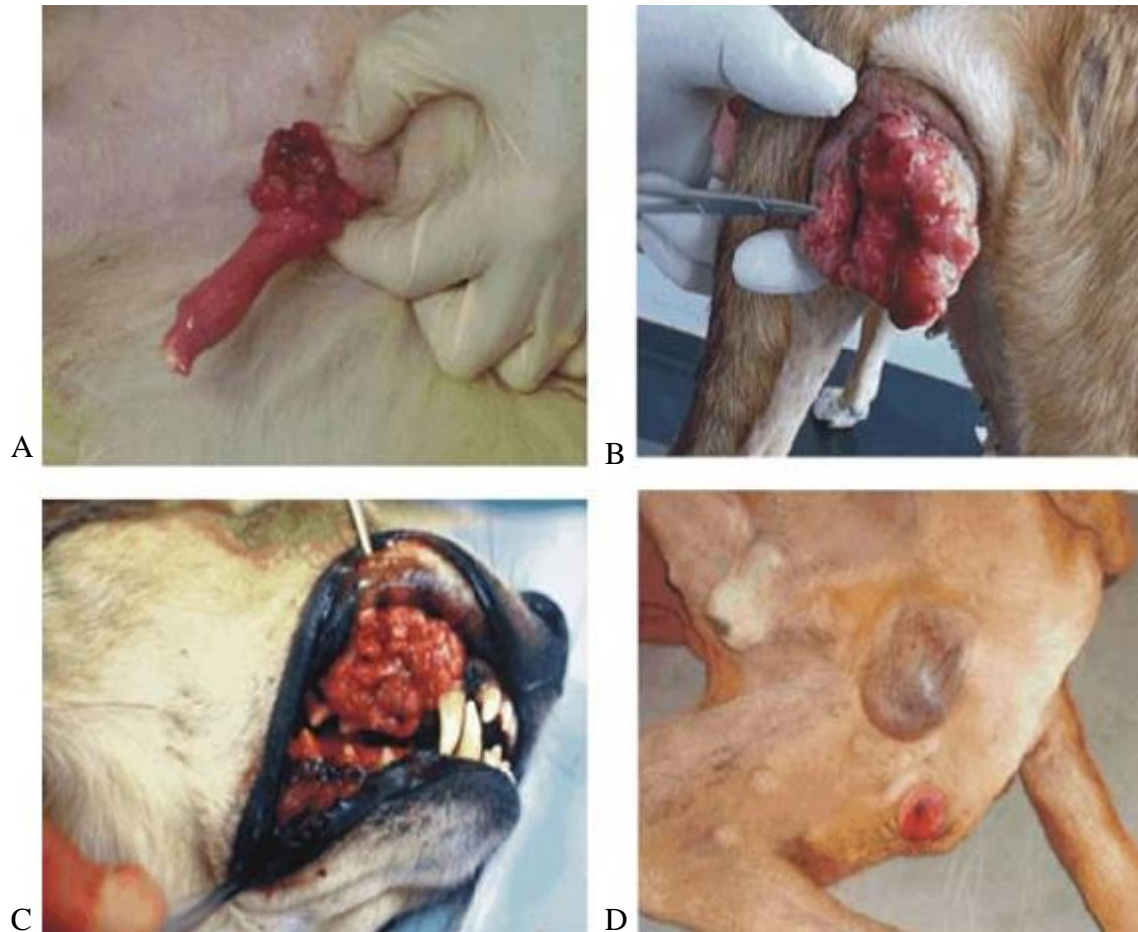


Figura 6. Muestra genital y extragenital de TVTC de diferentes fuentes (A) Tumor venéreo canino transmisible (TVTC). Se presenta una masa multilobulada firme y palpable con focos hemorrágicos. (B) Obsérvese la coliflor irregular, como una masa tumoral rojiza en la vagina. (C) TVTC extragenital. Masa multilobulada, ulcerada. Se asemeja a la coliflor en la cavidad bucal de un perro (Mascarenhas et al., 2014). (D) Perro que muestra crecimientos tumorales en el pene y áreas cercanas (Behera et al., 2012).

El cariotipo normal del perro doméstico (*Canis familiaris*, $2n = 78$) comprende 38 pares de autosomas acrocéntricos más los cromosomas sexuales X y Y submetacéntricos. Por el contrario, las células TVTC presentan de 57 a 59 cromosomas, de los cuales 16-18 se consideran metacéntricos y el resto acrocéntricos, lo que indica un tremendo grado de reorganización estructural. Esta disminución en el número total de cromosomas se ha atribuido ampliamente a la formación de cromosomas derivados bi-armados a través de múltiples eventos de

fusión céntrica entre cromosomas acrocéntricos. Dado que el número total de brazos cromosómicos observados en TVTC es muy comparable al del cariotipo de perro normal, se ha propuesto que los reordenamientos cromosómicos en el tumor no están asociados con ningún cambio significativo en el contenido total de ADN (Thomas et al., 2009).

1.5.2 ORIGEN

Según Murgia et al., (2006), los TVTC extraídos de diferentes animales presentan menos variabilidad genética comparándola con la observada en las razas de perros consanguíneos. Por lo tanto, los tumores no podrían haber surgido de transformaciones cancerosas separadas de células, dentro de animales individuales, sino que parece que han sido transmitidas de un perro a otro, difundidas desde un clon ancestral (Dingli y Nowak, 2006). El reporte de Novinski en 1876, argumentaría que el TVTC tiene al menos 130 años de antigüedad, asumiendo que los tumores que él observó fueron clones de los tumores actuales.

Según resultados de estudios basados en varios marcadores independientes en perros con tumores que viven en los 5 continentes de Murgia et al., (2006), muestran que el TVTC surgió de una célula ancestral común. Tempranamente en su evolución el clon divergió en dos subclados cada uno de los cuales tiene una amplia distribución geográfica. Los microsatélites y los DLA's (del inglés dog leukocyte antigen) estudiados por Murgia et al., (2006), indican que el TVTC primero surgió en un lobo o en un perro relacionado con las razas viejas del este asiático, encontrando relativamente pocas diferencias entre los tumores existentes, lo que nuevamente indica un solo origen, y estimó que el tiempo hasta el ancestro común de dichos tumores es de aproximadamente 250 a 2500 años (Rebbeck et al., 2009).

Sin embargo, Rebbeck et al., (2009), emplearon análisis de microsatélites para concluir que el TVTC tiene más de 6000 años, y utilizando el análisis de secuencia del gen RPPH1 también sugirieron su origen en un perro o lobo durante la primera

domesticación de perros, convirtiéndolo en la línea celular cancerosa continuamente replicada en animales más antigua conocida hasta ahora (Dingli y Nowak, 2006). Analizando la información obtenida de los tumores y de las razas de perros estudiadas, Rebbeck et al., (2009), y Murgia et al., (2006), indican que el TVTC probablemente se originó en los lobos. Sin embargo, hay que tomar con cierta reserva esta afirmación, debido al pequeño tamaño de la muestra de razas estudiadas y el hecho de que los datos de los perros fueron limitados a razas de pedigrís, un origen en perros domésticos no queda excluido.

Aunque el tumor es altamente aneuploide, el cariotipo es remarcablemente constante en tumores de Estados Unidos, Kenia y Japón. Por lo tanto, la diversidad de su genoma a nivel cromosomal se estabilizó temprano en su surgimiento como un parásito transmisible y los estudios revelaron una diversificación moderada de microsatélites y secuencias de ADN. El TVTC tiene una telomerasa activa y podemos asumir que, si la activación de la telomerasa ocurrió después de la generación de aneuploidía, la subsecuente permanencia de las telomerasas puede haber estabilizado el cariotipo anormal (Murgia et al., 2006).

1.5.3 TRANSMISIÓN

El tumor venéreo transmisible canino (TVTC) es un importante tumor contagioso en los países tropicales y subtropicales. Por lo general, se transmite a través de células de cáncer viables de perros con TVTC a huéspedes susceptibles durante el coito u otras conductas sociales. Los tumores se localizan principalmente en el área genital externa de la vulva y el pene, pero también se encuentran en otras partes del cuerpo, como la piel, los ojos, la cavidad nasal y la mucosa oral. El potencial de metástasis es bastante raro, pero puede ocurrir en perros inmunosuprimidos (Setthawongsin et al., 2016).

Tanto naturalmente como experimentalmente, el TVTC trasplantado exhibe un estado inicial de crecimiento rápido y progresivo, el cual está típicamente seguido

por una regresión espontánea tres o nueve meses después, a menos que el perro sea muy viejo, esté en una condición pobre y precaria o esté inmuno-suprimido. Después de la regresión del tumor, el huésped es inmune a la reinfección del TVTC e incluso una transferencia pasiva de suero desde un perro recuperado, también confiere inmunidad. Experimentalmente el TVTC puede ser trasplantado en otras especies caninas, tales como zorros, coyotes y hienas, así como también en ratones inmunodeficientes (Murgia et al., 2006).

Se piensa que el TVTC es transmitido entre perros por implantación de células tumorales del donador al receptor, en donde el tumor crece como un injerto (Dingli y Nowak, 2006). La noción de que el tumor es naturalmente transmisible como un injerto, proviene de varias líneas de observación. Primero, el TVTC puede ser inducido experimentalmente solo trasplantando células tumorales vivientes, y no células muertas o trozos de células. Segundo, el cariotipo del tumor es aneuploide, pero posee cromosomas marcadores característicos en tumores colectados en diferentes regiones geográficas (Murgia et al., 2006).

1.5.4 IMPORTANCIA DEL TVTC COMO MODELO DE ESTUDIO

Así que, ¿puede un cáncer transmitido como infección también ocurrir entre humanos? No hay evidencia (aun) de una transmisión directa de persona a persona de células tumorales durante el contacto social normal. La única ruta fisiológica conocida para transmisión de células tumorales en humanos es durante el embarazo. Se han observado casos de transmisión transplacental de leucemia aguda, linfoma, melanoma y carcinoma de la madre al feto. Células de leucemia aguda también han sido transmitidas entre fetos, en madres con embarazos múltiples, desarrollando la enfermedad en ambos fetos (Dingli y Nowak, 2006).

Los trasplantes de órganos es otra posible ruta de transmisión de células tumorales entre personas. Afortunadamente el desarrollo de tumores derivados de un trasplante es muy raro: solo el 0.04% de los órganos trasplantados desarrollan algún

tipo de cáncer y solo el 0.06% de trasplantes de células hematopoyéticas madre desarrollan algún tipo de cáncer sanguíneo. Hubo un caso reportado donde un cirujano desarrolló un histiocitoma fibroso maligno después de lastimarse accidentalmente la palma de la mano durante una extirpación quirúrgica del tumor de un paciente (Dingli y Nowak, 2006).

En humanos y otros vertebrados, el sistema inmune usa proteínas de superficie celular llamadas antígenos MHC para diferenciar células del propio organismo de células extrañas, debido a que estas proteínas varían entre individuos. El sistema inmune reacciona contra aquellas células que muestran antígenos MHC extraños. Estas reacciones pueden proteger al individuo contra la formación de tumores en forma de injertos celulares, eliminando las células implantadas (Hsiao et al., 2004).

Ayudando esta idea, las células del TVTC evitan la destrucción mediada por el sistema inmune del hospedero disminuyendo la expresión de los antígenos MHC caninos (los DLA's del inglés dog leukocyte antigen). Esta adaptación de las células cancerosas es crucial ya que la completa ausencia de los DLA's permitiría una respuesta inmune en la cual las células conocidas como "natural killer" destruirían el tumor, mientras que la expresión normal de los DLA's activa una reacción inmune diferente que involucra las células T asesinas con consecuencias similares. Esta evidencia también fortalece la esperanza de que el sistema inmune puede inducir la erradicación de los tumores humanos (Hsiao et al., 2004).

Según Hsiao et al., (2004), durante la fase de crecimiento del TVTC, la secreción de TGF- β 1 (*factor de crecimiento b del tumor*) por el mismo, provoca que este actúe como un potente inhibidor local de la respuesta inmune del hospedero, suprimiendo los DLA's clase 1 y 2 (Antígenos de leucocitos caninos). Por lo tanto, la evasión de la respuesta inmune del hospedero ha permitido que el tumor sobreviva y se desarrolle hasta que pueda ser transmitido.

Existen tres tipos de cáncer conocidos de transmisión clonal en la naturaleza: el TVTC, la enfermedad facial del demonio de Tasmania y leucemias de almejas. El TVTC es el único que retrocede, espontáneamente o después de la administración de vincristina, proporcionando un modelo único para la regresión del cáncer en general. Al realizar un análisis sistemático de la regresión de TVTC en todo el genoma, encontramos que el tratamiento con vincristina induce genes inmunes innatos del huésped y diferenciación epitelial, lo que desencadena el rechazo inmunitario del tumor. Los cambios en la expresión génica se correlacionan con la desmetilación de regiones intragénicas específicas (Frampton et al., 2018).

Los perros recuperados son inmunes a la re-inoculación. En TVTC ocurrido de forma natural, también se observa regresión espontánea, aunque con menos frecuencia que en un TVTC trasplantado. Sin embargo, el TVTC natural a menudo es sensible a la radioterapia y la quimioterapia e incluso un solo tratamiento puede inducir una regresión (Frampton et al., 2018).

La transferencia de tumores en ratones solo es posible entre animales que comparten el mismo MHC, o si el receptor está severamente inmunodeprimido. Esto sugiere una interesante especulación, sugerida por Murgia et al., (2006), que la principal razón de la diversidad del MHC en humanos y otros vertebrados es asegurar que el cáncer no sea normalmente una enfermedad infecciosa (Dingli y Nowak, 2006).

Resultados de estudios realizados alrededor del mundo, proporcionan una visión única de los mecanismos moleculares e inmunológicos que impulsan la regresión del cáncer y respaldan los modelos recientemente propuestos por los cuales la inmunidad innata desempeña un papel fundamental en el desencadenamiento del rechazo del cáncer (Frampton et al., 2018).

Aunque la propagación natural de TVTC se limita a los perros, los humanos y los perros comparten muchas formas de cáncer con presentación clínica, patología y

mutaciones genéticas similares, incluidos osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, linfomas no Hodgkin, y melanoma (Schiffman y Breen, 2015). Esto sugiere que comprender la regresión de TVTC podría ser importante para identificar los posibles mecanismos de regresión en los cánceres humanos.

2. HIPÓTESIS

La PCR es una técnica específica y sensible que permite diagnosticar muestras de TVTC.

3. OBJETIVOS

General.

- Elaborar un protocolo que permita realizar el diagnóstico por PCR de muestras de TVTC.

Específicos.

- Identificar el rearreglo LINE-1/c-myc en muestras de TVTC colectadas de la zona conurbana de Toluca.
- Realizar PCR de las 200 muestras de TVTC y determinar su especificidad y su sensibilidad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de Muestras

Para este trabajo se implementó un muestreo no probabilístico por cuota. Se reunieron 200 masas neoplásicas, con diagnóstico clínico e histopatológico, para verificar que se trataba de TVTC's.

Recolección de la muestra

De cada masa tumoral se diseccionó la parte central (para evitar contaminantes), tomando 30 mg de tejido, los cuales fueron congelados (-20°C), hasta su posterior uso.

Extracción de ADN con Kit Genomic ADN Purification Fermentas

En un vial se colocaron 20 a 30 mg de tejido macerado y se resuspendieron en 200 µl de buffer TE. Se agregó 150 µl de solución de lisis y se incubó a 65°C por 45 minutos. Después se le adicionaron 225 µl de cloroformo y se mezclaron en vortex. Se centrifugaron a 10 mil revoluciones por minuto por 2 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se preparó solución de precipitación colocando 270 µl de agua y 30 µl de solución de precipitación. Se tomó el sobrenadante y se mezcló con solución de precipitación, mezclando por inversión en repetidas ocasiones. Se centrifugó a 10 mil revoluciones por minuto por 2 minutos. Se decantó la solución de precipitación y se agregó 100 µl de solución salina, agitando en vortex hasta disolver el pellet. Se agregaron 4 µl de ARNasa y se incubó 15 minutos a 37°C.

Después se colocó 300 μ l de etanol al 100% frío y se mezcló por inversión. Se centrifugaron los tubos a 10 mil revoluciones por minuto por 3 minutos. Se decantó el etanol y se agregaron nuevamente 300 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó a 10 mil revoluciones por minuto, durante 3 minutos. Se decantó el etanol y se retiró el sobrenadante con micropipeta.

Posteriormente se secó a 40°C por 15 minutos. Se resuspendió el pellet de ADN en 100 μ l de agua libre de nucleasas y se verificó la integridad del ADN por electroforesis.

Electroforesis Horizontal

Se preparó un gel de agarosa al 1%, colocando en un frasco refractario graduado, 100ml de Buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), en el que se depositó 1g de agarosa y 2.5 μ l 5mg/ μ l de Bromuro de Etidio. Se fundió la mezcla en un horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió totalmente. Se vertió el gel líquido directamente sobre la caja de la cámara de electroforesis y se colocó el peine

Se dejó la cámara sin movimiento en tanto el gel solidificó. Una vez que el gel alcanzó la consistencia adecuada, se cubrió con Buffer TAE 1X y se retiró el peine. En los pozos formados, se colocaron las muestras en una cantidad de 10 μ l en promedio, más 4 μ l de Buffer de Carga. Como referencia para estimar la longitud de las secuencias de ADN genómico se usaron 3 μ l de marcador de alto peso molecular, colocados en el primer pozo del lado izquierdo.

Se conectó a una fuente de poder, aplicando un voltaje de 80-100 V durante 50min. Transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador de luz UV para valorar la integridad del ADN obtenido y se tomó una fotografía con la cámara digital Kodak y PC con software (Kodak DS Digital Science).

Cuantificación del ADN genómico obtenido

Se estimó la cantidad ADN obtenido de cada muestra, partiendo de la base de que la intensidad de la fluorescencia inducida por sustancias intercalantes como las moléculas de Bromuro de Etidio, es proporcional a la masa total de ADN presente en la muestra.

Buscando conocer la cantidad de ADN extraído de cada muestra tumoral, se utilizó la técnica de electroforesis en agar, colocando 1 μ l de ADN de 6 casos diferentes tomados al azar.

Las muestras se colocaron junto con una serie de ADN's de referencia, con concentraciones conocidas del Marcador de Peso molecular "Gene Ruler™" Ladder, Plus (10 μ g/ μ l), [Fermentas No. de Cat. #SM0323] y se corrieron a 80v por 60min. Las bandas obtenidas fueron interpretadas mediante el Software Kodak Digital Science ID, obteniendo los siguientes valores: 1 =33.78ng; 2 =84.73ng; 3=11.74ng; 4 =74.26ng; 5=13.45ng; 6=112.33ng.

Identificación del rearreglo LINE-1/c-myc por PCR

Para la identificación del rearreglo LINE-1/c-myc, las reacciones de PCR se realizaron utilizando los iniciadores mycS-2 y LINE As-1 (Tabla 1), que amplifican un segmento de 0.55 kb como lo describe Liao et al. 2003. La amplificación incluye parte del extremo 3' del segmento LINE hasta el exón 5' del gen c-myc (Figura 2 y 3). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 50 μ l, mezclando los siguientes reactivos: 5.0 μ l de buffer de amonio 10X, 1 μ l de MgCl₂ 2 mM, 1 μ l de dNTP's 2 mM (10x), 1 μ l de cada primer a una concentración final de 100 ng/ μ l, 0.5 μ l de taq polimerasa (ADN Polymerase dry™ Taq. Mercury, 5U/ μ l), 1 μ l de ADN genómico a una concentración de 100 ng/ μ l y 39.5 μ l de ADNasa libre de H₂O. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C, con un ciclo

final de 72°C por 5 minutos. Después, los segmentos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa para electroforesis al 2%, y visualizados en un transiluminador de UV.

INICIADORES	SECUENCIA
T1	ATGCACCAAGATTTTCTTCACTGC
P3	GCCATGAGATTCAAACCAAGGCGG
MycS-2	ATTCCTACGAATGAATGATTGGCCAGA
LINE AS-1	CAGACACATAGATCAGTGGAACAGAAT

Tabla 1. Secuencia de iniciadores utilizados en este trabajo, para la identificación del rearreglo LINE-1/c-myc.

Secuenciación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados y que fueron visualizados en geles de agarosa, fueron purificados a partir de gel utilizando el Quick Gel Extraction Kit según instrucciones del fabricante. Posteriormente, los fragmentos purificados fueron secuenciados con el método de terminación de cadena, para lo cual se usó el kit de secuencia Big Dye Terminator Cycle Sequencing de PE Applied Biosystem. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se editaron para su análisis y fueron alineadas utilizando el software Clustal W. Para comparar las secuencias obtenidas de nuestros tumores con las de otros TVTC reportadas en otros países se acceso al GenBank y se descargaron las secuencias correspondientes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Preparación de medio SOC

En un matraz Erlenmeyer, se colocaron 2.0 g de Triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 1 ml de 1M NaCl y 0.25 ml de 1M KCl. Se le adicionó 97 ml de agua destilada, y se mezcló hasta disolver. Posteriormente se metió a esterilizar por autoclave, y al terminar, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Después se adicionó 1 ml 2M Mg²⁺ stock, estéril por filtración y 1ml 2M glucosa, estéril por filtración, cada uno a una concentración final de 20 mM. Se aforó a 100 ml con agua destilada estéril, a un pH final de 7.0.

Cálculo de la sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de las PCR fue determinada utilizando las 200 muestras positivas de los tumores y las 200 muestras de sangre (control negativo TVTC) de cada paciente (Tabla 2). Nos basamos en el método de análisis utilizado por Vizcaíno-Salazar, (2017), y por Faz et al., (2017). Se calculó utilizando el siguiente procedimiento:

$$\text{Sensibilidad (Se)} = \frac{\text{Muestras TVTC verdaderos positivos} \times 100}{\text{Muestras de TVTC verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad (Esp)} = \frac{\text{Verdaderos negativos a TVTC} \times 100}{\text{Verdaderos negativos a TVTC} + \text{Falsos positivos}}$$

5. RESULTADOS

La cuantificación del ADN obtenido de las muestras de tumores y de la sangre, se expresó en un rango de 11 a 112ng/ μ l y se estimó un promedio de 60.67ng/ μ l, para cada muestra. El ADN obtenido de las muestras fue visualizado en geles de agarosa al 1%. En las muestras presentes en el gel se observó un patrón de integridad con ADN de alto peso molecular que no logró migrar más allá de nuestro marcador de 3,000 pb; aunque también se observa el patrón del ADN que migra a través de todo el carril; y este corresponde a la fracción de ADN fragmentado. No obstante, las muestras se consideraron con una cantidad apropiada de ADN íntegro (Figura 7).

A partir de este punto, utilizamos únicamente el número de muestra, para referir algún caso de TVTC. Para ver las características de cada una de las muestras, favor de referirse al Anexo 1 de la pág. 55.

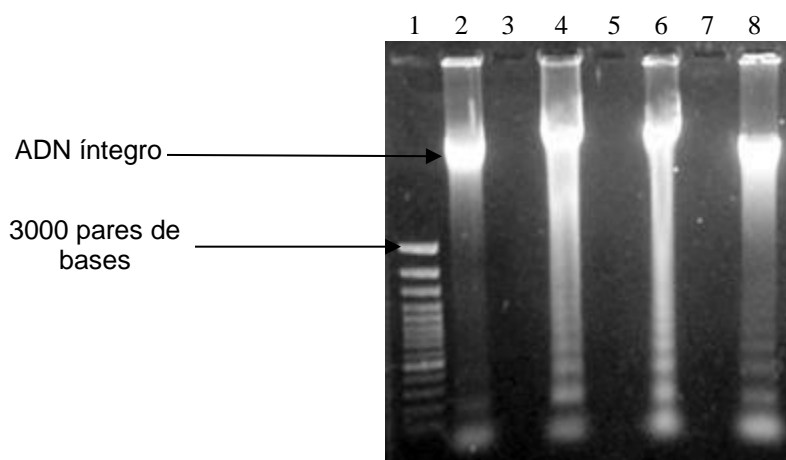


Figura 7. Integridad del ADN de las muestras (Gel de agarosa al 1%). En el Carril 1 se observa el marcador de peso molecular. Carriles 2, 4, 6 y 8, con muestras de TVTC 2158, 2156, 2567, 2648, respectivamente. Carril 3, 5 y 7 vacíos.

Para determinar si el inserto LINE-1/c-myc completo amplifica eficientemente, muestras del ADN extraído fueron amplificadas con los iniciadores T1 y P3 que generan un producto de 1600 pb, como lo describe Choi et al., (1999). En nuestro ensayo, las muestras 3276 y 3502 no amplificaron (Figura 8, carril 7 y 9 respectivamente).

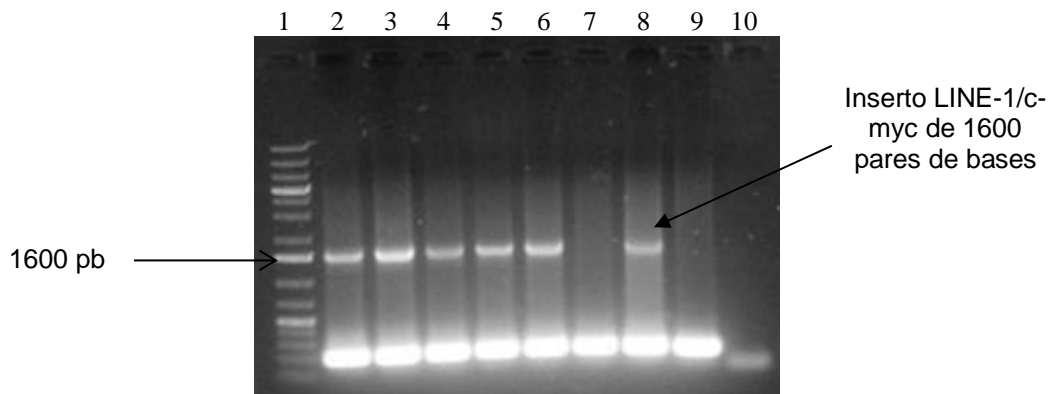


Figura 8. Iniciadores T1 y P3 en TVTC (Gel de agarosa al 1%). Carril 1 con marcador de peso molecular. Carriles 2 al 9, muestras de TVTC 2158, 2156, 2567, 2648, 2707, 2708, 3276, 3214 y 3502, respectivamente. Carril 10 con agua como control negativo.

Posteriormente se utilizaron los iniciadores mycS-2 y LINE AS-1 que producen un fragmento de 550 pb (Figura 9 y 10). Todas las muestras de células de TVTC que fueron amplificadas con dichos iniciadores fueron positivas (Figura 10). En las muestras con células sanguíneas de los mismos perros con TVTC no se obtuvo amplificación de este fragmento (Figura 9). También otros tumores que clínicamente se confunden con TVTC por su ubicación anatómica en el organismo afectado, fueron negativos a la amplificación (Figura 11).

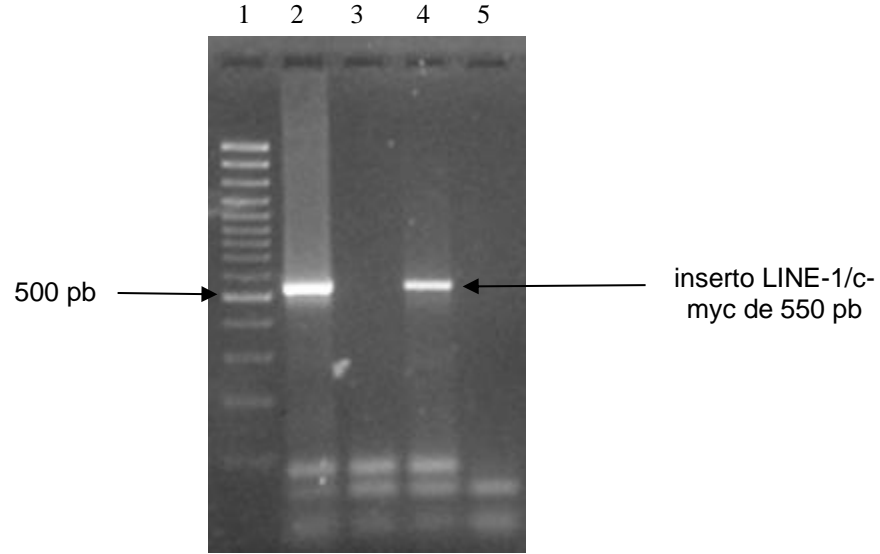


Figura 9. Iniciadores mycS-2 y LINE AS-1 en TVTC y muestras sanguíneas (Gel de agarosa al 2%). Carril 1 con marcador de peso molecular. Carril 2 con muestra de TVTC 2156, la cual muestra el inserto LINE-1/c-myc. Carril 3 con ADN de muestra sanguínea del mismo perro 2156 en el cual no se presenta el inserto. Carril 4 con muestra de TVTC 2567 presentando el inserto. Carril 5 con agua como control negativo.

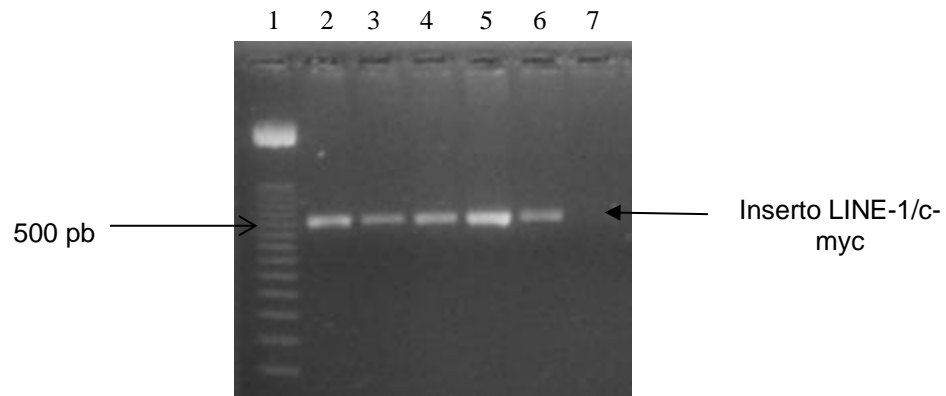


Figura 10. Iniciadores mycS-2 y LINE AS-1 en TVTC (Gel de agarosa al 2%). Carril 1 con marcador de peso molecular. Carril 2, 3 y 4 con muestras de TVTC 2158, 2567 y 2648 respectivamente. Carril 5 con TVTC 3276 y carril 6 con TVTC 3502, que no habían amplificado con los iniciadores T1 y P3, son positivos para el inserto con los iniciadores mycS-2 y LINE AS-1. Carril 7 con agua como control negativo.

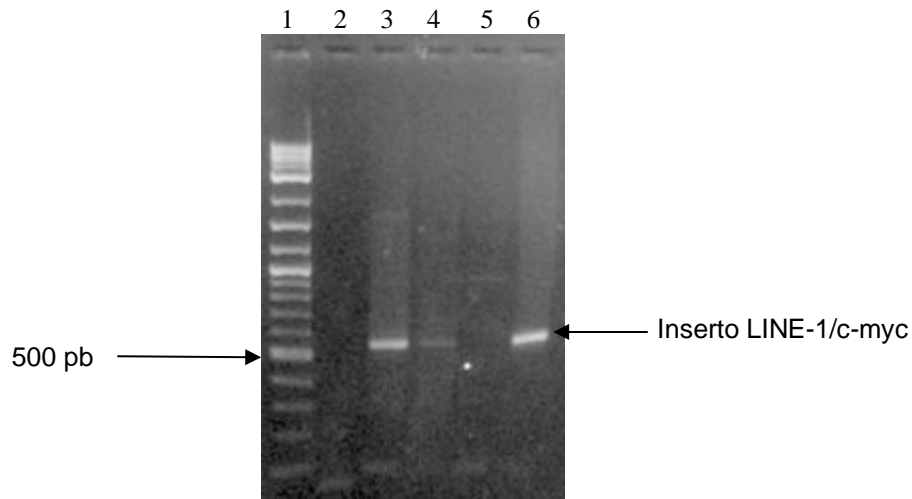


Figura 11. Iniciadores mycS-2 y LINE AS-1 en TVTC y tumor mamario (Gel de agarosa al 2%). En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, el carril 2 con muestra del caso 3213, y carril 5 con muestra del caso 3420, son muestras de tumor mamario negativas al inserto LINE-1/c-myc. Carriles 3, 4 y 6 con muestras TVTC 3276, 3420 y 2156 respectivamente, son positivas al inserto LINE-1/c-myc. El carril 4 (muestra de TVTC 3420) y el 5 (muestra de tumor en glándula mamaria del caso 3420) fueron obtenidas del mismo perro.

La inserción específica de tumores LINE-1/c-myc estuvo presente en todas las 200 muestras de TVTC (Figura 8, 9, 10 y 11).

El 10% de las muestras de TVTC diagnosticadas por PCR fueron seleccionadas al azar para su secuenciación. 550 pares de bases fueron obtenidas bajo este procedimiento. Todas las secuencias obtenidas fueron comparadas entre sí y se obtuvo una identidad del 100% por lo que se determinó una sola secuencia consenso, esta única secuencia fue comparada con otras secuencias previamente publicadas en el banco de genes de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 12).

```

Katzir  TTCGTCCTGCTCGTCTGCTGAAGAGCTTCCCAGTGTTCCTCTCACTGGGACACATGGTTAGCACAGGAAATACTGGTGAGGCTT
Consenso.....
Katzir  TCCCATCCTTTAACATTCTCTGGCTGTCTTTGAGTTTGTGACTGTATCCTTTGCTGTGCAAAAGCTTCTTATCTTGATGAAG
Consenso.....
Katzir  TCCCAATAGTTCATTTTGTCTTTTGTCTTTTGCCTTCGTGGATGTATCTTGCAAGAAGTTACTATGGCCGAGTCAAAAAGG
Consenso.....
Katzir  GTGTTGCCTGTGTTCTTCTCTAGGATTTTGATGGAATCTTGTCTCACATTTAGATCTTTCATCCATTTTGAGTTTATCTTTGTG
Consenso.....
Katzir  TATGGTGAAAGAGAGTGGTCTAGTTTCATTCTTCTGCATGTGGATGTCCAATTTTCCAGCACCATTTATTGAAGAGACTGTCT
Consenso.....
Katzir  TTCTTCCAATGGATAGTCTTTCCTCCTTTATCGAATATTAGTTGCCCATAAAGTTCAGGGTCCACTTCTGGATTCTCT
Consenso.....

```

Figura 12. Alineación de las secuencias consenso, obtenidas de las 10 secuencias de este trabajo, con la secuencia de referencia obtenida del banco de genes. Se observa 100% de similitud. Los puntos representan identidad de nucleótidos con relación a la secuencia de arriba.

El análisis de resultados de la sensibilidad y especificidad se realizó mediante el uso de tablas de contingencia para determinar las propiedades de la prueba de diagnóstico (Tabla 2), aplicando las fórmulas correspondientes.

	TVTC POSITIVO	TVTC NEGATIVO	
PCR POSITIVO	200	0	200
PCR NEGATIVO	0	200	200
	200	200	400

Sensibilidad= 100%

Especificidad= 100%

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR. Los números indican las muestras positivas (+) o negativas (-) para el TVTC.

Usando la técnica de PCR, 200/200 muestras fueron positivas a TVTC, y las 200 muestras de control fueron confirmadas negativas. Por lo tanto, la prueba diagnóstica de PCR con los iniciadores mycS-2 y LINE AS-1, demostró una sensibilidad del 100% y una especificidad también del 100% para este estudio.

6. DISCUSIÓN

La mayoría de los perros con TVTC en este estudio tenían entre 2 y 8 años de edad, y tenían genitales intactos (no esterilizados). Los perros intactos forman el grupo de alto riesgo durante los períodos de máxima actividad sexual, cuando las hembras exhiben los signos del estro. La enfermedad generalmente ocurre en animales en edad reproductiva y con menos frecuencia en los de mayor edad. La edad está relacionada con la vía de transmisión a través del coito u otro comportamiento social, en el sentido de que los perros intactos y maduros pueden tener una actividad sexual relativamente alta y, por tanto, un riesgo de transmisión del TVTC.

Las hembras se infectan con más frecuencia que los machos porque un macho infectado a menudo se aparea con numerosas hembras, en libertad o en un grupo callejero y también en perreras. Sobre la base del comportamiento social, los grupos de alto riesgo incluyen los perros que habitualmente se escapan del patio (75,5%), perros de guardia (41,3%) y perros de caza (41,5%). El TVTC es raro en animales de compañía domésticos bien supervisados (4%), y ocurre solo después de un escape que da lugar a un evento de cópula no deseada (Ganguly et al., 2013). La incidencia de tumores extragenitales puede ser mayor en los machos debido al comportamiento reproductivo del macho. En Toluca, el TVTC es un tumor frecuente, sobre todo en perros callejeros, por lo tanto, se necesita una herramienta de diagnóstico precisa, rápida y confiable para la planificación terapéutica.

En la actualidad la PCR es una técnica globalmente utilizada, lo que ha permitido la reducción de sus costos y la facilidad del procedimiento, es considerada una técnica sensible, específica, rápida y barata para muchos tipos de diagnóstico, tanto de agentes infecciosos como de genética molecular. Su utilización en el caso del TVTC podría ser muy importante para realizar un diagnóstico apropiado de este tumor, y

coadyuvar con esto a un mejor control de la enfermedad, debido a que este tumor tiene una forma *su generis* de transmisión (comportándose como un agente infeccioso). Además, dado que el TVTC es un tumor de células redondas, necesita un diagnóstico diferencial con otros tumores de células redondas, como el tumor de mastocitos, el tumor histiocítico, el linfoma, el melanoma amelanótico y otros carcinomas poco diferenciados (Mascarenhas et al., 2014).

Normalmente, la morfología de las células TVTC es uniformemente redonda a células de forma poliédrica con un núcleo central o excéntrico, nucléolos prominentes, un citoplasma vacuolado y figuras mitóticas moderadas. Además, los TVTC también comparten el mismo origen que los tumores histiocíticos (Setthawongsin et al., 2016), por lo que la inmunohistoquímica (IHC) no puede hacer un diagnóstico definitivo. El histiocitoma canino es también un tumor de células redondas que contiene un citoplasma vacuolado, por lo que tiene estas características similares. Es posible que el TVTC se diagnostique erróneamente como histiocitoma mediante análisis citológicos e histológicos. El uso de análisis convencionales, citológicos e histopatológicos, solo puede confirmar un diagnóstico de TVTC, si su característica es diferente de su apariencia normal.

Afortunadamente, el TVTC tiene una característica molecular única basada en un reordenamiento del gen *c-myc* que está ausente en las células somáticas y los gametos normales y en otras células tumorales. Este reordenamiento se deriva de la inserción de un elemento nuclear intercalado largo (LINE) o un elemento de ADN repetido intercalado largo, elemento retroposón (Setthawongsin et al., 2016).

La inserción del elemento LINE se ha encontrado en células TVTC recolectadas en muchos países del mundo. La inserción siempre comienza en el extremo 5', fuera del primer exón del gen *c-myc*. Debido a que la inserción es específica, se desarrolló

un método de PCR para diagnosticar este tumor. Sin embargo, la viabilidad de la técnica de PCR depende mucho de los iniciadores elegidos.

En el caso del TVTC, diferentes iniciadores han sido registrados para la amplificación del rearreglo LINE-1/c-myc (Choi et al., 1999; Liao et al., 2003); esta inserción mide aproximadamente 1600 pb y en su secuencia posee regiones estables y regiones variables.

En nuestro estudio, utilizando los cebadores T1 y P3 (Liao et al., 2003), una banda inespecífica de 0,2 kb estaba presente en todos los tejidos analizados. Además, no siempre detectó el segmento de 1,6 kb, como nos sucedió con las muestras 3276 y 3502. Según Liao et al., (2003), después de realizar repetidas PCR y secuenciaciones, observó que esto se debía a que parte de la inserción del elemento LINE cerca del extremo 3' del segmento de 1,6 kb faltaba con frecuencia, y la secuencia que faltaba normalmente era menor de 0,88 kb. Las secuencias faltantes se produjeron en el segmento de 0,88 kb de dirección continua del extremo 3' de la inserción del elemento LINE y no en el segmento restante de 0,55 kb.

Por tanto, el segmento de 0,55 kb es una región estable y el de 0,86 kb es una región inestable. Se encontraron resultados similares al comparar las secuencias de ADN de las inserciones del gen LINE en células TVTC descritas en otros estudios publicados. Por lo tanto, se usaron los cebadores mycS-2 y LineAS-1 (Liao et al., 2003), para el segmento de 0,55 kb. Los nuevos cebadores fueron superiores a los antiguos en que los resultados de la PCR eran constantes y la banda inespecífica de 0,2 kb ya no estaba presente en ninguna de las muestras. Se ha registrado que estos iniciadores son eficientes para amplificar muestras de TVTC en todo el mundo, actualmente no existen datos que verifiquen si la secuencia de 550 pb que se

obtiene es 100% conservada en muestras de tumores que circulan en los diferentes países que poseen la enfermedad.

En este trabajo amplificamos esta región de 550 pb en muestras de tumores de México y obtuvimos la secuencia de los amplicones. Todas las secuencias fueron 100% similares. La secuencia consenso fue comparada con secuencias registradas en el Gen Bank pertenecientes a tumores que circulan en otros países, y también se observó un 100% de similitud; lo cual puede sugerir que esta región genómica del TVTC es altamente conservada en muestras de diferentes países. Una posible explicación es que la característica molecular de TVTC en Toluca tiene el mismo origen clonal que los casos de TVTC en todo el mundo. Lo anterior aporta un pequeño grano de arena a los trabajos realizados acerca del origen clonal del TVTC, que a su vez colabora con los estudios de evolución del cáncer y estudios de poblaciones de perros.

El papel de las deleciones de LINE en las células TVTC no es conocido (Liao et al., 2003). Sin embargo, los retroposones pueden afectar la función del genoma del hospedador de diversas formas. En los seres humanos, se producen 14 eventos de retrotransposición diferentes que producen enfermedades, como la hemofilia A y B, y la distrofia muscular (Liao et al., 2003).

Solo unos pocos estudios han demostrado una asociación entre retroposones y carcinogénesis. La inserción de transposones puede alterar la regulación y expresión de genes flanqueantes. Además, el ARNm c-myc de células TVTC es más abundante que el de las células normales, lo cual sugiere que la secuencia LINE insertada afecta el nivel de transcripción de c-myc. No se conoce el efecto de la inserción del gen LINE en la transformación de células TVTC, pero c-myc está involucrado en la transformación tumorigénica de algunas células fibroblásticas

(Liao et al., 2003). Se necesita una investigación detallada sobre genética molecular canina para obtener una comprensión más completa de los mecanismos.

En cuanto a nuestro estudio, solo los casos de TVTC se amplificaron con éxito con los cebadores específicos LINE AS-1 y mycS-2, produciendo los amplicones de 550 pb esperados, mientras que los otros tipos de tumores analizados y las muestras de sangre, fueron negativos. La posibilidad de que el rearreglo LINE-1/c-myc sea un alelo polimórfico en los animales examinados hasta ahora se descartó por la ausencia de este reordenamiento en las células de sangre periférica de los sujetos afectados.

Así mismo cuando las biopsias contienen bajo número de células, estas pueden ser diagnosticadas como falsas negativas por histología. Uno de los principales problemas en estos procedimientos puede estar en el momento de la toma de la muestra, ya sea en biopsia o en aspirados, debido a que, en muchas ocasiones, los clínicos no realizan un procedimiento apropiado y ellos recuperan muestras que no contiene un número suficiente de células tumorales, entonces en estos casos, la sensibilidad del diagnóstico disminuye.

La ventaja del ensayo de PCR fue su sensibilidad, que es importante para la detección en la masa de la cavidad nasal o en otros sitios donde una biopsia es difícil de realizar, ya que el aspirado fino con aguja produce suficientes células para la prueba de PCR. En este estudio, la técnica de PCR con los iniciadores LINE AS-1 y mycS-2 presentó una sensibilidad y especificidad del 100% en las 200 muestras de TVTC y en las 200 muestras control, lo que demuestra que el diagnóstico por PCR es eficaz, por lo tanto puede ser una técnica de elección para el diagnóstico, debido a que es más específica que la histología y la citología, porque en el caso de otros tumores de células redondas (como histiocitoma) la citología e histopatología

llega a ser confusa y el diagnóstico requiere de mucho entrenamiento para diferenciar entre los tumores.

Las ventajas de este ensayo de PCR de diagnóstico al requerir una cantidad baja de ADN y, por lo tanto, un número relativamente bajo de células, podrían aplicarse para diagnosticar casos en los que solo se podría recolectar una pequeña cantidad de muestra o cualquier otra razón que impida el análisis histopatológico y análisis citológicos.

Además, se puede utilizar como protocolo de vigilancia durante (y después) del tratamiento quimioterapéutico para determinar el momento adecuado para detener (o reiniciar) la quimioterapia cuando el cáncer ha retrocedido, pero ha dejado una gran cantidad de tejido fibroso.

El uso de la PCR como prueba de diagnóstico aún no está muy extendido en los hospitales veterinarios, aunque sigue siendo ampliamente utilizado para fines de investigación. En este trabajo se utilizaron casos clínicos de TVTC para diagnóstico por PCR, demostrando que esta es una técnica de elección que puede ser implementada en laboratorios clínicos veterinarios a costos bajos con resultados confiables.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el 100% de las muestras analizadas de TVTC poseen el inserto LINE-1/c-myc.
- La técnica de PCR es una herramienta eficaz para realizar el diagnóstico del TVTC.
- El TVTC es el único tumor en perros que puede ser diagnosticado mediante PCR con un valor alto de especificidad y sensibilidad.

8. ANEXOS

Anexo 1

Datos de algunos de los perros utilizados

ND: No disponible, ya que no se registró ese dato en la hoja de ingreso por parte del personal de servicio social.

No. de Muestra	Fecha	Edad	Sexo	Raza	Localización del tumor
A1298	05/04/05	2 años	Hembra	Bullterrier	Vagina
A1299	05/04/05	4 años	Macho	Criollo	Pene
A1300	05/04/05	2.5 años	Hembra	Criollo	Vagina
A1301	05/04/05	ND	Hembra	ND	Vagina
A1504	20/04/05	4 años	Macho	Pit Bull	Pene
A1536	21/04/05	12 años	Hembra	Criollo	Vagina y vulva
A1537	21/04/05	8 años	Hembra	Criollo	Vulva
A1870	21/04/05	3 años	Macho	Bóxer	TVT Negativo, Piel de pene
A1943	01/06/05	2.5 años	Macho	Chowchow	Pene
A2155	20/06/05	3 años	Hembra	Criollo	Vagina
A2156 (Figura 7, 8, 9, 11)	20/06/05	8 años	Macho	Samoyedo	Base del pene
A2157	20/06/05	3 años	Hembra	Criollo	Vagina
A2158 (Figura 7, 8, 10)	20/06/05	6 años	Macho	Pastor Alemán	Pene
A2566	12/08/05	3 años	Macho	ND	TVT Negativo Glándula mamaria

A2567 (Figura 7, 8, 9, 10)	12/08/05	4 años	Hembra	ND	ND
A2648 (Figura 7, 8, 10)	19/08/05	3 años	Hembra	ND	ND
A2649	19/08/05	4 años	Macho	ND	TVT Negativo
A2707 (Figura 8)	26/08/05	2 años	Hembra	ND	ND
A2708 (Figura 8)	26/08/05	2.5 años	Macho	ND	ND
A2709	26/08/05	3.5 años	Hembra	ND	ND
A2763	02/09/05	3.5 años	Hembra	ND	ND
A2764	02/09/05	7 años	Macho	ND	ND
A2824	13/09/05	3 años	Hembra	ND	ND
A2825	13/09/05	8 años	Macho	ND	ND
A2826	13/09/05	5 años	Hembra	ND	ND
A2996	05/10/05	4 años	Macho	ND	ND
A3045	07/10/05	3.5 años	Hembra	ND	ND
A3213 (Figura 11)	21/10/05	3 años	Macho	ND	TVT Negativo Glándula mamaria
A3214 (Figura 8)	21/10/05	1.5 años	Hembra	ND	ND
A3276 (Figura 8, 10, 11)	28/10/05	7.5 años	Macho	ND	ND
A3420 (Figura 11)	10/11/05	2.5 años	Hembra	ND	Vaginal

A3420 (Figura 11)	10/11/05	2.5 años	Hembra	ND	TVT Negativo Pezón
A3502 (Figura 8, 10)	18/11/05	3 años	Macho	ND	ND
A3503	18/11/05	1.5 años	Hembra	ND	ND
A3610	25/11/05	10 años	Hembra	ND	TVT Negativo Fibroma en piel de glándula mamaria
A3611	25/11/05	5 años	Hembra	ND	TVT Negativo Glándula mamaria
A3612	25/11/05	1.5 años	Macho	ND	ND

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Amariglio, E., I. Hakim, F. Brok-Simoni, Z. Grossman, N. Katzir, A. Harmelin, B. Ramot y G. Rechavi. 1991. **Identity of rearranged LINE/c-myc junction sequences specific for the canine transmissible venereal tumor**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88(18), pp. 8136-8139.
2. Bautista, L. 2011. **Análisis de marcadores moleculares en el tumor venéreo transmisible canino para determinar su diversidad genética**. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma del Estado de México. pp. 112.
3. Behera, S. K., N. P. Kurade, S. W. Monsang, D. P. Das, K. K. Mishra y R. K. Mohanta. 2012. **Clinic-pathological findings in a case of canine cutaneous metastatic transmissible venereal tumor**. Vet. Arhiv. Vol. 82, pp. 401-410.
4. Birhan, G. y M. Chanie. 2015. **A Review on Canine Transmissible Venereal Tumor: from Morphologic to Biochemical and Molecular Diagnosis**. Academic Journal of Animal Diseases. Vol. 4(3), pp. 185-195.
5. Chen, H., H. Liu y G. Qing. 2018. **Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment**. Signal Transduction and Targeted Therapy. Vol. 3(5), pp. 1-7.
6. Choi, Y., N. Ishiguro, M. Shinagawa, C. Kim, Y. Okamoto, S. Minami y K. Ogiwara. 1999. **Molecular structure of canine LINE-1 elements in canine transmissible venereal tumor**. Animal Genetics. Vol. 30(1), pp. 51-53.
7. De León, J. y A. Pareja. 2019. **Inmunología del cáncer II: bases moleculares y celulares de la carcinogénesis**. Horizonte Medico. Vol. 19(2), pp. 84-92.

8. Dejure, F. y M. Eilers. 2017. **MYC and tumor metabolism: chicken and egg.** The EMBO Journal. Vol 36(23), pp. 3409-3420.
9. Dingli, D. y M. Nowak. 2006. **Infectious tumor cells.** Nature. Vol. 443, pp. 35-36.
10. Frampton, D., H. Schwenzer, G. Marino, R. Weiss, S. Beck y A. Fassati. 2018. **Molecular Signatures of Regression of the Canine Transmissible Venereal Tumor.** Cancer Cell. Vol. 33, pp. 620–633.
11. Faz, M., J. S. Martínez, I. Quijano-Hernández y R. Fajardo. 2017. **Reliability of clinical diagnosis and laboratory testing techniques currently used for identification of canine parvovirus enteritis in clinical settings.** J. Vet. Med. Sci. Vol. 79(1), pp. 213–217.
12. Ganguly, B., U. Das y A. K. Das. 2013. **Canine transmissible venereal tumor: a review.** Veterinary and Comparative Oncology, Vol. 14(1), pp. 1–12.
13. García, C. M., M. Salas y J. M. Gil. 2018. **Algunas consideraciones sobre etiología y fisiopatogenia del carcinoma epidermoide bucal.** Revista de Ciencias Médicas de Cienfuegos. Vol 16(1), pp. 63-75.
14. Griffiths, A., J. Miller, D. Suzuki, R. Lewontin y W. Gelbart. 2002. **Genética.** Séptima edición. España. McGraw-Hill Interamericana. pp. 647-667.
15. Griffiths, A., S. Wessler, S. Carroll y J. Doebley. 2015. **Introduction to Genetic Analysis.** Onceava edición. Estados Unidos. W. H. Freeman and Company. pp. 897.
16. Hartwell, L. y M. Kastan. 1994. **Cell cycle control and cancer.** Science. Vol. 266, pp. 1821-1828.

17. Hsiao, Y., K. Liao, S. Hung y R. Chu. 2004. **Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity.** J. Immunol. Vol. 172, pp. 1508–1514.
18. Kalkat, M., J. De Melo, K. Hickman, C. Lourenco, C. Redel, D. Resetca, A. Tamachi, W. Tu y L. Penn. 2017. **MYC Deregulation in Primary Human Cancers.** Genes. Vol. 8(151), pp. 1-30.
19. Katzir, N., G. Rechavi, J. Cohen, T. Unger, F. Simoni, S. Segal, D. Cohen y D. Givol. 1985. **“Retroposon” insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 82, pp. 1054-1058.
20. León, D. A. 2016. **Modelando las mutaciones en bacterias y tejidos humanos** (Tesis de licenciatura). Universidad de la Habana. pp. 1-47.
21. Liao, K., Z. Lin, H. Pao, S. Kam, F. Wang y R. Chu. 2003. **Identification of canine transmissible venereal tumor cells using in situ polymerase chain reaction and the stable sequence of the long interspersed nuclear element.** J Vet Diagn Invest. Vol. 15, pp. 399–406.
22. Mascarenhas, M. B., P. V. Peixoto, R. R. Ramadinha, E. M. Yamasaki y E. Grays. 2014. **Immunohistochemical study of genital and extragenital forms of canine transmissible venereal tumor in Brazil.** Pesq. Vet. Bras. Vol. 34, pp. 250-254.
23. Murgia, C., J. Pritchard, S. Kim, A. Fassati y R. Weiss. 2006. **Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer.** Cell. Vol. 126, pp. 477-487.
24. Pérez-Cabeza de Vaca, R., E. Cárdenas-Cárdenas, P. Mondragón-Terán y A. Erazo-Valle. 2017. **Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología.** Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. Vol. 22, pp. 171 a 181.

25. Rebbeck, C., R. Thomas, M. Breen, A. Leroi y A. Burt. 2009. **Origins and Evolution of a Transmissible Cancer**. *Evolution*. Vol. 63(9), pp. 2340-2349.
26. Rodríguez, L., E. Hernández y J. Reyes. 2004. **El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer**. *Biotecnología Aplicada*. Vol. 21, pp. 60-69.
27. Roy, P. y B. Saikia. 2016. **Cancer and cure: A critical analysis**. *Indian J Cancer*. Vol. 53(3), pp. 441-442.
28. Schafer, K. 1998. **The cell cycle: a review**. *Vet Pathol*. Vol. 35, pp. 461-478.
29. Schiffman, J. D. y M. Breen. 2015. **Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer**. *Philos. Trans. R. Soc. B*. Vol. 370, pp. 1-13.
30. Sears, R. 2004. **The life cycle of c-myc**. *Cell cycle*. Vol. 3, pp. 1133-1137.
31. Setthawongsin, C., S. Techangamsuwan, S. Tangkawattana y A. Rungsipipat. 2016. **Cell-based polymerase chain reaction for canine transmissible venereal tumor (CTVT) diagnosis**. *The Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 78(7), pp. 1167-1173.
32. Solomon, E., C. Martin, D. Martin y L. Berg. 2018. **Biology**. Onceava edición. Estados Unidos. Cengage Learning. pp. 1408.
33. Thomas, R., C. Rebbeck. A. Leroi, A. Burt y M. Breen. 2009. **Extensive conservation of genomic imbalances in canine transmissible venereal tumors (CTVT) detected by microarray-based CGH analysis**. *Chromosome Res*. Vol 17(7), pp. 927-934.

34. Vizcaíno-Salazar, G. 2017. **Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio.** Medicina y Laboratorio. Vol. 23, pp. 365-386.
35. Vural, S., R. Haziroglu, M. Vural, I. Polat y A. Tunc. 2018. **Detection of progressive and regressive phase and LINE-1 retrotransposon in transfected dogs with transmissible venereal tumor during chemotherapy.** Journal of Veterinary Science. Vol. 19(5), pp. 620-626.