

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y GENÉTICAS
PRESENTES EN DISTINTAS NEOPLASIAS DEL LOBO GRIS MEXICANO
(*Canis lupus baileyi*)**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

ESPERANZA ITZEL YÁÑEZ MUÑOZ

TUTORES PRINCIPALES:

GLORIA E. QUEIPO GARCÍA

LAURA P. ROMERO ROMERO

COMITÉ TUTORAL:

FERNANDO GUAL SILL

MEXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y GENÉTICAS
PRESENTES EN DISTINTAS NEOPLASIAS DEL LOBO GRIS MEXICANO
(*Canis lupus baileyi*)**

SINODALES.

Presidente. DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

Secretaria. DRA. LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO

Vocal. DR. ROGELIO ALONSO MORALES

Suplente. DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO

Suplente. DR. JUAN ARTURO RIVERA REBOLLEDO

DEDICATORIA

No existe trabajo estéril, ni pensamiento vano, donde hay voluntad de hacer las cosas con el sentido justo.

Gracias RYA y OMY, por todo.

Gracias a mi familia, por estar siempre conmigo. Gracias Iza Ixkenda y Renata Nicté, por estar aquí y por entender que su mamá pueda trabajar por proteger y conservar a los lobos, aunque los cuentos digan que son malos. Y espero que esto les sirva para ir más allá de las apariencias, y buscar lo mejor en todos con quienes tengan contacto.

Gracias Tona, por ser la mejor hermana, por estar siempre cuando se te necesita, por entender sin palabras y por tu apoyo siempre incondicional.

Va el esfuerzo en aportar con un pequeño grano por todas aquellas especies que se han ido y por los pocos de las muchas amenazadas y en peligro que aún sobreviven a la codicia de la humanidad. La esperanza tiene recompensa, nos queda desear, trabajar y esperar un buen final.

Gracias Max por haber participado tan de cerca en este proceso, dejarte ir fue muy doloroso, pero una gran lección de Amor, igual que siempre.

Y en especial a todos los que siguen luchando por seguir sus sueños, su visión de un mundo mejor, Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, por su confianza, tiempo, ayuda, apoyo incondicional y compañía en tantos momentos difíciles. Mil gracias Dra. Laura Romero Romero, Dra. Gloria Queipo García y Dr. Fernando Gual Sill, por hacer de los tutorales una versión mejorada!.

Adrián Pérez, por tu paciencia, tiempo, dedicación y sobretodo buen humor y entereza, porque todas los cariotipos no hubieran sido posibles sin ti. Tere Martínez por todo el tiempo, dedicación, interés, apoyo, lealtad y enseñanza, dentro y fuera del laboratorio. WELUM, WELUM, GLORIA!! Te la debía. A Nayelli Najera por todo el apoyo en la elaboración de los experimentos, el manejo de bioinformática, y la estandarización de las técnicas, y por todo, todo lo demás, Ah! y por todos los desayunos!! Mil Gracias. A todos en el Laboratorio de Genética del Hospital General, por su interés y apoyo en la realización de este trabajo. En especial Isela, Adriana, Paola, Javier el viajero, Fernando, Alex, Alicia, Meche, Paty, Karem, y particularmente a la Maestra Alicia Cervantes por su enseñanza y los artículos. Y por supuesto a la Dra Susana Kofmann, por haberme aceptado, y al Dr. Sergio Cuevas por dejarme continuar. Gracias a todos!.

En especial a Don Luis, por todos los cortes de las neoplasias, a Don Migue y Gerardo por su tiempo y apoyo con las inmunos, y a Adriana por la realización de la microscopía electrónica. Al Dr Fernando Esponda por su apoyo en la estadística, por lograr la aplicación de las fórmulas del Dr Kimura a nuestra información, Mil Gracias.

A todos los que participaron directa o indirectamente en la toma y envío de muestras de los lobos para la realización de este trabajo. En Dirección General de Zoológicos en especial a Xóchitl, por toda la información. A todos en el Área de Patología a Nacho, Ángeles, Osvaldo, y Mariela y Charly por estar siempre presentes. Al Servicio Médico de los tres zoológicos Aragón, Coyotes y Chapultepec. Al personal del Centro Ecológico de Sonora, a los responsables de la Michilia, Durango, y a todos los que contribuyeron con la causística de las neoplasias, en especial a Randy Meyerson y Sue Lindsay. Por el apoyo brindado, muchas gracias.

A los integrantes del Subcomité del Lobo Gris Mexicano, por todo el trabajo y dedicación que han realizado por preservar esta especie de la extinción, y por su especial participación, apoyo incondicional e interés en el desarrollo de este trabajo a Peter Siminsky, Xóchitl Ramos, Jorge Servín, Gerardo López Islas, Arturo Rivera, Carmen Vázquez G., Linda Munson (q.e.p.d.), Sue Lindsay, Randy Meyerson. Sin olvidar a Roberto Aguilar y Carlos Sánchez, por su interés, a todos Mil Gracias.

A todos mis compañeros y maestros en este proceso, en las clases, por su tiempo y asesoría, por ayudarme a ver alternativas distintas y señalarme a las personas correctas, Gracias. Al Dr. Gerardo Suzan, por su especial interés. Por los trabajos y desveladas juntos, gracias Gerardo López y Aurora Ramos. A todos en el Departamento de Patología en la FMVZ, por compartir su espacio y su apoyo. Y a todos, todos, por su apoyo incondicional y desinteresado en todo momento, Emma, Carmen, Samanta, y a todos los demás, Mil Gracias!.

Al Dr. Mathew Breen, por su apoyo con la estandarización del cariotipo de cánidos y por facilitar varios artículos. Por las Imágenes de las laminas de los Cariotipos del Perro doméstico (*Canis familiaris*) y el lobo gris (*Canis lupus*) a Marlys L. Houck, del Instituto para la

Investigación para la Conservación del Zoológico de San Diego. Quien continua realizando la gran labor de citogenética, que iniciara en los 1970's el Dr. Kurt Benirschke en el Zoológico de San Diego. Y a la Dra Barbara Durant, quien con tanta amabilidad y disposición a apoyar, facilitara el contacto.

Y principalmente a mis sinodales por su disposición y paciencia en la parte final del proceso.

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

DRA. LUCÍA ANGÉLICA GARCÍA CAMACHO

DRA. LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO

DR. ROGELIO ALONSO MORALES

DR. JUAN ARTURO RIVERA REBOLLEDO

RESUMEN

El cáncer enfermedad compleja que involucra alteraciones genéticas, agentes etiológicos y el estado inmunológico, es causa importante de morbilidad y mortalidad en gran número de especies animales, tanto domésticas como silvestres. El trabajo se centra en estudiar las alteraciones cromosómicas y genéticas de diversas neoplasias del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), especie en grave peligro de extinción. El estudio recapitulativo de las neoplasias de la especie, indican que estas como causal de muerte (3.58%) se encuentra dentro de los parámetros esperados, se observa una alta incidencia del Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal (ACEcn), el cual representa el 38.46% del total de neoplasias, lo que representa un incremento de 4,807 veces lo reportado en perros y en humanos, asociado principalmente a exposiciones ambientales. Este incremento y la presentación en edades tempranas en individuos cercanamente emparentados, sin otra relación ambiental aparente, son factores indicativos de cáncer familiar, heredadas del linaje McBride, linaje principal del Programa de Conservación de la especie. Las alteraciones cromosómicas en las neoplasias de lobos mexicanos, muestran aneuploidias en más del 25% de las metafases estudiadas y variaciones en (CLbA) 3q, 5q, 8q, 11q, 12q, 13q,14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19q, 20q, 24q, 25q, 30q,31q, 34q, 35q, y 37q. Las alteraciones encontradas en *PTEN*, *TP53* y *CND1* se asocian al proceso neoplásico en sí, sin evidenciar participación en el inicio en la carcinogénesis. Las alteraciones moleculares de *cMYC*, lo involucran en la génesis tumoral del ACEcn y las alteraciones más frecuentes fueron de las mutaciones puntuales las deleciones (31%), seguidas de inserciones y transversiones. Los resultados de inmunohistoquímica de *cMyc*, lo señalan como marcador para progresión y evolución desfavorable de neoplasias con diferenciación escamosa en lobo mexicano. En apoyo al Programa de Conservación, conviene realizar estudio molecular de *cMYC* en la población. Se requieren más estudios de alteraciones cromosómicas tumorales, ahora que el linaje McBride se encuentra inmerso en la población. El realizar inmunohistoquímica de *cMyc* en cualquier neoplasia con diferenciación escamosa, puede ayudar a seleccionar la mejor terapia en cada caso.

ABSTRACT

Cancer is a major cause of morbidity and mortality in many animal species, including small mammals, livestock and wildlife species. Considered a complex disease, yet it had been shown essential factors needed for its presentation, such as genetic alterations, the etiologic agents involved and the immune status. This work focuses on studying the genetic and chromosomal abnormalities of neoplasias of the Mexican gray wolf (*Canis lupus baileyi*), a seriously endangered species. The retrospective summary of neoplasms observed in this species, indicates that cancer presentation is within the expected parameters as death cause (3.99%), and had also shown a significant higher incidence of adenocarcinoma with squamous differentiation in sinonasal location (SCACsn), represents 38.46% of all malignancies, representing an increase of 4,807 times those reported in other species, mainly humans and dogs and had been associated with environmental exposures. This increase and the presentation in younger ages in closely related individuals, with no other apparent environmental relationship are factors indicative of a familial cancer, chromosomal instability resulting from the McBride lineage inherited. Chromosomal abnormalities in neoplasias of Mexican wolves, shown more than 25% of aneuploidy at the metaphases studied and variations in these chromosomes: 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16q, 17q, 19q, 25Q, 30q, 31q, 34q, 35q and 37q. The changes seen in PTEN, TP53 and CND1 are associated with neoplastic process itself, but are not involved in the initiation of carcinogenesis of them. However, the alterations found in cMYC indicate that this gene may be involved in tumorigenesis of sinonasal adenocarcinoma with squamous differentiation, in addition to the results of the immunohistochemistry, indicate that it may be used as a marker for progression and unfavorable neoplasia with squamous differentiation Mexican gray wolf, when it is over-expressed in cytoplasm and / or present in the nucleus. To support the Conservation Program, the Mexican gray wolf, the molecular study of cMYC and perform a more detailed study of tumor chromosomal abnormalities can assist in the selection of breeding pairs, especially now that the McBride lineage is completely immersed in the lineages Ghost Ranch and Aragon. CMYC performing immunohistochemistry in any neoplasia with squamous differentiation, can help select the best therapy for each case.

INDICE

	Pag
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Relevancia del Cáncer en Fauna Silvestre	1
CAPITULO II. CÁNCER	
2.1. Generalidades	3
2.2. Anormalidades genéticas y cromosómicas	3
2.2.1 Oncogenes	6
2.2.2 Conversión de Proto-oncogén a Oncogén	8
2.2.3 Clasificación de Oncogenes	9
2.2.4 Genes supresores de tumor	11
2.2.5 Apoptosis y P53	12
2.3. Factores etiológicos asociados	14
2.3.1 Virus	14
2.3.2 Químicos	15
2.3.3 Radiaciones	16
2.5 Cáncer Familiar	17
2.6 Cáncer en localización naso-sinusal	18
2.6.1 Carcinógenos relacionados	19
CAPITULO III. LOBO GRIS MEXICANO	
3.1. La situación del Lobo gris mexicano y causas que lo originaron	20
3.1 La situación del Lobo gris mexicano	20
3.2 Pérdida de Biodiversidad	22
3.3 Presentación de Enfermedades	23
3.4 Pérdida de Diversidad Genética derivada de la Pérdida de Biodiversidad	24
3.5 Pérdida de Biodiversidad en México	25
CAPITULO IV. HIPÓTESIS	26
4.1. JUSTIFICACIÓN	26
4.2. OBJETIVOS	26
CAPITULO V. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1. DISEÑO DE ESTUDIO	27
Sujetos	
5.2. ANÁLISIS DE INCIDENCIA DE NEOPLASIAS EN LOBO GRIS MEXICANO	27
5.2.1. Análisis Estadístico para la fijación de un gen mutado en la población.	27

5.3. METODOLOGÍA	
5.3.1 Evaluación Morfopatológica	28
Estudio Histopatológico	28
Estudio Ultraestructural	28
Estudio Inmunohistoquímico	28
5.3.2. Estudios Citogenéticos	29
Estudio citogenético con bandas GTG	29
Estudio citogenético molecular. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	29
Estudio Citogenético Tumoral	30
5.3.3 Genética Molecular	30
Extracción de DNA	31
i) Sangre Periférica	31
ii) Tejido Animal (Fresco/ Congelado)	31
iii) Tejido Fijado en Formol/ Parafina	31
iv) Cultivo Celular	31
Cuantificación de DNA	31
Ensayo de PCR	32
Visualización de Productos obtenidos	33
Purificación de Bandas	33
PCR de Secuencia	34
Paso por columna	34
Secuenciación automatizada	35
CAPITULO VI. RESULTADOS	36
6.1 EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE LA PRESENTACIÓN DE NEOPLASIAS EN EL LOBO GRIS MEXICANO.	36
6.1.1 Genealogía del lobo gris mexicano	38
6.1.2 Análisis Estadístico para la fijación de un gen mutado en la población.	40
6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOPATOLÓGICA DE DIVERSAS NEOPLASIAS PRESENTES EN LOBO GRIS MEXICANO	44
6.2.1 Clasificación Histológica de neoplasias	44
6.3 DESCARTE POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA PRESENCIA DE ELEMENTOS VIRALES EN NEOPLASIAS.	55
6.4 COMPARACIÓN DEL CARIOTIPO DE PERRO DOMÉSTICO CON EL CARIOTIPO DEL LOBO GRIS MEXICANO	56
6.4.1. Cariotipo de perro doméstico.	56
6.4.2. Cariotipo del Lobo gris mexicano (<i>Canis lupus baileyi</i>).	57
6.4.3 Hibridación In Situ con fluorescencia de los cariotipos de perro doméstico y lobo gris mexicano.	59
6.5 COMPARACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE PERRO DOMÉSTICO Y LOBO GRIS MEXICANO.	60

6.6 DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN DISTINTAS NEOPLASIAS PRESENTES EN EJEMPLARES DE LOBO MEXICANO.	61
6.7 DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN GENES ESPECÍFICOS, RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE LAS NEOPLASIAS PRESENTES EN EL LOBO GRIS MEXICANO	63
6.7.1. Alteraciones en <i>Tp53</i>	63
6.7.2. Alteraciones del gen <i>Myc</i>	66
6.8 COORELACIÓN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS CON SU EXPRESIÓN CELULAR POR INMUNOHISTOQUÍMICA	69
CAPITULO VII. DISCUSIÓN	76
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	85
CAPITULO IX. REFERENCIAS	87

LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Oligos utilizados para MYC, CCND1, TP53 y PTEN. Se muestra la temperatura de alineación de cada uno y el tamaño esperado del fragmento amplificado.	35
Tabla 2. Tipos e Incidencia de Neoplasias en el Lobo Gris Mexicano.	36
Tabla 3. Incidencia de Neoplasias identificado por individuo, linaje, y edad de presentación.	37
Tabla 4. Alteraciones encontradas en las secuencias analizadas de TP53	63
Tabla 5. Alteraciones encontradas en las secuencias analizadas de MYC	67
Tabla 6. Listado de resultado de la Inmunohistoquímica de c-MYC en muestras tumoraes de lobo gris mexicano.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Categorías de Oncogenes	8
Figura 2. Árbol genealógico de los tres linajes de lobo gris mexicano, identificando con colores las neoplasias que se han presentado en la población.	39
Figura 3. Gráfica de probabilidad de fijación de un gen mutado en el linaje McBride.	41
Figura 4. Gráfica de probabilidad de fijación de un gen mutado en la cruce de linaje McBride- Aragón.	42
Figura 5. Gráfica de probabilidad de fijación de un gen mutado en la cruce de linajes McBride- Aragón – Ghost Ranch.	43
Figura 6 y 6a. Imágenes Histológicas. Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal. X-1 STB 840 (Individuo Índice)	45
Figura 7 y 7a. Imágenes Histológicas. Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal. VI-1STB 535	46
Figura 8. Imagen Histológica. Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal. VI-3 STB 537.	47
Figura 9, 9a. Imagen Histológica. Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal. VIII-2 STB 779.	48
Figura 10. Imagen Histológica. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. Plano Nasal 2008. V-9 STB 158. C1	49
Figura 10a. Imagen Histológica. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. Dorso y base de Cola 2008. V-9 STB 158. C2	49
Figura 11. Imagen Histológica. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. Dorso. V-7 STB 142.	50
Figura 12. Imagen Histológica. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. Dorso 2007. VI-8 STB 604.	50
Figura 13. Imagen Histológica. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa. Dorso 2008. V-16 STB 485. Ez1	51

Figura 13a. Imagen Histológica. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa. Región axilar. V-16 STB 485. Ez2.	51
Figura 13b. Imagen Histológica. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa. Pulmón. V-16 STB 485. Ezp.	52
Figura 13c. Imagen Histológica. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa. Páncreas. V-16 STB 485.	52
Figura 14. Imagen Histológica. Carcinosarcoma mamario. 2008. V-10 STB 160.	53
Figura 14a. Imagen Histológica. Carcinosarcoma mamario. V-10 STB 160.	54
Figura 15. Microfotografía electrónica. Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. Piel. V-9 STB 158.	55
Figura 16. Imágenes Cariotipo perro doméstico.	56
Figura 17. Imagen del Cariotipo de Perro doméstico (Bulldog Inglés) a las 96 horas de cultivo.	57
Figura 18. Imagen comparativa entre el Cariotipo del Lobo gris (<i>Canis lupus</i>) con el Cariotipo de Lobo Gris Mexicano (<i>Canis lupus baileyi</i>)	58
Figura 19. Imagen del Cariotipo de Lobo gris mexicano (<i>Canis lupus baileyi</i>) Elan STB 840 a las 72 horas de cultivo con alteraciones.	59
Figura 20. Imagen del Gel de Agarosa de los productos de reacción, correspondientes a <i>Myc 2, Pten4, TP53 1</i> en perro y lobo gris mexicano.	60
Figura 21. Imagen del Gel de Agarosa de los productos de reacción, correspondientes a <i>Myc ex2a, Myc ex 2b, Ccnd1 ex 3, Ccnd1 ex4, Pten ex7 y Ptenex8</i> en perro y lobo gris mexicano.	61
Figura 22. Imagen del Cariotipo tumoral de Metafase con carga genética completa de Osteosarcoma pulmonar en hembra de lobo gris mexicano (<i>Canis lupus baileyi</i>).	62
Figuras 23 y 24. Imágenes de electroferogramas de secuencias genéticas de TP53 y de MYC, de muestras tumorales de lobo gris mexicano.	68
Figura 25. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de hígado. Dilución 1/500.	70

Figura 26. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400 Piel. Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa, VI-8 (STB 604).	70
Figura 27. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc de Piel 40x, 1/400 en Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa, V5 (STB 158) 2008.	71
Figura 28. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-3 (STB 537).	71
Figura 29. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Adenocarcinoma nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-1 (STB 535).	72
Figura 30. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Adenocarcinoma nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-3 (STB 538).	72
Figura 31. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Adenocarcinoma nasosinusal con diferenciación escamosa, VIII-2 (STB 779).	73
Figura 32. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Osteosarcoma pulmonar, V-10 (STB 160).	73
Figura 33. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Carcinoma metastásico a pulmón. V-16 (STB 485).	74
Figura 34. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa. Recidiva V-16 (STB 485).	74
Figura 35. Imagen histológica de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa. Primario Dorso 2007. V-16 (STB 485)	75

ABREVIATURAS

ABL1	Oncogen homologo de la leucemia viral murina de Abelson (v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1)
ACEcn	Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en localización nasosinusal
AEC	Aminoetilcarbazol
BCR	Oncogén Relacionado a Cáncer de Mama (Breast Cancer related)
CSE	Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
F3	Factor de coagulación III-tromboplastina
FISH	Hibridación <i>In situ</i> con fluorescencia
LMC	Leucemia mieloide crónica
MIF	Factor de Inhibición de migración de Macrófagos (Macrophage migration inhibitory factor)
MYC	Oncongen Viral de la Mielocitomatosis (Myelocitomatosis viral oncogen)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PIK3CA	Fosfatidilinositol 3-cinasa, polipéptido alfa, catalítico (Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide)
PTEN	Gen homólogo mutado en múltiples cánceres avanzados de humanos (Homolog of human mutated in multiple advanced cancers, MMAC1)
RNA	Ácido Ribonucleico
SSP	Plan de sobrevivencia de la Especie (Species Survival Plan)
STB	Libro Genealógico (Studbook)
TP53/ P53	Gen de Proteína Tumoral 53 (Tumor Protein 53)

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

I. RELEVANCIA DEL CÁNCER EN FAUNA SILVESTRE

Actualmente se acepta que todas las enfermedades, tanto congénitas como adquiridas tienen una base genética, originadas por alteraciones en el genoma celular, o por efectos ambientales en el, predisponiendo a diversos procesos patológicos. En últimas décadas se ha observado un incremento sin precedente en la presentación de enfermedades, tanto infecciosas como brotes epidémicos mundiales, y alteraciones metabólicas como diabetes, pero lo más notable es el incremento de neoplasias. El cáncer es actualmente la mayor causa de muerte en humanos, según la OMS en 2007 se estimaban 7.9 millones de muertes asociadas a cáncer, representando el 13% del total de muertes globales; tan solo en Estados Unidos cada año se presentan más de un millón de nuevos casos de piel diferentes al melanoma, el cáncer más frecuente y predican 20 millones de nuevos casos en el 2020 y 12 millones de muertes en todo el mundo (McAloose 2009, OMS 2007, Alison 2001). En veterinaria la presentación de neoplasias es también cada vez más frecuente, siendo las especies domésticas o de producción para consumo humano las más estudiadas, como el perro doméstico, donde los linfomas y los osteosarcomas son las neoplasias más frecuentes (Meuton 2002). Sin embargo en lo que respecta a especies silvestres, hay varios reportes de la alta incidencia en algunas especies como el Demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), el Bandicoot listado del Oeste Australiano - Western barred Bandicoot- (*Perameles bougainville*), el Pollo de las praderas de Attwater (*Tympanuchus cupido attwateri*), ballenas belugas (*Delphinapterus leucas*), y tortugas marinas -Tortuga Laúd (*Dermochelys coriacea*), Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*), Tortuga Prieta o Verde (*Chelonia mydas agassizii*), Tortuga Caguama, Amarilla, o Cabezona (*Caretta caretta*), Tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*)- principalmente, entre muchos otros (Aguirre 2004, McCallum 2008, McAloose 2009). La incidencia de las enfermedades, se han asociado al impacto de la actividad humana, que desestabiliza estructural y funcionalmente los ecosistemas, perdiéndose los servicios ecológicos indispensables para el mantenimiento de la vida, ocasionando pérdidas importantes de gran cantidad de especies, además de generarse contaminantes, considerados carcinogénicos. El deterioro del medio, los cambios en estilo de vida, hábitos alimenticios y culturales, se han realizado sistemáticamente durante décadas, pero en últimas fechas se manifiestan las consecuencias acumulativas, al agotarse los mecanismos naturales de compensación tanto de los sistemas terrícolas, aéreos y acuícolas. Se han generado los medios para la diseminación masiva de agentes infecciosos, tóxicos o cancerígenos, al incrementarse tasas de contacto entre hospederos habituales y nuevas interacciones entre especies susceptibles, propiciando saltos taxonómicos y resistencia de agentes infecciosos, lo que ha obligado a poner énfasis en su estudio (Aguilar 2002, Patz 2004, Jones 2008).

El lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) es la subespecie genéticamente más distintiva de lobo gris presente en Norteamérica. Alrededor de 1900's, el empleo ganadero de las tierras

habitadas por el lobo, ocasionó la reducción de presas naturales, la introducción de nuevas especies. Originando que los lobos atacaran al ganado, con la consecuente caza desmedida de ganaderos, y agresivas campañas gubernamentales de exterminio, por la década de los 50's el Lobo Mexicano había sido casi eliminado en estado salvaje. (Fredrickson 2007). En 1976 el lobo mexicano fue declarado especie amenazada y actualmente se considera "extinto en estado salvaje" (EW) (IUCN 2007). Alrededor de 1980 se establece Programa binacional –México-Estados Unidos- de cría en cautiverio para la recuperación del lobo gris mexicano. A partir de siete individuos fundadores provenientes de tres líneas genéticas, endogámicas entre sí, fundadas entre 1961 y 1982, manejadas independientemente. La importancia de establecer la prevalencia de enfermedades en fauna silvestre, ayuda a comprender los efectos que estas tienen en la conservación de las especies y el impacto en el ambiente. En especies en peligro de extinción, la pérdida de individuos, disminuye la variabilidad genética, propiciando endogamia, e incrementando las características deletéreas, volviéndolos susceptibles al medio cada vez más degradado, principales puntos a considerar para evaluar la viabilidad de la especie (Munson 1993, McAloose 2009). La importancia de la especie y las características de la población de lobos registrada - reducción de polimorfismo y endogamia -, han sido objeto de numerosos estudios, para evaluar y determinar el rumbo de la conservación de la especie (Hedrick 1997, López Islas 1993). A pesar de los esfuerzos en el Programa Binacional de Reproducción en cautiverio, y a pesar de que estudios a finales de 1990 demostraban un efecto de rescate genético por la introducción de dos linajes –Aragón y Ghost Ranch-al linaje principal, recientes estudios de efectos detrimentales inmediatos, ponen de manifiesto efectos reproductivos negativos (Fredrickson 2002, Asa 2007).

Éste estudio es el primero en tratar los efectos de la pérdida de diversidad genética del lobo gris mexicano a largo plazo. Determinando la susceptibilidad a la presentación de neoplasias, como evidencia de carga de alelos deletéreos y posible fijación de genes detrimentales. A través del estudio y análisis de la importancia de la presentación de neoplasias, se caracterizó morfológicamente aquellas de las que se contaba con material, y se buscaron alteraciones cromosómicas y genéticas relacionadas con la génesis tumoral; También se buscó probar la evidencia de agentes virales o de herencia ligados a las neoplasias, y se correlacionaron los hallazgos con la progresión y evolución tumoral.

Los problemas se deben estudiar de manera transdisciplinaria, para proponer soluciones integrales, con las menores repercusiones negativas al corto y largo plazo. Este trabajo forma parte del estudio para la conservación del lobo gris mexicano, -uno de los grandes carnívoros existentes en México, considerado parte aguas en el proceso de conservación de todas las especies que dependen de su supervivencia, ya que la salud del ecosistema se deriva y compone de manera recíproca de la salud de los organismos que lo componen y el lobo se encuentra próximo a volver a ser liberado a los ecosistemas que habitaba hace casi un siglo (Aguirre 2002, McAloose, 2009, Siminsky 2010 y 2011).

CAPITULO II.**CÁNCER.****2.1 GENERALIDADES**

El cáncer es una enfermedad multifactorial compleja, por el efecto combinado de factores genéticos y otros factores, principalmente ambientales, ya que la exposición a diversos agentes que desencadenan el proceso –carcinogenos- pueden estar presentes en el alimento, el agua, el aire, compuestos químicos y la exposición solar. Y de manera muy importante la capacidad de la respuesta inmune del individuo para identificar y responder al proceso neoplásico en sí (Alison 2001).

Las enfermedades complejas presentan tres características distintivas: Primero, generalmente varían en la severidad de los síntomas y la edad de presentación. Segundo pueden variar en los mecanismos etiológicos que la desencadenan, y que pueden involucrar varias vías o mecanismos de daño. Y tercero y el más importante, es que aparentemente tienden a ser causadas por alteraciones en numerosos genes, los que pueden contribuir poco o ser causantes de un alto riesgo. Hasta el momento se han implicado un gran número de genes, 337 según la revisión por Mitelman en 2007, en el inicio y progreso de cánceres humanos. Y se están realizando cada vez más estudios para caracterizar y encontrar la relevancia de los genes relacionados al cáncer extrapolándolos en otras especies animales, utilizándolos como modelos biomédicos para entender y ayudar a caracterizar la etiología de muchos procesos en el hombre (Breen 2008, Mitelman 2007, Thomas 2003).

Actualmente se acepta que el cáncer es en esencia una enfermedad genética a nivel celular, - condición patológica establecida por el efecto biológico consecuente con las alteraciones en el genoma de una célula- se ha demostrado que las alteraciones derivan de un proceso clonal, característica común de todas las neoplasias, independientemente del tejido del que deriven o los agentes mutagénicos que hayan participado en su formación. La génesis y progresión de los tumores sólidos en humanos, se realizan por la función aberrante de los genes que regulan positiva o negativamente varios aspectos del ciclo celular. Los mecanismos por los que se alteran las funciones de los genes, varían entre tumores e incluso entre el tipo de genes afectados. Hay una gran cantidad de factores diferentes que pueden ocasionar alteraciones en la función de estos genes, sin embargo hay dos tipos dominantes de eventos genéticos que se han identificado en las etapas iniciales: la inactivación de genes por mecanismos de **delección, mutación o alteraciones epigenéticas**; y la activación o desregulación de genes como consecuencia de **mutaciones puntuales, amplificaciones o anormalidades citogenéticas balanceadas** (Alberts 2002).

2.2 Anormalidades genéticas y cromosómicas

El gen es la unidad de la herencia. Todos los individuos que forman parte de la población de una especie, comparten el mismo juego de genes, sin embargo hay diferencias entre los

individuos, mostradas a través del tiempo y diferentes versiones de los genes (alelos). Por lo tanto cada organismo de una especie tiene un contenido único de información genética, que se conoce como genoma.

El gen está formado por DNA -el material genético en todas las células-, constituido por dos cadenas de azúcares (desoxiribosa) unidas entre sí por fosfatos, y cada azúcar tiene unidas bases nitrogenadas; las cadenas giran en espiral alrededor de cada una, formando una doble hélice. Las dos cadenas son complementarias, por lo que la DNA polimerasa es capaz de usar las secuencias de las bases presentes en cada cadena como templado para hacer una molécula nueva de la cadena de DNA. Este proceso -la replicación- del DNA se lleva a cabo cada vez que las células se dividen. Tradicionalmente se consideraba el gen como una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica información que representa polipéptidos en particular (traducción), o especifica la función de una molécula de RNA (transcripción), basados en el código genético: grupos de tres bases nitrogenadas específicas que codifican aminoácidos individuales que constituyen las moléculas de proteínas. El orden de los codones en el DNA es el mismo orden de los aminoácidos en la proteína terminada. Sin embargo los estudios moleculares más recientes han alterado esta percepción de los genes, haciendo necesaria una nueva definición: El gen es una secuencia de DNA genómico o RNA que realiza una función específica, la realización de la función puede no requerir que el gen sea traducido o transcrito. Hasta el momento se reconocen tres tipos de genes: 1. Los genes que codifican proteínas, que son transcritos en RNA y posteriormente traducidos a proteínas. 2. Genes específicos de RNA, que solo son transcritos, y 3. Genes reguladores, los que incluyen secuencias sin transcribir (Li 2000, Lewin 1997, Cupples 2001).

A la alteración en la Información genética, se le conoce como **mutación**, y suele producir un cambio en las características (fenotipo). Estas alteraciones suelen producirse por la exposición a determinados agentes mutagénicos –inducidas- o bien por errores durante los mecanismos de replicación o de reparación del ADN -espontáneas-. Según el tipo celular afectado, las mutaciones pueden ser: somáticas o germinales. Estas se clasifican de acuerdo a la longitud de la secuencia de DNA afectado por el evento mutacional y se pueden distinguir tres tipos fundamentales de mutaciones. 1. Mutación puntual o de un solo nucleótido. Por el tipo de evento mutacional, estas pueden ser: a) sustituciones -reemplazo de un nucleótido por otro-, si la base original, es una purina (A o G) y es remplazada por una pirimidina (T o C), este cambio recibe el nombre de “**transversión**”, si el cambio es con una base del mismo tipo (una purina por purina o pirimidina por pirimidina) se conoce como “**transición**”. b) inserciones – adición de uno o más nucleótidos a la secuencia-, c) recombinación –intercambio genético o crossing-over y la conversión génica- d) deleciones –ausencia de uno o más nucleótidos e) inversiones –rotación de 180° de un segmento de la doble cadena, de uno o más pares de bases. 2. Cromosómicas que pueden ser: duplicaciones o deleciones totales o parciales y 3. Genómicas, donde se afectan todos los cromosomas - poliploidías (Li 2000, Cupples 2001).

Algunos genes son de cientos de pares de kilo bases (kb) de largo (de 1kb hasta de 51000kb). Sin embargo, la alteración de una sola base –Mutación puntual- puede ser suficiente para cambiar la información genética, y derivar en la alteración de la proteína producida, lo cual puede alterar significativamente la función de la misma, esto se ha comprobado en el gen *RAS*,

donde una mutación puntual altera la hidrólisis que la inactiva, quedando permanentemente activada, comprobado en ciertos tumores murinos. Un gen mutante que aparece en una población finita, eventualmente se perderá o se fijará en la población. El tiempo promedio para que suceda cualquiera de estas alternativas en una población se ha estudiado desde hace varias décadas por varios científicos, ya que tiene un valor práctico en la genética poblacional, sobre todo cuando se trata de la fijación de genes (Alberts 2002, Cupples 2001, Kimura 1969).

Algunas de estas alteraciones genéticas se han asociado a anomalías cromosómicas específicas, y a pesar que desde 1914 Boveri propuso que las anomalías cromosómicas eran los factores que originaban el cáncer, hasta la fecha aún se sabe muy poco de estas. Es a partir de que Nowell y Hungerford, descubrieron el cromosoma Filadelfia en la Leucemia mieloide crónica –el primer cambio cromosómico consistente en el cáncer humano- que se soportó esta teoría en 1980's y se demostró la importancia del rol de las anomalías cromosómicas en la iniciación de la carcinogénesis y se ha llegado a determinar un gran número de aberraciones cromosómicas en varios tumores, algunas incluso patognomónicas. En todos los tipos de tumores se observan re-arreglos balanceados, los re-arreglos cromosómicos típicos son inversiones, inserciones y las translocaciones; y es particularmente en estas últimas, que se ha observado como consecuencia la fusión de genes, demostrándose que estas alteraciones genéticas tienen un papel importante en las etapas iniciales de la génesis tumoral. Estas alteraciones se caracterizan por la acción de sus efectos de dos maneras: en primer lugar por la sobreexpresión de un gen por su punto de ruptura; y segundo, por la creación de un gen híbrido, quimérico, formado por la unión de dos genes en cada uno de sus puntos de ruptura. Estos re-arreglos genéticos representan un papel importante y es uno de los primeros pasos que se dan en el inicio de la carcinogénesis. Los genes involucrados generalmente se correlacionan con fenotipos tumorales específicos por un lado, además de que se ha comprobado que en los tratamientos tumorales exitosos, hay un decremento importante en las quimeras genéticas. En modelos animales se ha probado que construyendo estas mismas quimeras genéticas, se da origen a los mismos procesos neoplásicos en los que fueron detectados en humanos. Y por último, al silenciar el transcrito funcional *in vitro*, es decir erradicando la quimera genética formada, se logra una acción inversa en la tumorigenicidad, es decir, hay un decremento en la proliferación y/o diferenciación celular. Es por esto que la detección de los re-arreglos cromosómicos estructurales es de gran importancia, ya que los puntos de ruptura involucrados indican los genes relevantes con el cáncer (Alberts 2002, Alison 2001).

Así se ha visto que la acumulación de mutaciones en los genes que involucran el control del crecimiento celular como los **oncogenes** y los **genes supresores de tumor**-, y los que controlan la programación de la muerte celular, y la reparación de defectos, juegan un papel significativo en el desarrollo de los tumores, cuando hay fallas en su funcionamiento normal en las etapas tempranas. Otros genes involucrados en los tumores son los que afectan la regulación de los aspectos de diferenciación celular, estabilidad genómica, angiogénesis, invasión y metástasis. Según la revisión hecha por Mitelman en el 2007, se han detectado 337 genes diferentes en la formación de cáncer, implicados en 358 fusiones de genes, siendo 328 fusiones genéticas las detectadas en procesos malignos. Hasta el momento, las causas de estas anomalías continúan pobremente entendidas, si bien se ha demostrado que ciertas exposiciones

ambientales y ocupacionales, así como terapias con drogas cito-tóxicas pueden inducir aberraciones cromosómicas. Muchos de estos re-arreglos están bien establecidos, como en el caso de la leucemia mieloide aguda (LMA), hasta ahora el proceso neoplásico más estudiado, la cual presenta 267 re-arreglos, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) presenta 155 re-arreglos. De esta forma, se ha determinado que la desregularización genética en un punto de ruptura asociado a los linajes de linfocitos B y T, están siempre presentes en las leucemias linfoides y los linfomas. Por ejemplo, el linfoma de Burkitt, en el cual siempre se observa al menos una de tres translocaciones: t(8;14) (q24;q32), t(2;8) (p11;q24), o t(8;22) (q24;q11). En las tres, el punto de ruptura en el cromosoma 8 esta siempre junto o cercano al gen *MYC* y el otro punto de ruptura siempre involucra un gen relacionado con inmunoglobulinas, codificando la cadena pesada (IGH), o las cadenas ligeras kappa (IGK) o lambda (IGL) (Fröhling 2008, Mitelman 2007, Albertson 2003).

Sin embargo, las células tienen mecanismos que contrarrestan el daño antes de que se desarrolle el cáncer, en estos se incluyen **genes de reparación de DNA, apoptosis y vigilancia inmunológica**. Los genes de reparación editan la replicación del DNA y reducen las tasas de mutación espontánea. Los individuos con mutaciones hereditarias en los genes de reparación son susceptibles a cáncer y la ausencia de estos genes hace que estos tumores sean resistentes a algunas drogas anti-cáncer. La función primaria de los genes de reparación es la de identificar y corregir los errores en la replicación del DNA que se escapan a la corrección del complejo de replicación. Los genes de reparación previenen las mutaciones espontáneas, las células defectuosas pueden acumular tasas de mutaciones cientos de veces más altas que lo normal (Karran 2001).

2.2.1 Oncogenes

El concepto de que los genes pueden ocasionar cáncer, deriva de los experimentos, donde se infectaron animales con ciertos virus (como los retrovirus) y estos desarrollaban cáncer rápidamente. Por lo que se predijo que estos virus contenían genes que se denominaron “oncogenes” que ocasionaban que las células normales se volvieran células tumorales. Años de estudios en las características moleculares de los retrovirus de pollos y ratones confirmaron esta suposición y se aislaron y caracterizados una gran variedad de oncogenes. Sorprendentemente los oncogenes tienen un origen celular y no viral. Es decir los retrovirus oncogénicos han adquirido (o traducido) ciertos genes celulares y los han incorporado a sus genomas. La contraparte de los oncogenes en las células normales se conoce como “proto-oncogenes”. Estos codifican proteínas que participan en una o más vías de señalización de transducción. Estas vías de señalización regulan proliferación y maduración celular. Debido a su rol central en el ciclo de vida celular, los proto-oncogenes se han conservado durante la evolución y varían muy poco desde las levaduras hasta el hombre.

Se han identificado una gran cantidad de oncogenes y su número se espera que se incremente conforme siguen avanzando los análisis genéticos de las neoplasias. Generalmente los genes se denominan utilizando una nomenclatura de tres letras, que están relacionadas con el virus del que se identificaron por primera vez. Por ejemplo el proto-oncogen *MYC* se originó de un aislado del virus de mielocitomatosis aviar y *ERB A* y *ERB B* se aislaron del virus de

eritoblastosis aviar. El oncogen viral es usualmente precedido de una *v*, como en *v-Myc* para distinguirlo de su protooncogen relacionado (que generalmente es precedido por una *c* para celular como en *c-MYC*). Es importante recordar que no es el gen, sino la proteína que codifica, la que permite la transformación celular. Las proteínas que son codificadas por los oncogenes se conocen como oncoproteínas, en la tabla 1, se muestran varios oncogenes conocidos.

Las vías de transducción, necesitan de una señal o estímulo extracelular para activar el núcleo vía una cascada de mensajeros. La mayoría de los mensajeros moleculares extracelulares (generalmente factores de crecimiento) son proteínas solubles o polipéptidos, aunque se han identificado otras moléculas importantes de otras clases, como son iones y lípidos. Adicionalmente a los factores solubles, los constituyentes de la matriz extracelular juegan un papel importante en la señalización. Las moléculas extracelulares se unen a los receptores celulares que unen la membrana celular y conducen la señal, llamadas cinasas (enzimas encargadas de unir un átomo de fosfato a otras proteínas). Estos mensajeros proteicos se encuentran normalmente en un estado inactivo o, activo pero regulado. Muchos de estos mensajeros pueden ser activados por fosforilación y una vez activados, interactúan con el siguiente mensajero en la cascada, pasando por la activación de estos hasta que el mensaje llegue al núcleo. Hay dos grupos de cinasas que son importantes en la transformación en neoplasias es la fosforilación del aminoácido tirosina (tirosin cinasa) y serina-treonina (serin/treonina cinasa) que ocurren en proteínas. El cambio en la defosforilación regresa a las proteínas a un estado inactivo, y en células normales, la transducción de la señal es cuidadosamente regulada en una matriz de vías reguladoras sobrepuestas.

Una de las vías de transducción mejor caracterizadas envuelve a las proteínas **Ras**. La vía de señalización de las proteínas **Ras** comienza cuando el factor de crecimiento se une a un receptor específico en la superficie celular. Esta señal, induce al receptor a formar un dímero, y una vez dimerizado, el receptor se autofosforila e induce un cambio conformacional. Como resultado de este cambio conformacional, el receptor puede interactuar con un puente formado por un complejo de proteínas, que transfieren la activación de las proteínas *ras* localizadas en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Normalmente, las proteínas *ras* están inactivas y se encuentran unidas a una guanosin-difosfato (GDP). Cuando las proteínas **Ras** son estimuladas, se cambia la GDP por una guanosin tri-fosfato GTP y entonces se activa. Las proteínas **Ras** son reguladas negativamente por GAP (proteína activadora de GTPasa), una proteína que induce la hidrólisis del complejo-*ras* GTP a GDP. Las proteínas **Ras** atraen a la cinasa treonin-cinasa denominada **Raf**, por la parte interna de la membrana celular donde **raf** se fosforila por la acción por unas cinasas asociadas a la membrana. El **Raf** activado fosforila a la cinasa de la proteína activadora del mitógeno (MAP), y esta cinasa migra al núcleo, donde estimulan la síntesis de factores de transcripción nucleares como el **Myc**. Estos factores de transcripción estimulan la expresión de genes que ocasionan que la células entren al ciclo celular y se dividan, o que alteren su diferenciación o patrones de síntesis.

Categorías de Oncogenes

	Categoría	Protooncogen
Factores de crecimiento	F.C. derivado plaquetas (cadena β)	<i>sis</i>
Receptores de factor de Crecimiento	F.C. de fibroblastos	<i>int2</i>
	Receptor EGF	<i>erbB</i>
	Receptor parecido EGF	<i>erbB2</i>
	Receptor CSF1	<i>fms</i>
Traductor de señal Intracelular	Receptor de Angiotensina	<i>mas</i>
	Proteína unida a GTP	<i>ras</i>
	Asociado a membrana	<i>src</i>
Proteínas Reguladoras Nucleares	Citosólico	<i>abl</i>
	Citosólico	<i>raf</i>
	Citosólico	<i>mos</i>
	Factor de transcripción	<i>myc</i>
	Factor de transcripción	<i>myb</i>
Reguladoras del Ciclo Celular	Factor de transcripción	<i>fos</i>
	Ciclinas	<i>jun</i>
	Cinasas dependientes de ciclinas	ciclina D
	Citosólico	CDK4
	Citosólico	<i>raf</i>
	Citosólico	<i>mos</i>

Tabla 1. Se muestra una clasificación de los protooncogenes más conocidos, de acuerdo a su función celular.

Conversión de Protooncogenes a Oncogenes

Los protooncogenes se pueden convertir a oncogenes por alguno de estos dos mecanismos: alteración de la expresión del gen o por la alteración de la estructura del gen.

1. Alteración de la Expresión del Gen

La expresión génica puede ser alterada vía la amplificación génica, por inserción del promotor y/o por translocación del gen. Cada uno de estos mecanismos puede ocasionar falla en la regulación de la síntesis de proteínas oncogénicas normales. Estas proteínas funcionan estimulando la proliferación celular, así su sobre-expresión puede ocasionar una fatal pérdida de la homeostasis celular.

Por razones que aún no están bien comprendidas, las células tumorales generalmente contienen una cantidad excesiva de DNA localizado replicado, lo que puede resultar en la formación de múltiples copias (de ahí el termino de amplificación génica) del mismo gen o genes. Los genes duplicados (o amplicones) se pueden encontrar en pequeñas estructuras parecidas a cromosomas, que se conocen como minutos dobles (traducción literal de double minutes) o pueden formar estructuras concatenadas dentro de un cromosoma, que pueden ser identificadas como regiones teñidas homogéneamente (HSRs por sus siglas en inglés). Las HSRs son porciones de los cromosomas que carecen de las características del patrón de bandeado normal encontrado en los cromosomas. En general la amplificación génica conduce a la sobreproducción de productos codificados por los genes en el amplicón.

Cuando ciertos retrovirus insertan su genoma en el DNA celular, los elementos reguladores que normalmente regulan la expresión génica viral pueden afectar también la expresión de los genes de las células vecinas. Los virus y las células tienen dos tipos de elementos reguladores, los promotores y los potenciadores. Ambos elementos estimulan la expresión génica, pero difieren en sus atributos funcionales. Los promotores estimulan los genes adyacentes, pero deben estar correctamente orientados (río arriba de los genes) para facilitar la expresión. Los potenciadores estimulan la actividad de los promotores, pero a diferencia de los promotores, tienen la capacidad de estimular la transcripción independientemente de su orientación. En general los potenciadores y promotores virales son más potentes que su contraparte celular, por lo que pueden incrementar más significativamente y alterar la expresión génica celular. La mayoría de las veces, la inserción del genoma viral afecta la regulación de la expresión génica, no la estructura o función de los genes afectados.

2. Alteración de la Estructura del Gen (Funcional)

Los proto-oncogenes pueden ser transformados en oncogenes por daño a su estructura. Las alteraciones estructurales pueden ocurrir por la mutación de nucleótidos individuales o por alteraciones que pueden ocurrir durante eventos genéticos globales. La expresión génica puede ser alterada por cambios espontáneos o inducidos por carcinógenos, que originen cambios estructurales en los cromosomas, como inserciones, deleciones o traslocaciones. Las traslocaciones cromosómicas resultan del movimiento de una parte de un cromosoma a otro, o porciones que pueden ser intercambiadas entre cromosomas en eventos de traslocaciones recíprocas. Este proceso puede ocasionar la pérdida de la regulación de la transcripción por cambios en las posiciones de los promotores y los protooncogenes, por yuxtaposiciones cercanas activas. Un ejemplo de esto ocurre tanto en humanos como en ratones: los protooncogenes *C-MYC* se sobreexpresan en el linfoma de células B debido a una traslocación de una parte activa celular del promotor del gen de la inmunoglobulina a otro cromosoma que contiene *C-MYC*. Como consecuencia el gen *MYC*, uno de los oncogenes más estudiados, se expresa constitutivamente en los genes que regulan la expresión de las inmunoglobulinas.

El daño a los nucleótidos individuales (mutaciones puntuales) son los cambios estructurales más comunes derivados de los protooncogenes. Los químicos carcinogénicos y algunas formas de radiación, ocasionan daño por este mecanismo. La mutación de un solo nucleótido puede derivar en la incorporación de un aminoácido diferente a una proteína, y si se encuentra localizada apropiadamente, puede alterar significativamente la función de la actividad de la misma. Por ejemplo, una mutación puntual en el gen *RAS* se puede detectar en ciertos tumores murinos. Normalmente la hidrólisis de GTP a GDP inactiva *RAS*, pero una mutación puntual puede alterar a la proteína Ras de tal forma que sea incapaz de interactuar con GAP y permanezca siempre activada. Como consecuencia, las señales proliferativas que emanan del procedimiento llevado a cabo por *RAS* permanecerán sin chequeo.

En algunas circunstancias las funciones de los protooncogenes, se alteran por traslocación cromosómica. Un ejemplo de cáncer que se ha estudiado originado a partir de una traslocación cromosómica es la Leucemia pro-mielocítica aguda (LPM), por traslocación de t(15;17). Esta traslocación origina que los blastos en la LPM expresen una proteína derivada de la fusión de un factor putativo de transcripción. Y otro ejemplo bien caracterizado de este

proceso ocurre en la traslocación distintiva que produce el cromosoma Filadelfia (t9;22) (q34;q11) encontrado en muchos casos de la leucemia mielogénica crónica (LCM), que se presenta en adultos. En esta traslocación recíproca, un fragmento del protooncogen (c-ABL) se mueve a un sitio dentro del gen de otro cromosoma, denominado “región de unión del punto de quiebra” (bcr por sus siglas en inglés). Esta fusión de genes, origina un gen híbrido anormal que codifica para el RNA mensajero que contiene información para ambos genes. Cuando se traduce el mensajero da como resultado una proteína híbrida, denominada “proteína de fusión”, siendo esta una oncoproteína activa.

Clasificación de Oncogenes

Los oncogenes se pueden agrupar en cinco categorías basados en el tipo de oncoproteínas que codifican. Estas categorías incluyen: 1. factores de crecimiento, 2. receptores de factores de crecimiento, 3. traductores de señal intracelular, 4. proteínas reguladoras nucleares (factores de transcripción) y 5. ciclinas.

1. Los protooncogenes de factores de crecimiento, codifican proteínas que pueden ocasionar la transformación de las células estimulando los receptores de membrana de los factores de crecimiento. En estas circunstancias la oncoproteína tiene una secuencia de aminoácidos normales, pero es producida en cantidades anormales no reguladas. Las formas mutantes del factor de crecimiento también ocurren, y pueden estimular de manera inapropiada los receptores y unirse a ellos de forma inapropiada.

2. Los oncogenes pueden codificar receptores de los factores de crecimiento. Un receptor de factor de crecimiento típico tiene tres componentes: un factor de crecimiento extracelular unido a un dominio, un segmento transmembranoso y un dominio citoplasmático con actividad de cinasa. El oncogen que codifica al receptor del factor de crecimiento como *ERB-B*, se encuentra generalmente truncado en una forma no mayor que una porción del receptor extracelular de la proteína normal. Este receptor anormal, no requiere de la unión del factor de crecimiento para ser estimulado y permanece constitutivamente activado.

3. Traductores de señal intracelular. Estos se localizan en el citosol (Abl, Raf) o asociados a membrana (Ras, Src) típicamente estas moléculas son cinasas. Mutaciones puntuales o alteraciones estructurales más grandes, pueden alterar a estas proteínas dejándolas permanentemente activadas, produciendo un nivel de actividad que origina una proliferación celular descontrolada.

4. Los factores de transcripción son proteínas nucleares que regulan la expresión génica. Se encuentran unidos a sitios específicos del DNA, solos o en un complejo con otras proteínas que faciliten la expresión de los genes. Las oncoproteínas codificadas por *MYC*, *JUN* y *FOS* son factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que son necesarios para la división celular. Los niveles anormales de expresión o mutación que altere la función de estas proteínas, compromete el control del crecimiento celular.

5. Las ciclinas son una serie de proteínas que regulan con precisión el movimiento a través del ciclo celular. Las ciclinas individuales se expresan por breves intervalos y en puntos exactos en el ciclo celular. Las ciclinas interactúan y activan enzimas, llamadas “cinasas dependientes de

ciclinas" (Cdk). Las Cdk, en turno, activan proteínas que son esenciales para la progresión a través del ciclo celular. La disrupción en el funcionamiento de las ciclinas origina la pérdida de la regulación del control de la replicación celular. Varios tipos de tumores en el humano se han descrito con mutaciones en los genes que codifican ciclinas o cinasas dependientes de ciclinas.

2.2.2 Genes supresores de tumor

Los genes supresores de tumor juegan un rol crítico en el control del crecimiento de las células normales. Sirven como frenos para la replicación celular. Cuando los genes supresores de tumor están inactivos, las células pierden el control de la regulación celular. Una simple copia intacta de un gen supresor del tumor es suficiente para mantener el control de la proliferación celular. Cuando ambos alelos se pierden o se dañan, la célula afectada corre un gran riesgo de sufrir una transformación cancerosa.

Para entender la relevancia de la supresión de los genes supresores de tumor en la génesis tumoral, es necesario hacer una revisión del ciclo celular normal y como difiere en una célula tumoral.

El ciclo celular consiste de una serie de eventos bioquímicos periódicos temporales específicos que preparan a la célula para la división. Posterior a la mitosis, una célula puede seguir dos rutas, salir del ciclo celular y entrar en un estado quiescente (fase G₀), o continuar proliferando. En la mayoría de los casos, las células en G₀ pueden regresar al ciclo celular cuando sea necesario por la interacción de uno o varios factores de crecimiento. La primera fase de crecimiento en el ciclo celular se denomina G₁, para unir el tiempo entre la mitosis y la siguiente ronda de síntesis de DNA. La duración de esta fase en el ciclo celular es más variable en duración que el resto de las fases, encontrándose un rango de entre 6 a 12 horas. Durante esta fase del ciclo celular, se sintetizan RNA y proteínas, pero no se forma DNA. La síntesis del DNA ocurre durante la fase de S, cuando el contenido de DNA de la célula aumenta de diploide a tetraploide, La duración de la fase S es seguida de la fase G₂, una pausa de 3 a 4 horas que preceden a la mitosis. Durante la fase G₂, la célula tiene dos juegos completos de cromosomas diploides. Mitosis o la fase M, no se lleva más de una hora para completarse en el ciclo celular normal.

La habilidad de las células para restringir o disminuir su movimiento en el ciclo celular, está regulada. Esto se puede observar cuando células normales en un cultivo celular después de ser irradiadas, sufren daño genético. Las células irradiadas en las etapas tempranas del ciclo celular, responden deteniéndose antes de progresar a la fase S. Esta pausa en el ciclo celular se denomina "punto de control o checkpoint G₁/S". Durante esta pausa, el DNA que pudo haber sido dañado por las radiaciones, puede ser reparado antes de que las mutaciones se pasen al genoma de las células hijas. Sin embargo en las células que los genes supresores de tumor están ausentes o no están funcionando adecuadamente, el daño genético se deja sin reparar y generalmente origina inestabilidad genética y hay eventos oncogénicos adicionales. Existe otro punto de control similar entre G₂ y la fase M del ciclo celular.

De los genes supresores de tumor, los mejor caracterizados son P53 y el gen del retinoblastoma (Rb). Ambos genes codifican para fosfo-nucleo-proteínas que regulan la progresión a través del ciclo celular. Cuando la proteína Rb se encuentra en su forma no-

fosforilada, inhibe que la célula entre a la fase S del ciclo celular, uniéndose a factores de transcripción que estimulan a los genes promotores de crecimiento. Cuando la célula es estimulada a dividirse, la proteína Rb se fosforila, ocasionando que libere al factor de transcripción que se encontraba secuestrado, permitiendo que la célula entre a la fase S. Una vez que se realizó la fase S, la proteína Rb se desfosforila nuevamente, y otra vez se une al factor de transcripción e inhibe volver a entrar en la fase S. En las células tumorales, la habilidad de la proteína Rb para unirse a factores de transcripción se rompe y se elimina este punto de control.

El gen P53 codifica para una fosfo-proteína nuclear que puede regular el movimiento de la célula a través del ciclo celular. A pesar de que esta fosfoproteína no se encuentra involucrada en la regulación del ciclo celular normal, esta juega un papel muy importante en las células que han sufrido daño genético. A través de mecanismos que aún no están bien definidos, P53 puede detectar cuando una célula ha sufrido daño en el material genético debido a luz U.V., irradiación o agentes químico carcinogénicos y entonces arresta a la célula antes de entrar a la fase S de la fase G1 para darle tiempo para reparar el daño celular al DNA. También induce la reparación de enzimas del DNA para ayudar en la eliminación de mutaciones. Si el daño al DNA es demasiado o excesivo, P53 puede promover que la célula entre en apoptosis.

A pesar de que normalmente P53 es una proteína de tiempo de vida corto, después de sufrir daño genético, se modifica de forma que causa que se incremente el tiempo de vida de esta proteína, se acumula en el núcleo y activa la transcripción de genes que inhiben específicamente a las cinasas-ciclino-dependientes y previene la fosforilación de la proteína Rb originando el arresto del ciclo celular. Otros efectos incluyen la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA o en apoptosis. Las células que llevan genes P53 mutados o células infectadas con virus DNA oncogénicos, alteran el funcionamiento de P53 y no permiten que se arreste el ciclo celular antes de entrar a fase S y es menos probable que se induzca la apoptosis. Las células afectadas pueden continuar replicándose con el DNA dañado, y aquellas que no habían desarrollado cambios genéticos letales, corren el riesgo de adquirir más mutaciones o daño genético propiciando la transformación neoplásica.

Las regulaciones aberrantes afectan varios aspectos de la historia natural del crecimiento de tumores, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular en tumores y su conversión maligna, así como la progresión del tumor y la formación del estroma.

2.2.3 Apoptosis y P53.

Los genes que controlan la programación de la muerte celular, pueden jugar un papel muy significativo en el desarrollo de los tumores, cuando hay fallas en su funcionamiento normal. Las células son miembros de una comunidad altamente organizada, por lo que el número de células que la forman está firmemente regulado, no solo por mecanismos de división celular, sino por mecanismos de control de muerte celular. Si las células no se necesitan más, se "suicidan", activando mecanismos intracelulares de muerte programada. Por lo que el proceso se denomina Muerte celular programada, y de estos procesos el más conocido es la apoptosis.

La apoptosis es mediada por Cascada Proteolítica Intracelular

Una célula que muere por apoptosis, lo hace de manera limpia y ordenada, sin dañar a las células vecinas. Esta célula se encoje y condensa. El cito-esqueleto se colapsa y la membrana nuclear desaparece, y el DNA nuclear se rompe en fragmentos. Lo más importante es quizá, que la superficie de la célula se altera, desplegando mecanismos que ocasionen que la célula sea rápidamente fagocitada por las células vecinas, o por macrófagos (células especializadas en actividades fagocíticas).

En casi todas las células de los tejidos de mamíferos, la proteína P53 está presente para garantizar que las células mantengan el orden interno.

Si P53 recibe información acerca de desorden metabólico o daño genético en una célula, arresta el ciclo celular, para impedir que la célula continúe con su ciclo de crecimiento y división, y al mismo tiempo, orquesta la respuesta localizada en la célula para facilitar la reparación del daño. Si P53 aprende que el desajuste metabólico o el daño al genoma son muy severos, para poder ser curados, decide emitir señales que despierten el mecanismo normal celular de suicidio programado o apoptosis. La consecuencia de esto es una muerte celular rápida. Esto resulta en la eliminación de la célula, que de otra manera podría poner en riesgo la salud y sobrevivencia del organismo, si continuara creciendo y dividiéndose.

La apoptosis consiste de una serie de cambios celulares específicos en el funcionamiento, que garantizan la desaparición de la célula, de una manera limpia y ordenada, a veces hasta en una hora de que el proceso fue activado. La presencia continua de mecanismos latentes pero intactos de la maquinaria de apoptosis, representa una amenaza latente para una célula cancerosa incipiente, puesto que su mecanismo está hecho para eliminar a las células que se encuentran en camino de volverse neoplásicas. Esto explica el por qué, el funcionamiento de P53 debe ser desactivado antes de iniciar la clonación de células pre-malignas, para que estas puedan estabilizarse y enraizarse en un tejido.

Cierto tipo de células linfoides tumorales sirve de ejemplo para demostrar la importancia de los genes en el control de la apoptosis. Estos tumores se caracterizan por la expresión aumentada de un gen, el BCL-2, que bloquea la apoptosis. BCL -2 es sólo uno de los genes de una familia de genes que participan en la regulación de la apoptosis. La habilidad de las oncoproteínas como BCL-2 de bloquear las rutas de muerte celular, le dan a las células la propiedad de poderse mantener, a pesar del daño genético, y escapar de los mecanismos, que estimularían a una célula normal a inducir una muerte programada. De esta manera, los linfocitos que tienen un ciclo normal, con un tiempo de vida definido, cuando son neoplásicos por sobre-expresión de BCL2 persisten y lentamente forman masas linfoides. Consecuentemente las células eluden la apoptosis y pueden multiplicarse, lo que ocasiona que corran riesgo de acumular más daños en el material genético, lo que puede potencializar su malignidad.

2.3 Factores Etiológicos Asociados

2.3.1 Virus

Los virus se han reconocido desde hace mucho tiempo como agentes de neoplasias en los animales domésticos, y hay estudios que los vinculan también a neoplasias en fauna silvestre. Los virus oncogénicos representan un amplio grupo de virus, que pueden ser virus DNA y RNA.

Algunos factores virales que inducen transformación neoplásica pueden ser:

- 1) Una simple partícula viral se necesita para infectar a una célula.
- 2) Todo o parte del genoma viral persiste en la célula transformada pero no siempre produce progenie infectiva.
- 3) Por lo menos una parte del genoma viral se expresa.
- 4) La transformación resulta de la corrupción de los mecanismos de crecimiento normal de la célula normal.
- 5) La reversión de la transformación se puede realizar con la interferencia específica de efectores moleculares virales.

Todos los virus RNA que causan neoplasias son retrovirus, pero sólo algunos miembros de la familia de los retrovirus son oncogénicos. La mayoría de los retrovirus oncogénicos se clasifican como Retrovirus tipo C de los mamíferos. Los retrovirus tienen un ciclo de vida común, todos tienen un genoma de RNA que se transcribe vía la enzima transcriptasa reversa en una cadena doble de DNA del provirus. Como parte obligada del ciclo de vida del virus, el provirus del DNA se integra, generalmente al azar, en el genoma de la célula infectada. Hay tres genes retrovirales mayores, gag, pol y env. El gen gag codifica para las proteínas de la cápside. El gen pol codifica para la enzima transcriptasa reversa. Y el gen env codifica para las proteínas de la envoltura. Los genes virales se expresan mediante el control de promotores específicos. Los genes retrovirales de expresión se encuentran mediante el control de reguladores de transcripción virales, que se denominan LTR's (long terminal repeats) o repetidores largos terminales, que flanquean el final del genoma (río arriba 5' y río abajo 3'). Estas regiones reguladoras, determinan el tejido donde se replica el virus, el grado de afección y la patogenicidad de diferentes cepas virales.

La capacidad oncogénica de los retrovirus es facilitada por varias características de su ciclo de vida: 1) la infección no es citolítica, lo que permite que la célula sobreviva y adquiera alteraciones genéticas que le serán necesarias para su transformación; 2) la integración del daño del provirus a la integridad del genoma del hospedero, 3) los provirus integrados pueden adquirir genes celulares intactos o dañados, generalmente a expensas de porciones de los genes virales, incorporando las porciones de genoma celular al genoma del virus, 4) la función de los genes celulares pueden verse afectados por los retrovirus.

Los retrovirus oncogénicos pueden producir tumores por lo menos por dos mecanismos, y los virus se dividen en familias, basadas en como infectan a las células para convertirlas en neoplásicas.

Los retrovirus de traducción son capaces de transformar a las células infectadas de manera eficiente y rápida. Estos virus derivan de una rara recombinación del DNA proviral y el material genético del hospedero. Tienen un genoma híbrido compuesto de porciones del genoma viral,

con la adición de un oncogén celular traducido (v-onc). La mayoría de los virus han perdido parte del genoma viral durante la incorporación del oncogén, y como resultado, la mayoría de estos virus no se pueden replicar por ellos mismos.

Un segundo grupo de retrovirus oncogénicos se designan retrovirus de activación cis-. Estos virus no contienen un oncogén. Durante la integración proviral de estos virus pueden insertar de sus elementos de la región LTR, un poderoso regulador de transcripción viral, cerca de los oncogénos celulares y activarlos en un proceso que se denomina inserción y cis-activación. Los tumores producidos por los retrovirus de cis-activación se desarrollan en un periodo mucho mayor, comparado con aquellos que se desarrollan de los virus de traducción.

Hay varias familias de virus DNA oncogénicos, incluyendo los herpesvirus, papovavirus (incluyendo los papilomavirus y los poliomavirus), los adenovirus, hepadnavirus y poxvirus. Hay varias características comunes entre los diversos grupos de virus DNA oncogénicos. Los genes de los virus DNA involucrados en la oncogénesis son esenciales para el ciclo de vida normal de los virus.

En el ciclo de vida normal de virus DNA que ha infectado a una célula permisiva (una que soporta la replicación viral completa), los genes se expresan desde las etapas tempranas, hasta las etapas tardías de la infección. Los genes de las etapas tempranas generalmente son responsables de subvertir el control de la célula para permitir la replicación viral. Algunos de estos genes codifican para proteínas multifuncionales que interactúan con los genes celulares y son responsables de bloquear las vías de apoptosis o de afectar la regulación de los mecanismos de replicación celular. Una vez que la progenie viral ha madurado, las células afectadas se lisan, y las partículas virales se liberan como resultado de la expresión de los genes tardíos. Dado que las células infectadas se destruyen como parte del ciclo de vida viral, esto imposibilita la posibilidad de transformación de las células. En los casos poco comunes de infecciones aberrantes de células permisivas o de infecciones a células no permisivas o semi-permisivas, generalmente solo una parte del ciclo de vida viral se completa, y la progenie celular es no-viral. En estas circunstancias, una parte del genoma viral, se integra al DNA celular. Si la porción que se integró contiene genes tempranos, las proteínas codificadas pueden ocasionar que se pierda el control del crecimiento celular. Hay varios virus DNA, cuyos genes tempranos codifican para proteínas celulares como Rb y p53, que están involucradas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. Y puesto que no se expresan los genes tardíos, estas células no se lisan, por lo que pueden sobrevivir, ocasionando un alto riesgo de desarrollar células neoplásicas.

En humanos se han descrito varias cepas de papilomavirus asociados a neoplasias epiteliales malignas, como el Carcinoma de Células Escamosas.

2.3.2 Químicos

Hay una gran variedad de químicos que se mencionan pueden ser responsables de una gran proporción de los vastos factores que originan al cáncer. Algunos de estos agentes son:

- 1) Hidrocarburos policíclicos aromáticos.
- 2) Nitrosaminas, que se pueden formar de *novo* en el estómago a partir de ciertas fuentes alimentarias
- 3) Aminas aromáticas y colorantes azo.
- 4) Formaldehído.
- 5) Una amplia variedad de compuestos naturales, se ha demostrado efecto carcinogénicos, como las micotoxinas. La Aflatoxina B1 es un contaminante de cereales como el trigo y los cacahuates.

De hecho se considera que existen más de 50,000 productos químicos de uso frecuente en la industria en general y de estos alrededor del 4% se tiene información de consecuencias por exposición, y de estos productos conocidos alrededor del 60% tienen probados efectos tóxicos, muchos de ellos cancerígenos. Lo que indica que existe una gran cantidad de agentes desconocidos que requieren de estudios posteriores, como el papel de los contaminantes ambientales en el desarrollo del cáncer.

El proceso de carcinogénesis se puede dividir en dos fases principales: Iniciación y promoción. Las células iniciadas tienen gran posibilidad de volverse malignas, pero la iniciación por sí misma es insuficiente para producir un tumor. Generalmente una breve exposición a un iniciador, no es suficiente para desarrollar mutaciones entre los químicos y los nucleótidos del DNA. La iniciación se da en dos pasos: Seguimiento del daño genético inicial y una replicación, se requiere de una fijación de la mutación en los genes del cambio permanente.

Los Químicos que sirven como iniciadores son reactivos altamente electrófilos, moléculas que forman enlaces covalentes con blancos ricos en electrones (nucleótidos) como el DNA, el RNA y las proteínas. Por lo tanto la mayoría de los iniciadores químicos son mutagénicos.

2.3.3 Radiaciones

Las radiaciones se pueden dividir en dos grandes categorías:

La primera son las radiaciones ionizantes, producidas por diferentes isotipos que emiten rayos gamma o partículas radiadas (partículas alfa y beta) y la segunda categoría son las radiaciones ultravioleta (UV).

Las radiaciones ionizantes pueden dañar el DNA de dos maneras: El daño directo al DNA ocurre al interactuar las radiaciones ionizantes con las moléculas del DNA y se alteran las bases individuales o se induce el rompimiento de la cadena de DNA. El daño indirecto al DNA ocurre de las radiaciones al agua celular y la subsecuente transferencia de energía del agua al DNA.

Las radiaciones ionizantes han demostrado producir una gran variedad de neoplasias en los perros. Las radiaciones gamma en perros jóvenes incrementan el riesgo a tumores mesenquimales y epiteliales en la vida adulta. El plutonio 239 inhalado se ha demostrado que induce neoplasias pulmonares en perros.

La radiación UV puede dañar a las células de la piel mediante la formación de dímeros en el ADN entre residuos de pirimidina adyacentes y puede originar mutaciones que se van

acumulando con el tiempo. La célula puede responder a este daño reparando el ADN para evitar mutaciones dañinas o, si el cambio es demasiado grande, induciendo la apoptosis para eliminar la célula potencialmente cancerosa. Además, la radiación UV parece disminuir las funciones del sistema inmunológico en la piel, creando un ambiente favorable para el desarrollo y crecimiento de tumores. Los individuos inmunodeprimidos tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de piel no melánico, (carcinomas de células escamosas, epitelomas basocelulares, tumores cutáneos asociados a virus y queratoacantomas), en piel expuesta a la radiación solar.

El mecanismo de acción de la radiación UV está relacionado con la pérdida de la capacidad de las células epidérmicas para controlar la proliferación celular.

2.4 Cáncer Familiar

De todos los tipos de cáncer conocidos, solo una pequeña parte de estos, del 1 al 6% tienen carácter familiar o hereditario, esto es debido a que las alteraciones presentes en el genoma del individuo, pueden pasar a su progenie. Para determinar el carácter familiar de un tumor, es necesario realizar una investigación precisa de la historia de la familia, la correcta identificación de los miembros afectados, ya que la presentación del cáncer es consecuencia de mutaciones germinales en genes concretos que incrementan la susceptibilidad a padecer cáncer. Esta susceptibilidad se transmite entre los miembros de la familia de acuerdo a distintos patrones de herencia, identificando estas mutaciones en los miembros de la familia, el cáncer se puede prevenir precozmente y prevenir la presentación del tumor. (CNIO 2008)

Es importante recalcar que se hereda la susceptibilidad a padecer cáncer, lo que no implica la certeza de desarrollarlo en todos los casos. En cuanto a los modelos de herencia, según el tipo de cromosoma, la herencia puede ser autosómica, cuando afecta a los autosomas o cromosomas no sexuales, o bien sexual, cuando afecta a alguno de los cromosomas sexuales (como la ligada al cromosoma X). En cuanto al tipo de transmisión existen: la herencia dominante y la herencia recesiva. En la herencia dominante, la existencia de un solo alelo mutado sería suficiente para producir la enfermedad (ej.: poliposis adenomatosa familiar por mutaciones en el gen APC). La herencia recesiva se caracteriza por la necesidad de tener las dos copias alélicas de un gen alteradas para que se manifieste la enfermedad (ej.: anemia de Fanconi por mutaciones en el gen FANCA). La herencia ligada al sexo también puede ser dominante o recesiva, aunque la más común es la herencia recesiva. La herencia ligada al cromosoma Y es más infrecuente que la ligada al cromosoma X por el número de genes que se encuentran en este cromosoma. En la herencia ligada al cromosoma X, todos los hombres portadores serán afectados, mientras que las mujeres serán portadoras como en el síndrome de Duncan por mutaciones en SH2D1A (CNIO 2008).

En cuanto a patrones de herencia atípicos, el mosaicismo genético es una condición inusual que se produce cuando se manifiesta una mutación en una célula somática durante el desarrollo embrionario (ej.: neurofibromatosis tipo 1 por mutaciones en NF1). Otro patrón atípico de herencia lo constituye el fenómeno de 'imprinting' o impronta (materno o paterno)

en el que hay una expresión génica diferencial dependiendo del origen del alelo. Se produce cuando hay una inactivación temprana de uno de los alelos (ej.: paraganglioma familiar por mutaciones en SDHD).

Los casos estudiados de Cáncer familiar, pueden ser de tipo múltiple, es decir de distintos tipos de cáncer, como en el síndrome Li-Fraumeni, o bien con el mismo tipo de cáncer, que van apareciendo en las generaciones y a edades tempranas, y que cuando se ven afectados órganos pares, generalmente son presentaciones bilaterales como en el caso de cáncer de mama/ovario.

En los últimos años se han identificado alrededor de 40 genes implicados en varios síndromes de predisposición hereditaria al cáncer y se han desarrollado técnicas para su estudio y caracterización de sus mutaciones. Actualmente se consideran varios tipos de cáncer como enfermedades hereditarias o familiares, como el linfoma de Burkitt, la leucemia mieloide crónica, el cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, retinoblastoma entre muchos otros descritos principalmente en humanos.

En familias con cáncer hereditario es común observar varios casos de cáncer, habitualmente el mismo tipo de cáncer, que van apareciendo en una generación y en la siguiente, que ocurren a edades tempranas (en los síndromes más comunes, mama/ovario en mujeres y cáncer colorrectal, la edad de presentación es alrededor de los 40 y 50 años), y cuando afecta a órganos pares, la presentación tiende a ser bilateral (mamas riñones, etc.). Son familias en las que también aparecen individuos que han tenido más de un tumor primario, o que además del cáncer presentan defectos del desarrollo. Sin embargo estas presentaciones son poco frecuentes en humanos y más aún en veterinaria, principalmente debido al hecho de que es necesario realizar un rastreo de la presentación en varias generaciones de la familia.

2.5. Cáncer en Localización naso-sinusal

Los tumores localizados en cavidad nasal representan del 0.8 al 1% de los tumores caninos, y alrededor del 82% son malignos y de estos, el 60% son carcinomas, siendo el otro 40% de origen mesenquimal u otro origen. Si se encuentran localizados internamente dificultan o imposibilitan su remoción quirúrgica. De los tumores malignos, en humanos los que predominan son los carcinomas de células escamosas queratinizados o no queratinizados, aunque esta región anatómica se observan varios tipos de neoplasias malignas de distintas histiogénesis, que se agrupan como neoplasias malignas indiferenciadas, las cuales comparten las características de agresividad y de resultar generalmente fatales (Wenig 2009). Se ha establecido un rol causal en la exposición al polvo de madera en los estudios epidemiológicos de cáncer sino-nasal, sin embargo los mecanismos de la carcinogénesis se desconocen. Sin embargo se ha demostrado un incremento de COX-2 en estas neoplasias, y las señales que activan COX-2 también inducen supresión de p53, considerado un factor de transcripción central en la respuesta celular en los carcinomas de células escamosas, lo que sugiere un rol importante de los componentes inflamatorios en la carcinogénesis de este proceso tumoral (Reetta 2008).

En caninos las neoplasias malignas más frecuentes en esta localización son los adenocarcinomas con una incidencia del 53%, y el CCE tiene una incidencia del 15%. La edad de presentación de neoplasias en esta localización es entre 10 y 15 años. Así mismo en perros de razas dolicocefálicas (hocicos largos) tienen mayor riesgo a presentar estas neoplasias que en mesacefálicas (hocicos medios) o braquicefálicas (hocicos cortos). Dentro de las razas de perros que se pueden encontrar afectadas con mayor frecuencia son: Airdale terrier, basset hound, Viejo pastor inglés, terrier escocés, collie, pastor de shetland y pointer alemán pelo corto (Meuten 2002, Hayes 1982).

La mayoría de los tumores epiteliales de cavidad nasal, derivan generalmente del epitelio en sí, el cual en la zona rostral es estratificado, escamoso y no queratinizado; en la región central, se separa del escamoso con una zona de transición con epitelio pseudoestratificado, columnar alto y epitelio secretor, sin cilios. Sin embargo se observan también neoplasias de las glándulas mucosecretoras, las cuales originan adenomas o adenocarcinomas. Mientras que los patrones de las neoplasias epiteliales reflejan similitudes con la morfología normal del epitelio, su presentación no necesariamente implica el sitio de origen, ya que se ha observado una considerable plasticidad en la diferenciación del epitelio no-neoplásico ante los estímulos (Wilson 2002). Las estructuras presentes en la cavidad nasal, presentan un efecto importante en el flujo de aire, y como consecuencia en el sitio donde se depositan las partículas que fluyen en el aire a través de estos conductos aéreos. El doblamiento de las narinas, es el principal sitio de deposición de las partículas más grandes, en el perro este sitio es extremadamente complejo y presenta cámaras con membranas muy delgadas. Debido a esta naturaleza compleja y membranosa esta región en los perros, es el sitio más efectivo para remover la mayor cantidad de partículas que penetran por las narinas. De la misma forma, las turbinas presentan una superficie muy grande en esta especie, y es el área encargada de absorber los gases solubles (Reznik 2000).

2.5.1 Carcinógenos relacionados

Uno de los agentes etiológicos más frecuentemente asociado a las neoplasias de piel, es la radiación UV, asociado al daño en las células epidérmicas para controlar la proliferación celular. Sin embargo hay varios segmentos del sistema respiratorio que manifiestan diferentes patrones de susceptibilidad para un carcinógeno dado. Recientemente se han asociado un número importante de agentes químicos, los cuales han desarrollado lesiones preneoplásicas y neoplásicas en la región nasal. Algunos de estos son agentes alquilantes y acidificantes, así como aldehídos, tales como el Dimetilcarbamoil cloruro (DMCC- (C₃H₆ONCl), epiclorhidrina (ECH), Bis(clrometil)eter (BCME) y el formaldehído (HCHO) (Reznik 2000).

También se ha encontrado una asociación del ACEcn, en trabajadores expuestos por periodos prolongados al polvo proveniente de la madera, el cual aparentemente activa una vía diferente a la activada por la exposición constante al humo del tabaco (Ariza 2003, Reetta 2008).

CAPITULO III.

LOBO GRIS MEXICANO

3.1 La situación del Lobo Gris Mexicano

El lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) es la subespecie genéticamente más distintiva de lobo gris presente en Norteamérica. El hábitat del Lobo Mexicano se extendía desde el Desierto de Sonora, Chihuahua y centro de México, hasta el oeste de Texas, sur de Nuevo México y Arizona central. Ocuparon un rango de hábitats muy amplio, desde zonas desérticas y semiáridas hasta bosques templados. Al llegar el siglo XX, el empleo de las tierras que el lobo habitaba fueron utilizadas con fines de ganadería, lo que ocasionó la reducción de sus presas naturales como los ciervos, además la introducción de nuevas especies domésticas como bovinos. Cambios que causaron que los lobos atacaran al ganado, situación que produjo la caza desmedida de ganaderos, así como agresivas campañas de exterminio por parte de agencias gubernamentales de los Estados Unidos y campañas federales del gobierno Mexicano. Estos esfuerzos dieron resultados, y por la década de los 50's, el Lobo Mexicano había sido casi eliminado en estado salvaje. En 1976, el Lobo Mexicano fue declarado una especie amenazada, y en 1980 menos de 50 lobos mexicanos se observaron libres en pequeños grupos aislados en cuatro estados de México (Fredrickson 2007). Desde entonces en los estudios de campo realizados en México, no se han observado más ejemplares, actualmente el lobo se considera extinto en estado salvaje (**EW**) (IUCN 2006). Entre 1977 y 1982 se inicia el plan de recuperación, organizado por el Servicio Americano de Pesca y Fauna Silvestre (United States Fish and Wildlife Services USFWS). Primero los gobiernos Americano y Mexicano accedieron a establecer un programa binacional de cría en cautiverio para la recuperación del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) con varios lobos que se encontraban en cautiverio, capturados entre 1977 y 1980. El propósito del programa es salvar a la especie de la extinción absoluta y proveer animales que puedan ser reintroducidos a la vida silvestre (USFWS, Mexican Gray Wolf Recovery Program 1987).

Todos los lobos mexicanos que se encuentran vivos en cautiverio provienen de tres líneas genéticas: Linaje Certificado / McBride; linaje Ghost Ranch/ Sonora Desert Museum- Ghost Ranch; y Linaje Aragón. Estos linajes se fundaron entre 1961 y 1980 de un total de 7 individuos (Hedrick et al 1997). Cada linaje se había manejado de manera independiente hasta 1995, cuando los linajes Aragón y Ghost Ranch se comenzaron a introducir al linaje McBride gracias a la evaluación genética realizada de las tres líneas de lobos. Estos estudios genéticos, confirmaron la pureza de las tres líneas, (no se encontró evidencia de ancestros de otros canidos -perros o coyotes-) además que se identificaron tres fundadores del linaje McBride y no cuatro como se suponía hasta entonces (Hedrick P, et al 1997).

Estudios realizados en 1999 en la línea genética McBride del lobo mexicano demostraban que no se observaban efectos de depresión por endogamia, evaluando sobrevivencia de juveniles y tamaño de la camada (Hedrick & Miller 1999). En el 2002 se evalúa el tamaño corporal de los individuos de lobo mexicano comparando individuos en cautiverio con individuos en vida libre y analizando las diferencias entre los individuos con mayor o menor índice de consanguinidad

entre ejemplares cautivos. De manera que se observaron menores tamaños corporales en los cautivos a diferencia de aquellos en vida libre, así como se observó que disminuía el tamaño corporal en aquellos que presentaban mayor consanguinidad (Fredrickson 2002). Y se demostró que la cruce de las tres líneas genéticas, aunque endogámicas entre sí, tuvieron un efecto de rescate genético en la población (Fredrickson 2007).

A pesar del esfuerzo que ha implicado el llevar a cabo el Programa Binacional de Reproducción en Cautiverio del Lobo Gris mexicano, el cual es un buen ejemplo del éxito en el uso del análisis científico en el manejo de poblaciones cautivas, que ha logrado conjuntar diversos especialistas, investigadores de campo, científicos, clínicos, cuidadores y trabajadores de un gran número de instituciones zoológicas, reservas, etc en los dos países (Hedrick 2008). A últimas fechas se empieza a poner de manifiesto los efectos detrimentales en relación a baja en calidad reproductiva en los individuos de la población. Se ha documentado que se observa una mejor calidad espermática y por lo tanto un mayor éxito reproductivo en los individuos F1 de la cruce de los distintos linajes, por sobre aquellos endogámicos de un mismo linaje. Además de observarse que hay una drástica disminución en el mismo parámetro evaluado en individuos productos de retrocruzas (Asa 2007).

Esto se ha asociado a la pérdida de diversidad genética mencionada por la reducción de la población, sumándose el efecto detrimental del entrecruzamiento observándose los efectos mencionados previamente para este fenómeno: decremento del éxito reproductivo, -evaluado en tamaño y número de camadas- los cuales han sido documentados. Los otros dos fenómenos asociados a este proceso, la carga alta de alelos deletéreos fijados, y el mal funcionamiento del sistema inmunitario pueden estar involucrados en el tema de esta investigación, la presentación de una neoplasia que denota un claro patrón de herencia, aparentemente dominante.

Una parte importante en este estudio integral, relacionado con la conservación de especies, es el que se realiza por la Genética de Conservación. La degradación del medio ocasiona que se pierdan especies vegetales y animales, la pérdida de individuos, incluso poblaciones completas, genera disminución en la variabilidad genética, se propicia la endogamia, lo que incrementa las características deletéreas en las especies, volviéndolos cada vez más susceptibles a un medio cada vez más degradado (Munson 1993). Al detectarse enfermedades que afectan a especies amenazadas y protegidas, estas pueden afectar la conservación de las mismas, al reducir el éxito reproductivo, alterar la dinámica poblacional o directa o indirectamente ocasionando que la población decline (McAloose 2009). El diagnóstico de cáncer en fauna silvestre, se detecta la mayoría de las veces durante la inspección post-mortem, confirmado por estudios histopatológicos. Las técnicas diagnósticas modernas empleadas en humanos, no están disponibles para el diagnóstico oportuno en fauna silvestre, ya que los recursos humanos y financieros son muy limitados. Hasta el momento existe solo un caso documentado donde la alta incidencia de cáncer amenaza a una especie con su extinción, la enfermedad del tumor facial del demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), el marsupial carnívoro más grande que existe, la enfermedad es considerada un cáncer infeccioso, donde la reducción del polimorfismo genético ha sido un causa importante en la baja respuesta inmune contra el mismo (McAloose, McCallum 2008).

Los grandes carnívoros están sujetos a mayor riesgo de extinción, además de la presión ejercida por su talla, por mantener poblaciones numéricamente bajas, por contar con tasas reproductivas bajas y por hallarse en los escalones superiores de la cadena trófica, han sido perseguidos por la competencia con el hombre, cazados hasta su exterminio, así las presiones antropogénicas y el aislamiento genético hacen que se pierdan especies como el Tilacino o Tigre de Tasmania (*Thylacinus cynocephalus*), y en territorio nacional el oso pardo mexicano (*Ursus arctos nelsoni/ Ursus arctos horribilis*) extinto en 1964, o el lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), que habitaba en el Sur de los Estados Unidos y casi hasta la región centro del territorio nacional, hasta 1980 (Purvis 2000, IUCN 2008).

Hasta hace relativamente poco tiempo se reconoce la importancia de los grandes carnívoros en los ecosistemas que participaban, y actualmente se ha determinado que protegiendo los grandes carnívoros, se ayuda a conservar todas las especies que dependen de su supervivencia, por lo que son parte aguas en el proceso de conservación.

3.2 Pérdida de Biodiversidad

Entendemos por Biodiversidad el número de especies vivas y de los ecosistemas que les sirven de soporte (Secretaria de Convenio sobre la diversidad biológica 2004). Una gran cantidad de especies, tanto vegetales como animales, se pierden debido a los cambios directos en los ecosistemas o por depredación de un recurso del cual dependen, a este proceso se le denomina pérdida de Biodiversidad. Estudios realizados en los últimos años demuestran que las actividades antropogénicas, como el desarrollo de las sociedades modernas urbanizadas, las prácticas agrícolas y ganaderas intensivas, la deforestación, pesquería, como las principales entre otras, han ocasionado la contracción de los ecosistemas, la pérdida de bosques tropicales, la pérdida de diversidad biológica y el cambio climático. Como resultado se han desestabilizado el funcionamiento y estructura de los ecosistemas, perdiendo los servicios ecológicos indispensables para el mantenimiento de la vida y se ha comprometido la salud de diferentes especies animales y vegetales (Heikinnen 2004, Rapport 1998, McMichael 1998, Fahrig 2003, Patz 2004). En los últimos años, se han reportado innumerables enfermedades emergentes y re-emergentes, las cuales representan un problema global de gran magnitud que afecta a poblaciones humanas, animales domésticos y silvestres.

Las selvas tropicales representan al menos el 50% de la biodiversidad global, actualmente se considera como la mayor causa de pérdida de biodiversidad, la deforestación realizada para el desarrollo de actividades ganaderas y agrícolas, y la pérdida de selvas tropicales por deforestación es aproximadamente 0.8% anual, y se estima que se pierden alrededor de 14000 especies por año. De 1980 a 1990 alrededor del 40% de las selvas tropicales se han transformado por actividades ganaderas y agrícolas, lo que origina además de la pérdida directa de hábitat, la fragmentación del hábitat remanente, que origina lo que se denomina "parches o islas de hábitat de vida libre". Muchas de las especies que se encuentran en estos parches, sufren pérdida de diversidad genética y se ha postulado también que se encuentran más predispuestos a un mayor número de enfermedades, principalmente infecciosas (Greer 2008, Grenfell 1997, Patz 2004, Hess 1993).

Según la Unión Mundial para la Naturaleza -IUCN por sus siglas en inglés-, la autoridad máxima en especies amenazadas, de un total de 1,589,381 especies revisadas, el 39% de estas se

encuentran amenazadas y se estima que se pierden alrededor de 14000 especies por año (IUCN 2007 Groombridge 1992, Mitchell 2002, Bronson 2007, Mc Calllum 2002, Fahrig 2003).

3.3 Presentación de Enfermedades asociadas a Pérdida de Biodiversidad

Todos los factores previamente mencionados, originan la crisis ambiental que vivimos actualmente y que como numerosos estudios han demostrado, es la causante de la emergencia de nuevas enfermedades, que en las últimas tres décadas se han presentado como brotes emergentes y re-emergentes en todo el mundo originados por virus, priones y diferentes patógenos. Se ha estimado que más de 13 millones de personas mueren anualmente por enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes en todo el mundo (OPS, 2002) y que más de la mitad son zoonosis, y la mayoría son originadas por animales silvestres o cepas de patógenos resistentes a antibióticos, o algunos que aun a pesar de su presencia histórica en la humanidad han aumentado su incidencia (Daszak 2004, Daszak 2007, Dobson 2001, Patz 2004, Taylor 2001, Jones 2008).

El riesgo se incrementa y se potencializa por la industria, la agricultura y el comercio (Aguirre 2002). Ya que el cambio en el uso del suelo ocasionado principalmente con estos objetivos, son los factores que originan la presencia de los brotes, ya sea por la introducción de nuevos hospederos, agentes, o la modificación de la transmisión de infecciones endémicas (Patz 2004).

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE's) pueden ocurrir por salto taxonómico o simplemente por transmisión interespecies por ampliación del rango geográfico para su diseminación en nuevos hábitats. Según Taylor et al. 2001, alrededor del 61% de las enfermedades emergentes son zoonóticas y más del 75% de estas están ligadas a fauna silvestre, ya que se ha observado que la mayoría de los agentes infecciosos pueden tener una amplia variedad de hospederos más del 60% de los agentes que afectan al humano, más del 68% de primates silvestres y más de 90% de animales domésticos (Fenton 2005). Aun cuando la expectativa de vida en las naciones del primer mundo está aumentando, gracias a los avances tecnológicos en cuidados de la salud, la mejora de las condiciones higiénicas y la alimentación, se observa un debilitamiento en las defensas contra enfermedades ancestrales, tales como la malaria, cólera, dengue y la tuberculosis (Taylor 2001, Michael 2004, Aguirre 2002) y hay una gran discusión respecto a los mecanismos subyacentes de las re-emergencias de estas enfermedades. Numerosos estudios han demostrado que el mantener una variada diversidad o riqueza de especies, actúa como estabilizador del ecosistema, proporcionándole protección contra patógenos, tanto por efecto de dilución, disminuyendo la probabilidad de contagio de patógenos con el hospedero susceptible, como disminución en la severidad de las infecciones presentes (Mitchell 2002, Combes 1996).

La emergencia y reemergencia de enfermedades presentan nuevos retos para las disciplinas tradicionales de las ciencias de la salud. Por lo que este escenario ha propiciado la emergencia de nuevas disciplinas como ecología de enfermedades infecciosas, medicina de la conservación, salud ecosistémica y patología ecosistémica entre otras para enfrentar los nuevos retos epidemiológicos de manera multidisciplinaria. De manera que estas nuevas disciplinas postulan que para atender las necesidades ocasionadas por las enfermedades

emergentes se deben atender los retos de salud, en la interfaz de la ecología, la salud pública y la salud de la vida silvestre (Aguirre, et al. 2002). Y buscan llevar conceptos de salud, medicina y ecología a la conservación de especies, siendo la meta principal de la Medicina de Conservación, lograr la salud ecológica, y por extensión la salud del ecosistema y sus habitantes (Else J., Pokras M. 2002).

3.4 Pérdida de Diversidad Genética derivada de la Pérdida de Biodiversidad

La transformación de los ecosistemas sufrida por actividades antropogénicas, origina la pérdida directa del hábitat y la fragmentación del hábitat remanente, la cual es considerada como la mayor causa de pérdida de biodiversidad. La fragmentación de los ecosistemas, ocasionan cambios en la estructura del paisaje, lo que conlleva cambios en la distribución y abundancia de plantas, que afectan negativamente en la calidad del hábitat, lo que puede resultar en extinción de poblaciones silvestres, y esta es un indicador sensible de la pérdida de capital biológico, ya que muchas de las especies que han perdido una gran cantidad de su población en un determinado nicho, altera el ecosistema, y reducen la capacidad del mismo de proporcionar sus servicios ecológicos (Ceballos, Ehrlich 2002, Ostfeld 2003, Arroyo-Rodríguez 2006, Arroyo-Rodríguez 2007).

La extinción de las especies en todo el mundo, se ha concentrado tanto en las áreas de mayor población humana, como en aquellas afectadas por el impacto del hombre con actividades como agricultura intensiva, ganadería y caza. De las especies conocidas de mamíferos, alrededor de 4650, alrededor del 22% se encuentran actualmente amenazadas y aproximadamente el 4% de estas ha disminuido su presencia considerablemente en sus hábitats naturales (Ceballos 2002, Ehrlich 2002, IUCN 2007).

Encontramos numerosos ejemplos de especies de mamíferos, que son las especies más estudiadas, originadas de pocos fundadores, que se considera que cuentan con limitados recursos genéticos, debido a la poca variabilidad del genoma. Podemos considerar Variabilidad Genética como sinónimo de Heterocigocidad, la cual se puede definir como el número total de alelos de una población que codifica para una determinada proteína. El que existan múltiples genes que codifiquen para una proteína, le brinda al genoma de la especie, aunque no necesariamente al individuo, la capacidad para adaptarse al medio ambiente. Por lo que la Heterogeneidad, o polimorfismo de una población es una medida de la diversidad genética de esta, por lo que al reducirse drásticamente la población, se pierden alelos únicos al morir los individuos, o por la endogamia resultante de los individuos que sobreviven, esto ocasiona la pérdida de diversidad genética. Esta puede tener tres efectos detrimentales principales: una carga alta de alelos deletéreos fijados, malfuncionamiento del sistema inmunitario y decremento del éxito reproductivo, todos los cuales además de los efectos de la endogamia de estas poblaciones pone en riesgo la sobrevivencia de la especie (Munson 1997).

Hay algunas especies que han sufrido de pérdida de heterocigocidad por la especialización que han sufrido en su nicho ecológico, como el guepardo (*Acinonyx jubatus*) y la nutria de río (*Lutra canadensis*); los alelos que les resultaron beneficiosos en una situación en particular, no les ayudan a confrontar los cambios posteriores del medio (Munson 1997). Sin embargo, el resto

de los ejemplos documentados, se observan alteraciones asociadas a la pérdida de diversidad genética generalmente asociados a los factores antropogénicos descritos (McAloose2009). Podemos encontrar patrones comunes en especies amenazadas que habitaban amplias extensiones geográficas y que debido a la fragmentación del hábitat se aislaron unas de otras, como el caso de Vicuñas en Perú, donde se ha observado que las poblaciones presentan bajos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones, pero esta especie cuenta con varias poblaciones dispersas y estas presentan altos niveles de diferenciación entre ellas, por lo que la cruza entre estas tendría un efecto de rescate genético de la especie (Wheeler 2001). Hay varios ejemplos de especies que presentan efectos detrimentales genéticos asociado a la pérdida de diversidad como el cerdo salvaje europeo (*Sus scrofa*), el búfalo sudafricano, las ardillas rojas, entre otras. Hay varias especies o subespecies extintas en estado salvaje, que se preservan en poblaciones cautivas. Un caso muy completo de este tipo, es el del hurón de patas negras (*Mustela nigripes*), especie que se consideraba extinta hasta 1981, cuando después de intensas búsquedas se localizó una colonia de alrededor de 100 individuos en Wyoming, los cuales se vieron diezmados por una epidemia del virus de moquillo canino, hasta casi acabar nuevamente con la población y la esperanza de sobrevivir de esta especie. Se decidió entonces capturar a los pocos individuos sobrevivientes y se comenzó su reproducción en cautiverio con 18 individuos, de los cuales solo 7 son fundadores de la población actual. La población se fue restableciendo lentamente y los estudios asocian varios procesos infecciosos que han afectado a la población, a la baja inmunidad por la endogamia, como es el caso de la infección por el virus del distemper canino, que volvió a afectar a los individuos en cautiverio, hasta casi terminar con la población nuevamente. También se ha asociado la presentación de plaga, transmitida por su presa principal –el perrito de las praderas (*Cynomys ludovicianus*)-. Algunos defectos congénitos descritos en la población son fusión de vértebras coccígeas, malformación del xifoides y criptorquidismo. Y asociados al decremento reproductivo se ha asociado baja calidad espermática. Sin embargo se ha logrado una reintroducción exitosa de la especie en 7 sitios en Estados Unidos y uno en México, y para el 2007 se consideraban 7.5 generaciones en Vida libre (Pacheco 2002, Bronson 2007, Greiner 2007).

Generalmente se han utilizado como unidades de medida para evaluar los efectos del desempeño de poblaciones cautivas de especies amenazadas: la sobrevivencia juvenil y posteriormente medidas de desempeño reproductivo como: tamaño de camada. Sin embargo, se propone utilizar también el tamaño corporal como indicador potencial del fenotipo, debido a lo confuso que puede resultar el análisis de los indicadores previamente mencionados como aumento en sobrevivencia de juveniles, y tamaño de camada (Fredrickson 2002).

3.5 Pérdida de Biodiversidad en México.

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, su territorio representa el 1.6% de la superficie terrestre, se encuentran representados aproximadamente el 10% de todas las especies vivas del mundo, muchas de las cuales son endémicas (Ceballos 2002). Se estima que el 77% del territorio nacional está dedicado a actividades ganaderas y agrícolas, que en los últimos 50 años han aumentando 220% la superficie destinada a ganadería y debido a esto, aproximadamente el 90% de los mamíferos de México han perdido gran parte de su hábitat, lo que ha ocasionado que se encuentran en gran riesgo de extinción o incluso se han extinto (Ceballos 2002).

CAPITULO IV.

HIPÓTESIS

La susceptibilidad al Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en lobo gris mexicano está relacionada con alteraciones cromosómicas y/o genéticas con un patrón de herencia autonómico dominante.

JUSTIFICACIÓN

El lobo gris mexicano es una especie amenazada en peligro de extinción, la cual cuenta con una población endogámica en cautiverio, a partir de la cual se pretende lograr la reintroducción de la especie a la vida silvestre, en hábitats protegidos y donde se ha realizado un trabajo de concientización a los habitantes de la importancia de la especie en el ecosistema.

Para garantizar la viabilidad del proyecto de Reintroducción, así como la sobrevivencia de la especie, se realizan continuamente estudios en la población. Y se ha detectado una incidencia anormal en el desarrollo de algunas neoplasias, las cuales parecen presentar una vía vertical de herencia.

Es por lo tanto muy importante caracterizar genéticamente las neoplasias que se presenten en la población, y como se están segregando las alteraciones genéticas asociadas a estas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar alteraciones cromosómicas y genéticas presentes en neoplasias del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*).

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la importancia de la presentación de neoplasias en el lobo gris mexicano.

Caracterizar morfológicamente diversas neoplasias presentes en lobo gris mexicano.

Descartar por microscopía electrónica de transmisión la presencia de elementos virales en neoplasias.

Comparar cariotipo de perro doméstico con el cariotipo del lobo gris mexicano.

Comparar genes específicos de perro doméstico y lobo gris mexicano.

Determinar si existen alteraciones cromosómicas en las distintas neoplasias presentes en ejemplares de lobo mexicano.

Determinar mutaciones en genes específicos relacionados con el desarrollo de las neoplasias presentes en el lobo gris mexicano.

Co-relacionar las mutaciones encontradas con su expresión celular por inmunohistoquímica.

CAPITULO V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño de estudio.

Este trabajo es un estudio observacional descriptivo transversal.

Sujetos

Para el estudio de neoplasias presentes en lobo gris mexicano, se realizó una búsqueda de la información de causa de muerte de los lobos, desde el inicio del programa de Conservación de la Especie, hasta la información generada en el 2010.

Se analizaron muestras de sangre periférica y de tejidos frescos y fijados, así como DNA de cuatro perros domésticos (labrador, bulldog inglés, schnauzer y mestizo) y de once lobos grises mexicanos, -ocho machos y tres hembras- procedentes de diferentes instituciones nacionales.

5.2. Análisis de Incidencia de Neoplasias en Lobo Gris Mexicano.

Para el estudio de la Incidencia de neoplasias presentes en lobo gris mexicano, se realizó una búsqueda de la información de causa de muerte de los lobos, de los tres linajes, obteniéndose información desde el inicio del programa de Conservación de la Especie, hasta la generada en el 2010. La información se obtuvo tanto de registros médicos, protocolos de necropsia, la información de los Registros históricos (Siminsky 2005, 2007, 2008, 2009), así como a partir de la información directa con los responsables de las instituciones que albergaban a los lobos en distintas instituciones, tanto en México como en Estados Unidos.

5.2.1 Análisis Estadístico para la fijación de un gen mutado en la población.

Para evaluar el número de generaciones promedio para que se fije un gen mutado en la población se realizó un ensayo de simulación basado en el modelo propuesto por Kimura (1969). Considerando una población diploide de N individuos, con una varianza efectiva N_e —el número de individuos con habilidad para reproducirse y dejar descendencia en la población—. p es la frecuencia del gen mutante (A_2), de manera que $1-p$ representa la frecuencia de su alelo (A_1). Cuando $u(p,t)$ es la probabilidad de que el alelo mutante A_2 se fije en la t generación, dada una frecuencia p en un principio.

$$T_1(p) = \int_0^{\infty} \frac{U(p,t)}{T} dt$$

De manera tal, que el número medio de generaciones hasta que se fije un gen es:

$$\bar{t}_1(p) = \frac{1}{p} \left\{ 4N_e (1-p) \log_e (1-p) \right\}$$

El límite de $p \rightarrow 0$, tenemos $\bar{t}_1(0) = 4N_e$

5.3. Metodología.

5.3.1. Evaluación Morfo-patológica.

Estudio Histopatológico.

Las muestras de neoplasias se fijaron en formol al 10% durante 24 horas o más, o en solución de Schulz, (alcohol 70%, glicerina 20% y agua destilada 10%), y se realizaba cambio de medio a las 24 hrs y posteriormente se incluían en parafina, sin pasar por formol. Todas se procesaban en histoquinet (LEICA 1020. Alemania) y se cortaban en micrótopo (LEICA RM 215 RT. Alemania) a 5 μ , y se teñían con Hematoxilina- Eosina (MERCK TM) para su estudio microscópico.

Estudio Ultraestructural.

Las muestras se fijaron gluteraldehído 2.5% con buffer de cacodilatos, o se tomaron de bloques de parafina. Y se realizaron los cortes ultrafinos para su observación en el microscopio electrónico (ZEISS, ME900, Alemania).

Estudio Inmunohistoquímico.

Se realizó Inmunohistoquímica para c-Myc, a muestras de neoplasias en parafina fijadas con formol o solución de Schulz. Se colocaban en laminillas sialinizadas (Invitrogen) desparafinadas. Se aplicaba la primera solución bloqueadora (H₂O₂ 11% en metanol) 5 minutos a temperatura ambiente, y 5 minutos en solución de TRIS, solución amortiguadora de citratos, calentadas 5 minutos en horno de microondas (Alto) y se incluían en solución amortiguadora de citratos frío. Pasaban 5 minutos en agua destilada dos veces, a TRIS por 5 minutos. A la segunda solución bloqueadora (60 μ l de leche SVELTY), se incubaban en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, y pasaban 5 minutos en solución TRIS. Se decantaba la solución y se agregaban 60 μ l de la tercera solución bloqueadora (Sol A AVIDIN SOLUTION y Sol B d BIOTIN SOLUTION. ZYMED) donde se incubaban 15 minutos en cámara húmeda a 37°C, y pasaban 5 minutos en solución TRIS. Posteriormente se agregaban 60 μ l del Anticuerpo primario (Purified anti c-Myc 9E10 SC-40 mouse monoclonal IgG1, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) y se incubaban en cámara húmeda 30 minutos a 37°C, pasaban a solución TRIS 5 minutos. Se adicionaba el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón y se incubaban en cámara húmeda a 37°C 20 minutos, y lavadas en TRIS 5 minutos. Se agregaban 60 μ l del conjugado enzimático con estreptoavidina (2 ENZYME CONJUGATE ZYMED/HRP- Streptavidin), incubándose en cámara húmeda a 37°C 20 minutos, a TRIS 5 minutos. Se decantaba la solución y se revelaban las laminillas aplicando cromógeno (AEC, aminoetilcarbazol), se observaba la reacción del colorante al microscopio y se estableció un tiempo óptimo de 2 minutos de reacción. Se lavaban con agua destilada 5 minutos, se decantaba y se agregaban 60 μ l de hematoxilina hidrosoluble 4 minutos, y se lavaban en agua destilada 5 minutos, se incluían en solución TRIS por 30 segundos y se colocaban en agua destilada y se montaban (GVA-Mount, ZYMED).

5.3.2. Estudios Citogenéticos.

Estudio citogenético con bandas GTG

El estudio de citogenético con bandas GTG en perro doméstico se realizó a partir de sangre heparinizada. Se realizó cultivo de linfocitos de muestras sanguíneas, las que se obtuvieron a partir de punción de vena radial o cefálica con jeringa o directamente con tubo Vacutainer™ heparinizado. Se realizó la técnica de cultivo descrita por Reimann (1999), adicionando Pokeweed (Invitrogen), además de PHA y además de los tiempos de incubación clásicos, se adicionaron dos nuevos tiempos (96 y 120 hr). La preparación de láminas se realizaba con agitación a 72°C (Baño María con Agitación Belly dancer Hybridization Water Bath STOVALL LIFE SCIENCE. Greensboro, NC USA).

Para la tinción de las láminas para revisar el número de metafases por lámina se procedía a colocar la lámina en solución de tripsina (0.015gr de tripsina en 50ml de Buffer Sorensen pH7) por 10 seg, se pasaban a Buffer Sorensen de fosfatos pH7(5.26% KH_2PO_4 , 8.65% Na_2PO_4) por 20 seg y se colocaban en solución de Wright 8% por 35 seg.(4ml de Wright en 46ml de buffer Sorensen pH6.8 6.74% KH_2PO_4 + 7.08% Na_2HPO_4). Una vez determinado el material suficiente y de buena calidad, se procedía a realizar el bandeo de los cromosomas.

Evaluación de bandas G. Se preparaba solución de Giemsa 8% (46% de buffer de fosfatos pH6.8, 4% de Giemsa MERCK), las laminillas preparadas se colocaban para madurar las metafases, en estufa a 37°C/48 hr. Se realizaba la tinción previamente descrita, cambiando tinción de Wright por tinción de Giemsa. Una vez teñidas, se secaban al aire y se revisaban en microscopio (Axiostar ZEISS Alemania), el cual se conectaba a una computadora que utilizaba el programa IKAROS (software), con el que se acomodaban los cromosomas para su apareamiento y revisión.

Estudio Citogenético Molecular. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

Se realizaron estudios dobles de hibridación *in situ* sobre cariotipos de perro doméstico y de lobo mexicano. Se usaron marcadores (TOTELVISION™ Multicolor DNA Probe mix) de los siguientes cromosomas: HSA 14, 20, 21 y X, los cuales corresponden a los siguientes cromosomas caninos: CFA 8, 24, 27 y X respectivamente. Sobre un portaobjetos (CORNING™) previamente tratado con 3aminopropiltriethoxisilano (SIGMA™), se dejaba caer la muestra de la preparación cromosómica, con la técnica descrita previamente. Posteriormente se colocaban en solución de maduración por 40 minutos en estufa a 37°C. Deshidratación.- Se realizaban pases sucesivos en diluciones de Alcohol etílico 70%, 85% y alcohol absoluto, 2 minutos en cada uno. Se añadía una solución que contenía la sonda con el ADN Mix 1 (1p1q Xp/Yp), Mix 4 (4,21q), Mix 7 (7p, 7q, 14q), Mix 15 (20p, 20q), Mix 3 (3,22q) (TOTELVISION™ Multicolor DNA Probe mix), las cuales se encontraban diluidas en Buffer de hibridación 77%, que se encontraban a 74° C. Lavados post-hibridación se colocaban en solución (Agua destilada %, 20xSSC 1.95%, 0.29%NP40). Desnaturalización.- La laminilla permanecía con la sonda en cámara húmeda a 77°C por 2 minutos y posteriormente se bajaba la temperatura a 37°C, y se dejaban 48 hrs. Revelado.- se realizaban dos lavados previos solución 1 Alta astringencia (NP40 0.3%, SSC 0.4%) a 73°C por dos minutos con agitación y lavado 2 Baja astringencia (NP40 0.1%,

SSC 2x 0.4%) a temperatura ambiente por un minuto. Se dejaba secar en oscuridad, posteriormente se colocaba la contra-tinción con medio de montaje (DAPI con Vectashield, CTR Scientific). Y se revisaba en microscopio de fluorescencia, con el analizador de imágenes ABBIPRISM.

Estudio Citogenético tumoral.

El procedimiento general incluía la toma aséptica de la muestra, en todos los casos el material utilizado era estéril. Las muestras se colocaban en medio básico RPMI (GIBCO™) y se mantenían en refrigeración hasta trabajarse en el laboratorio, sin exceder las 6 hrs. En el laboratorio se trabajaba en campana de extracción de flujo laminar (NUAVE™ Class II Type A/B3). La muestra se colocaba en vidrio de reloj estéril y se colocaba con un poco de medio estéril y se procedía a cortar en fragmentos pequeños, posteriormente se colocaba en Medio básico RPMI 640 (RPMI Medium 640 GIBCO™), enriquecido con 20% suero fetal bovino, 0.4% de antibiótico y antimicótico (en caso de que se sospechara de contaminación de la muestra, se realizaban dos lavados con antibiótico previo a colocarse en el medio enriquecido). El tejido se pasaba dos veces por jeringa, para acabar de disolver el tejido, y se colocaba en 5 ml de medio en caja de cultivo de 25 ml con tapón de rosca (GIBCO™), se cuidaba evitar tocar el cuello para evitar contaminación. Y se colocaba en estufa a 37° C, 4% de CO₂. El proceso se repetía cada tercer día, se revisaba la caja en busca de explantes y se observaba si el indicador colorimétrico del medio (naranja) indicaba cambio. En caso de que hubiera contaminación bacteriana, se observaba coloración grisácea del medio y el cultivo se descartaba. En caso de contaminación micótica se realizaba la limpieza del tejido, se colocaban en solución de antibiótico y antimicótico, mientras se evaluaba al microscopio la viabilidad del tejido, si el tejido se consideraba viable, después de permanecer 10 minutos en la solución y se realizaban de tres a cinco lavados y se colocaba nuevamente en caja nueva estéril con medio recién preparado.

Todas las muestras se trabajaron con las mismas condiciones y medios, excepto en tres. Las muestras de tejidos hepático y esplénico, en la primera el tejido se cortó en solución de Hanks adicionado con colagenasa por 25 minutos y en ambos casos el medio fue suplementado con 0.2% albumina bovina, y 0.02% insulina bovina. Y la última muestra de estroma de neoplasia en cavidad nasal, a la cual se hicieron adiciones al medio suplementando además 1% de solución glucosada 5%, 0.1% aminoácidos (L-Glutamina) y 0.1% mitógenos específicos (PHA y Pokeweed).

Una vez que la caja se observaba cubierta por células en replicación, para poderse cosechar se adicionaba al medio 70µl de colchicina (SIGMA™) por 3 horas. Posteriormente las células se retiraban adicionando tripsina 0.25% (SIGMA™) con EDTA (SIGMA™) por un minuto y las células se separaban con movimientos rápidos y golpes cortos. Posteriormente se inactivaba la tripsina y se pasaba a tubo estéril de 15ml, se centrifugaba a 2500 rpm/ 5 minutos (SOLBAT™) y se decantaba el medio sobrenadante. Se utilizaba 1 ml del medio restante con el botón celular, se mezclaba con el vortex (Vortex Genie2. DAIGGER, Bohemia NY). Se adicionaba posteriormente 7ml de solución hipotónica de citrato de sodio 0.08% (SIGMA™), el cual se incubaba a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaba a 2500rpm / 5min. Se decantaba el sobrenadante. Y se fijaba con solución Carnoy y se dejaba reposar, posteriormente se hacían las laminas con la técnica descrita previamente.

5.3.3. Estudio molecular

Extracción de DNA.

i) Sangre Periférica.

Se realizó extracción de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica mediante la utilización de la técnica descrita por Aljanabi (1997), utilizando kit comercial Perfect Pure DNA Blood kit PRIME™ Alemania. Se utilizaban 3 ml de sangre periférica conservada en 1.6% Na₂EDTA como anticoagulante. El producto final obtenido se refrigeraba a 4°C.

ii) Tejido Animal (Fresco/ Congelado)

Se realizó la extracción de DNA genómico de muestras de tejido fresco tumoral, que se tomaban de manera aséptica y se conservaban en medio DMEM12 (GIBCO™) o RPMI (RPMI Medium 640 GIBCO™). Y muestras de tejido congelado sin preservador y muestras preservadas en alcohol y en solución de glicerol 20% previo a la congelación. Para todas las muestras se utilizaba el procedimiento descrito en la técnica de Aljanabi (1997), se utilizaba el kit para Extracción de DNA de tejido de QIAGEN™. El producto final obtenido se guardaban en congelación.

iii) Tejido Fijado en Formol/ Parafina

Se trabajaron muestras fijadas en formol y de bloques de parafina, de fijación previa en formol o de solución de Schulz. Se realizó una adecuación del protocolo de Extracción de tejido descrita por Aljanabi (1997), se utilizó la técnica descrita en el manual de técnicas de QIAGEN para tejidos embebidos en parafina, haciendo algunas variaciones. Se utilizó el kit Dneasy Blood & Tissue de QIAGEN.

iv) Cultivo Celular

Se realizó extracción de DNA de cultivo celular de tejido neoplásico siguiendo la técnica descrita del protocolo de Extracción de DNA de cultivo celular (Qiagen kit for blood & Cell Culture QIAGEN™). Una vez obtenido, se disolvía el DNA dejándolo toda la noche en movimiento a 55 °C. Posteriormente se lavaba el centrifugado del pellet de DNA con 1 ml de etanol 70% frío. Se agitaba y centrifugaba a más de 5000 g /10 min a 4 °C. Se removía el sobrenadante sin distorsionar el pellet. Se secaba al aire 5 a 10 minutos, se resuspendía el DNA en 0.1 – 2ml en buffer (TE pH8.0), se disolvía en movimiento a 55 °C por una o dos horas.

Cuantificación de DNA

En todas las muestras obtenidas se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico con lecturas a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La concentración de DNA fue calculada mediante la siguiente relación:

1 DO260= 50mg de DNA/ml.

La pureza del DNA se obtuvo mediante la relación de las densidades ópticas obtenidas con las lecturas 260/280 nm y se consideró como óptima una relación 1.8-2.0. Para determinar la calidad de las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%.

Ensayo de PCR

Por medio de la técnica de PCR se amplificó el marco abierto de los genes enlistados en la tabla 2. Los oligonucleótidos fueron adquiridos en una casa comercial (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES) y llevados a una concentración final de 100 mM.

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 25 µL de acuerdo a las concentraciones descritas por Sambrook y Cols. Esta contenía una concentración de DNA de 100ng/ µl, solución amortiguadora de amplificación 10 (Tris- HCl, KCl) a una concentración final 1 X, mezcla de los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) a una concentración final de 100 µM, oligonucleótidos iniciadores a concentraciones finales específicas 0.25 µM, .1.5 U de Taq Alta® (Applied Biosystems, ROCHE), 1.5 de mM de MgCl₂ y agua destilada desionizada. Para todos los oligos, excepto: para CCND1 ex2, donde la variante fue MgCl₂ 2.5mM. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Gen Amp PCR System 9700 de Perkin Elmer). Las condiciones utilizadas y el producto esperado se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para *Myc*, *Ccnd1*, *Tp53* y *Pten*.

GEN/ Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
MYC1 /Ex1	5'-CTTTGTGTGCCCCCTCCT-3' 5'-GCTTCTCCGAGACGAGCTT-3'	61 °C	451pb
MYC2 /Ex1	5'-ACCAGAGCTTCATCTGCGAC-3' 5'-AGCAGCTGCAGGAGAGAGAC-3'	61 °C	444pb
MYC3 / Ex2	5'-TGGCTTGAAGGACACTGTTG-3' 5'-GGCCTTTTCATTGTTTTCCA-3'	60 °C	429 pb
MYC4 / Ex2	5'-AGGAGAATGACAAGAGGGCGA-3' 5'-GATCCCCCTACAGTTCTGGCA-3'	60 °C	331pb
CCND1 /Ex2	5'-CGGTACACCCCACTTTACA-3' 5'-TCAGATGAGGAAACCAAGGC-3'	62 °C	249pb
CCND1 /Ex3	5'-TGGCTCTCTCCTCTCTCCA-3' 5'-GGGCGCAGCATGTACTIONGAT-3'	60 °C	168pb
CCND1 / Ex4	5'-TAGTCCAAGTCCTGGCGTTT-3' 5'-AGACGGAAGGGAGAAAGAGC-3'	60 °C	350pb
TP53 1 / Ex1,2,3	5'-ACAGCACCCACACTCCCTT-3' 5'-TCCCAAACAGAGAAACCCAG-3'	61 °C	658pb
TP53 2/ Ex 4, 5	5'-TAGACCCCGACCCCTCTACT-3' 5'-GTTGAAGGAGGAGAAAGCCC-3'	60 °C	509pb

GEN/ Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
TP53 3/ Ex6	5'-GTTGGGAAAGACTGAGGCTG-3' 5'-ATTCCACATTGGGACAGGAA-3'	60 °C	239pb
TP53 4/Ex7	5'-ATGAGGGTGGCTAGGAGTCA-3' 5'-AAATAGGCAGAGGGAGAGGC-3'	60 °C	386pb
TP53 5/Ex 8	5'-ATGTGGGCAGATACAGAGG-3' 5'-GAATCAGGGACAGGACCAGA-3'	60 °C	254pb
TP53 6/ Ex9	5'-TGCTGCAGATTGGCACTTAC-3' 5'-TGGGGGTATGGTAGAAGCAG-3'	60 °C	318pb
TP53 7/ Ex10	5'-ACACAGAAGTTCCTGGGTG-3' 5'-ACACCGAATAGGTGTGCTC-3'	60 °C	362pb
PTEN 1/Ex 1	5'-CCTGGACAACCGTTTAAATTT-3' 5'-ACATCATTTTCCACGATTTAGAA-3'	59 °C	235pb
PTEN 2/Ex 2	5'-AATGGTGGCTTTTTGTTTGT-3' 5'-TGCCAACATTGTTTTGACCT-3'	60 °C	260pb
PTEN 3/ Ex 3	5'-ACAGTGTGATGCCTGATCCA-3' 5'-TTTTCCAATTGTCAAAGACCA-3'	60 °C	249pb
PTEN 4/ Ex4	5'-TGTGCTCCCTCTCAAATGT-3' 5'-GGCCCTCACTCTAGAATCCA-3'	61 °C	452pb
PTEN 5/ Ex5	5'-TGGGTACAACCCAGTTACCA-3' 5'-TCCATGTACTGGAAGGATGAAA-3'	59 °C	372pb
PTEN 6/Ex6	5'-TTTGAAGGCATTTCCAGTGA-3' 5'-TGATTTGGGATATTGTTCCC-3'	59 °C	232pb
PTEN 7/Ex7	5'-TCTTGGGGCAAATGTTGAAT-3' 5'-CCCCACACACACAAAAGAG-3'	60 °C	324pb
PTEN 8/Ex8	5'-CTGTGTGCCACAGCACTTTT-3' 5'-TCAAACCCCGTGGATGTAT-3'	60 °C	433pb

Visualización de Productos

Los productos de amplificación de cada reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio al 0.0002 % en todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular, un control positivo, y un control negativo que consistió en una reacción sin DNA. Se utilizaba un fotodocumentador (Bio-Imaging Systems MiniBis. USA).

Purificación de Bandas

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizaba por medio del Kit QIAEX II- Agarose Gel Extraction. QIAGEN. USA de extracción rápida de DNA en gel.

Se cortaba la banda del gel con el producto amplificado y se colocaba en un tubo eppendorf de 1.5 mL se pesaba y se adicionaban 3 volúmenes de la solución L1.

Se incubó a 55 ° C por 15 min. Agitándose cada 3 min. Al término de la incubación se transfirió el producto a una columna y se centrifugó por 1 minuto a 9, 221 g.

Se eliminó el filtrado y se adicionó 500 μL de la solución L1 se incubó por 1 minuto y se centrifugó 1 minuto a 9, 221 g.

Posteriormente se agrego 700 μL del reactivo L2 y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 9, 221 g

Se le adicionó 50 μL de la solución PE incubando por 1 minuto a temperatura ambiente y se recupero al filtrado y este se utilizo como templado.

PCR de secuencia

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un estuche para secuencia de DNA (BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit). El procedimiento se basa en el método de Sanger y Cols.

Como cebadores para las reacciones de secuenciación se emplearon los mismos que para las amplificaciones pero a una concentración de 0,10mol/ μL .

La Reacción de secuenciación mediante termociclación tenía la siguiente mezcla.

1-3 μL del producto de PCR purificado

Terminator big Dye= 2 μl

Primer (3,2 pmoles) = 1 μl

H2O hasta llevar la reacción a 6 μl

El programa utilizado fue el siguiente:

Programa de PCR de secuencia

96 ° C	1 minuto	
96 ° C	30 segundos	
50 ° C	15 segundos	25 ciclos
60 ° C	3 minutos	

Paso por columna

Se realizó la purificación de los productos resultantes de la reacción de secuenciación con la finalidad de eliminar los terminadores marcados que no se han utilizado en la reacción evitando el reflejo de fluorescencia, mediante las columnas de CENTRISEP.

El kit de CENTRISEP contiene tres componentes:

Tubos eppendorf: tubos de recolección de muestras. Capacidad de 1,5 mL.

Tubos de lavado: largos cilíndricos acabados en un cono. Capacidad de 2 mL.

Columnas CENTRISEP: tubos cónicos largos con capuchón en ambos extremos. Contienen el gel seco responsable de la purificación.

Para la hidratación de las columnas, se agregó 800 µl de agua destilada y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugan a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el exceso de agua. La columna se colocó en tubos de 500 µl, y se agregó el producto de PCR (obtenido del paso anterior) sin tocar el sephadex y se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se procedió a secar el producto con desecador o ventilación y se resuspendió en 20 µl de TSR (Template Supresión Reagent).

Secuenciación automatizada

Para la secuenciación del producto de DNA secuencia específica, éste se desnaturalizó incubándose a 95 ° C por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo.

El análisis de la secuencia se llevó a cabo empleando el secuenciador ABI 377 (ABI, Perkin-Elmer®).

Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia extraída del GenBank.

MYC GeneID: 403924

PTEN GeneID: 403832

TP53 GeneID: 403869

CCND1 GeneID: 449028

CAPITULO VI

RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE LA PRESENTACIÓN DE NEOPLASIAS EN EL LOBO GRIS MEXICANO.

De la información que se recolectó de la presentación de neoplasias en los individuos registrados en el programa de recuperación de la especie, se obtuvo un total de 39 individuos afectados, lo que representaba el 3.99% de la población. De estos, los procesos neoplásicos se consideraron como causa de muerte en 35 individuos (3.58%). En el cuadro 3 se encuentran enlistadas las neoplasias reportadas en los lobos mexicanos, clasificadas por su histogénesis. Las neoplasias marcadas con un asterisco, se encontraron descritas como neoplasia sin clasificación morfológica específica y se colocaron en el grupo correspondiente, considerando la mayor frecuencia en la incidencia de neoplasias que presentan los órganos referidos.

Cuadro 3.
TIPOS E INCIDENCIA DE NEOPLASIAS EN EL LOBO GRIS MEXICANO.

Tipo de Neoplasia	Afectados
Epiteliales	
Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en Cavidad Nasal	15
Adenocarcinoma sebáceo con metaplasia escamosa -piel	4
Carcinoma de Células basales con diferenciación escamosa- piel	2
Adenocarcinoma de piel	1
Neoplasia adrenal/ uterina*	1
Neoplasia de colon*	1
Neoplasia de vejiga *	1
Neoplasia-de médula espinal*	1
Neoplasia de hígado y pulmón*	1
Glioblastoma	1
Carcinoma gástrico	1
Astrocitoma	1
Neoplasias no identificadas (piel)*	2
Mesenquimales	
Mesotelioma	3
Hemangiosarcoma	1
Carcinosarcoma mamario, sarcoma osteogénico pulmonar y mioma	1
Linfoma	1
Osteosarcoma	1

Los datos presentados en el cuadro 3 denotan un marcado predominio de neoplasias epiteliales, las cuales representaban el 82%, y las neoplasias mesenquimales representaban el

18% restante. Siendo la neoplasia más frecuente el Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en cavidad naso-sinusal, encontrándose afectados 15 individuos, lo que representa el 38.46% del total de neoplasias, seguidas del adenocarcinoma sebáceo con metaplasia escamosa (13%), el mesotelioma (7.89%) y el carcinoma de células basales con diferenciación escamosa (5.26%). Apreciándose que de las neoplasias epiteliales, predominan las que tienen una diferenciación escamosa, que representan el 65% del total de epiteliales. En el cuadro 4 se presentan los individuos que las han padecido, identificando el género (M masculino, F femenino), el linaje del que provienen cuando es puro (McBride Mc, Aragón A, Ghost Ranch Gr), o los padres si son productos de cruce de linajes, todos identificados por su número de registro o Num de Studbook (STB), y la edad de presentación de la neoplasia, cuando fueron como causal de la muerte, o la edad hasta la que vivieron si su muerte no se relacionó a ésta, las edades encerradas entre paréntesis, indican la edad actual de los individuos, que aún se encuentran con vida.

Cuadro 4.
 INCIDENCIA DE NEOPLASIAS IDENTIFICADO POR INDIVIDUO, LINAJE,
 Y EDAD DE PRESENTACIÓN.

SB #	Sexo	Linaje/ Padre- Madre	Neoplasia	Edad (años)
2	M	McB	Adenocarcinoma-piel	15
10	M	McB	Mesotelioma	12
12	M	McB	Osteosarcoma	17
33	M	McB	ACEcn	11
39	F	McB 10-14	Neoplasia adrenal/ uterina	14
45	F	McB	Neoplasia colon	11
60	M	McB 2-13	Hemangiosarcoma	14
66	M	McB	Neoplasia no id (piel)	14
76	M	McB 12-23	ACEcn	13
86	M	McB 33-45	ACEcn	8
93	F	McB 43-23	Neoplasia de vejiga	13
119	M	McB	ACEcn	7
120	M	McB	ACEcn	6
123	M	McB	Carcinoma espinal	11
131	M	McB 60-37	Astrocitoma	7
133	F	McB 60-37	Linfoma	14
138	F	McB 67-84	Mesotelioma	8
140	M	McB 66-74	Ca hepático y pulmonar	10
142	M	McB 66-74	CSE	16
158	M	McB	CSE	14
160	F	McB 47-94	Carcinosarcoma , sarcoma osteogénico pulmonar, mioma uterino	15
176	F	McB 78-29	ACEcn	8
485	M	McB	CSE	13
488	M	McB 131-127	Neoplasia no id.	13
514	M	411-84	Mesotelioma	7
515	M	411- 84	Glioblastoma	8

535	M	McB-A	ACEcn	9
536	M	McB-A	ACEcn	7
537	M	McB-A	ACEcn	6
538	F	McB-A	ACEcn	11
556	M	McB 183-168	Neoplasia no id	11
604	M	158- 133	CSE	11
663	F	172-176	Ca gástrico	(10)
779	M	537-517	ACEcn	8
		McB/a -McB/GR		
809	F	536-685	ACEcn	5
835	M	612 -569	ACEcn	7
		A/McB-A/McB-		
840	M	McB/GR	ACEcn	5
850	M	573-133	CBE	(8)
		A/McB-A/McB-		
977	M	McB/GR	ACEcn	4

M: Masculino

F: Femenino

McB: McBride

A: Aragón

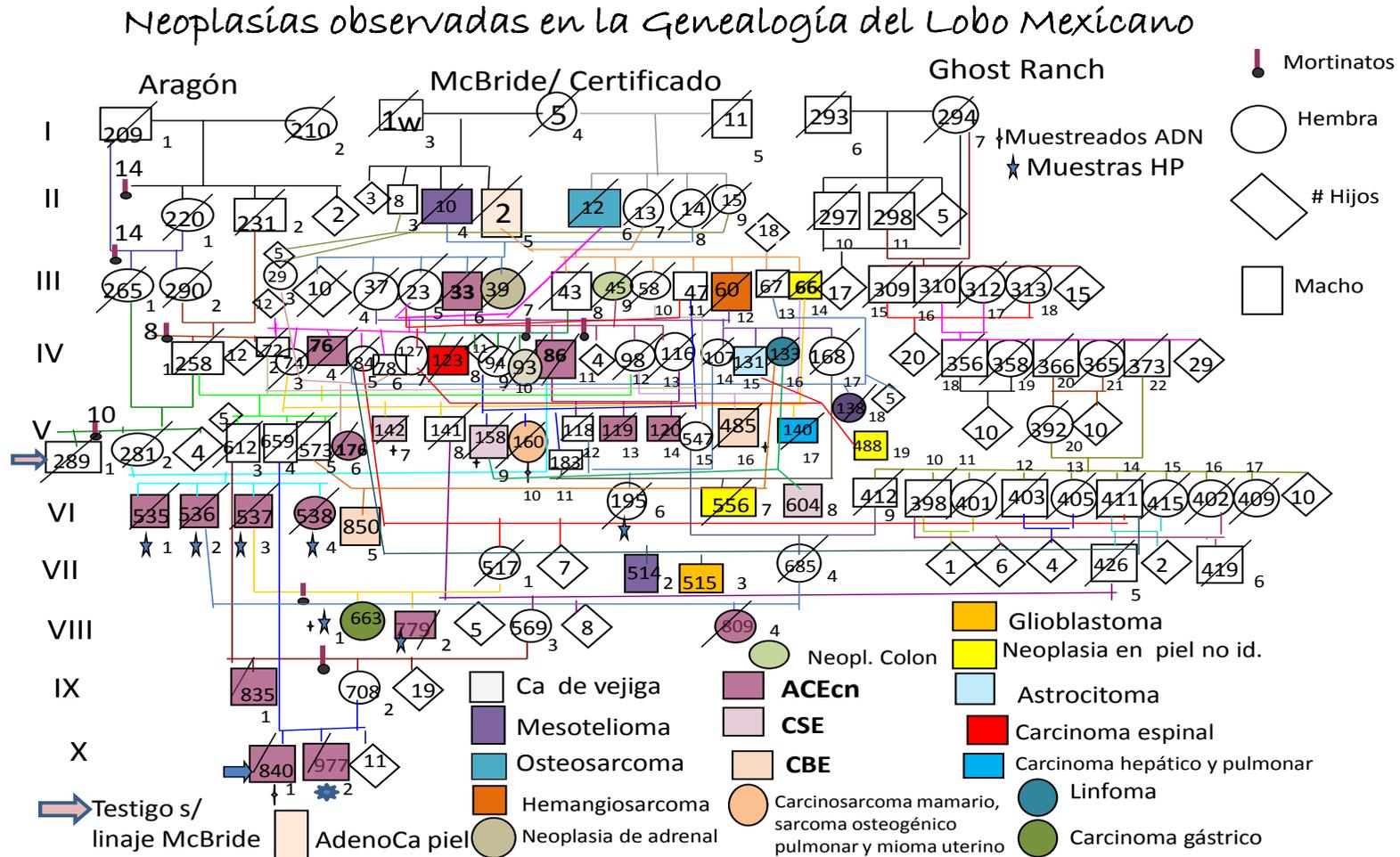
GR-. Ghost Ranch

De la información mostrada en el cuadro 4, se observa un marcado predominio en la afección a machos (74.35%) sobre la incidencia de neoplasias presentadas en hembras (25.64). Y también que la edad promedio de presentación de neoplasias es de 10 años. Se aprecia también una tendencia marcada a la afección en edades más tempranas al promedio en ejemplares afectados por el ACEcn, el cual presenta un promedio de presentación de 7 años, y una relación por género, de 80% en macho y 20% a hembras. En todos los casos de ACEcn se ha asociado a la muerte de los ejemplares, con un periodo de sobrevivencia máximo de 6 meses, una vez diagnosticado.

6.1.1 Genealogía del lobo gris mexicano

Analizando los tres linajes, se observa que en un principio la mayor incidencia de neoplasias se encontraba en el linaje McBride, el linaje principal, ya que a partir de la segunda generación de este linaje se observaba la presentación de neoplasias, a diferencia de los linajes Aragón y Ghost Ranch, los cuales se empezaron a ver afectados con neoplasias hasta su cruce con individuos del linaje principal. La cruce McBride-Aragón fue más frecuentemente afectada que la McBride-Ghost Ranch. Buscando las relaciones familiares, se obtiene el árbol genealógico de los lobos mexicanos afectados por cáncer, el cual se muestra en la figura 2, donde se identifican con colores las neoplasias en los individuos identificados por su número de registro (studbook).

Figura 2. Árbol genealógico de los tres linajes de lobo gris mexicano.



En la figura 2 del árbol genealógico se encuentran representados los machos identificados con cuadro, hembras con círculo, y por colores se identificaron los individuos afectados con neoplasias, en la parte superior se observa el linaje al que pertenecen y al número de generación que corresponde. Se denota la presentación de varios tipos de neoplasias mesenquimales malignas a partir de la segunda generación (II-4 (STB 10) mesotelioma, II-6 osteosarcoma (STB12), y II-5 hemangiosarcoma (STB2), siendo los individuos afectados machos, hijos de distintos padres, (II-4 y II-5, descendientes de I-3 (STB 1w); II-6 descende de I-5 (STB 11)) y todos hijos de la hembra fundadora del linaje Mc Bride I-4(Stb 5).

La presentación del ACEcn se aprecia a partir de la tercera generación III-6(Stb33), descendiente de padre con neoplasia previa II-4 (mesotelioma). A partir de este individuo, se observa la presentación de esta neoplasia en sus descendientes IV-11 (Stb86) y en seis de los hijos de este V-13,(STB 119), V 14 (STB 120) provenientes de la cruce con IV-13 (STB 116) linaje McBride; y VI-1 (STB 535), VI-2 (STB 536), VI-3 (STB 537), VI-4 (STB 538), hijos de V-2 (STB 281), linaje Aragón. Se observa una afección principalmente en machos, hasta este momento se observa la primer hembra afectada por ACEcn.

6.1.2 Análisis Estadístico para la fijación de un gen mutado en la población.

De la aplicación de la fórmula de Kimura (1969) para determinar la probabilidad de fijación de un gen mutado en la población Mc Bride, la cual cuenta con 3 fundadores, se obtiene que el gen mutante se fijaría en 9 generaciones. Como se muestra a continuación:

$$t_1(p) = \frac{1}{0.33} \left\{ 4 \cdot 3 (1-0.33) \log_e (1-0.33) \right\}$$

En la figura 3 se muestra la gráfica obtenida de aplicar la fórmula, donde se muestra la probabilidad de que el gen mutado se fije marcado con la línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda la línea de color azul.

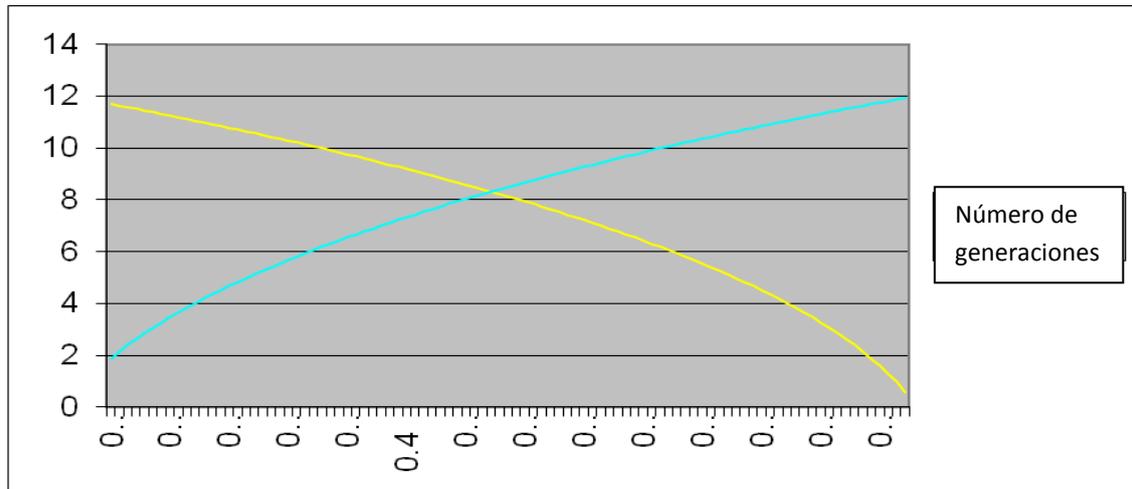


Figura 3. Representación gráfica del número de generaciones que se requieren para que una mutación se fije o se pierda en el linaje McBride. La probabilidad de que se fije se muestra con la línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda se encuentra representada con la línea en color azul.

El número de generaciones se encuentra en el eje de las Y, donde se observa que las probabilidades se cruzan cercanas a las 8 generaciones.

Para la tercera generación de individuos afectados por el ACEcn, ya se había aceptado la introducción de ejemplares de los otros dos linajes. Los hijos de IV-11 (Stb86), productos de cruce con hembra V-2 (Stb281) de linaje Aragón, todas las crías producto de esta cruce, resultaron afectados por ACEcn. Aplicando la misma fórmula propuesta por Kimura, al ampliar la cantidad de fundadores a 5, 3 del linaje McBride y 2 hipotéticos del linaje Aragón, la probabilidad de fijación del gen mutante se modifica a 17 generaciones. En la figura 4 se observa la gráfica del producto de la ecuación.

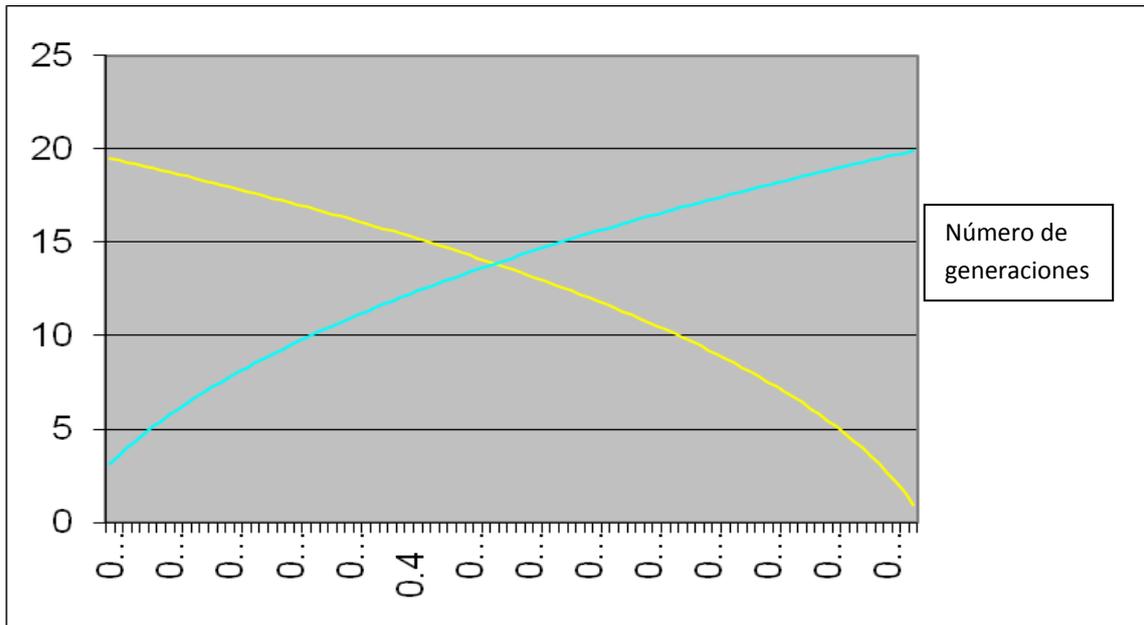


Figura 4. Representación gráfica del número de generaciones que se requieren para que una mutación se fije, o se pierda, en la cruce de linajes McBride - Aragón. La probabilidad de que se fije se muestra con la línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda se encuentra representada con la línea en color azul.

La probabilidad de que se fije el gen mutado se muestra en línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda con la línea de color azul. El número de generaciones se encuentra en el eje de las Y, donde se observa que las probabilidades se cruzan cercanas a las 15 generaciones.

En el caso del individuo índice, X-1 (Stb 840) era de linaje abierto, es decir que presentaba sangre de los tres linajes. Al aplicar la misma fórmula se observa que la probabilidad de fijación al incluir al tercer linaje, se incrementa a 25 generaciones. En la figura 5, se observa la gráfica de la aplicación de la fórmula.

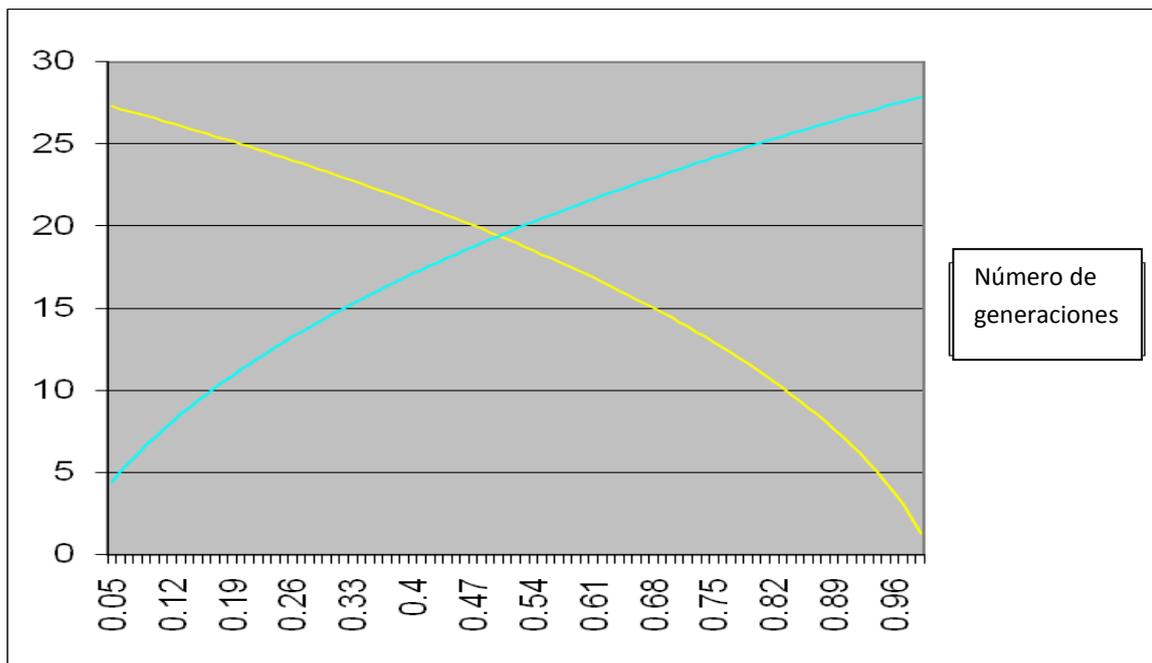


Figura 5. Representación gráfica del número de generaciones que se requieren para que una mutación se fije, o se pierda en el cruce de los tres linajes. La probabilidad de que se fije se muestra con la línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda se encuentra representada con la línea en color azul.

La probabilidad de que se fije el gen mutado se muestra en línea de color amarillo y la probabilidad de que se pierda con la línea de color azul. El número de generaciones se encuentra en el eje de las Y, donde se observa que las probabilidades se cruzan cercanas a las 20 generaciones.

6.2 CARACTERIZACIÓN MORFOPATOLÓGICA DE DIVERSAS NEOPLASIAS PRESENTES EN LOBO GRIS MEXICANO.

Las muestras de las neoplasias de los siguientes lobos mexicanos: VI-3 (STB 537), VI-1 (STB 535), VI-4 (STB 538) A1, V-9 (STB 158) C1, C2, C3, V-7 (STB 142), V-16(STB 485) Ez1, Ez2, Ezp, Ez2007, VI-8 (STB 604), X-1 (STB 840) E2, y VIII-1 (STB 663) se fijaron en formol al 10% durante 24 horas o más y posteriormente se incluyeron en parafina. Las muestras de los siguientes lobos: V-16(STB 485) Ez2, Ezp, V-10 (STB 160) G1, G2, gl.mam, VIII-2 (STB 779) se fijaron en solución de Schulz, (alcohol 70%, glicerina 20% y agua destilada 10%), se realizaba cambio de medio a las 24 hrs y posteriormente se incluían en parafina, sin pasar por formol.

6.2.1 Clasificación Histológica de neoplasias

Se revisaron un total de 18 neoplasias diferentes, 17 malignas (94.1%) y 1 benigna, obtenidas de 10 ejemplares de lobo gris mexicano, 7 machos y tres hembras, ubicados en 6 locaciones distintas en el territorio Mexicano. De las cuales 13 correspondieron a carcinomas, representando un 76.4%, una fue mixta 5.8% (carcinosarcoma mamario) y dos de origen mesenquimal 11.7% (sarcoma y leiomioma). Apreciándose que el porcentaje de machos afectados fue de 70% y el de hembras afectadas el restante 30%.

De las neoplasias revisadas, 5 correspondieron a Adenocarcinoma con diferenciación escamosa localizadas en cavidad naso-sinusal (ACEcn), representando el 29.41% del total de las revisadas, de estas 4 se presentaron en machos, Figuras 6, 6a, 7, 7a, 8, 9 y 9a y una hembra (A1).

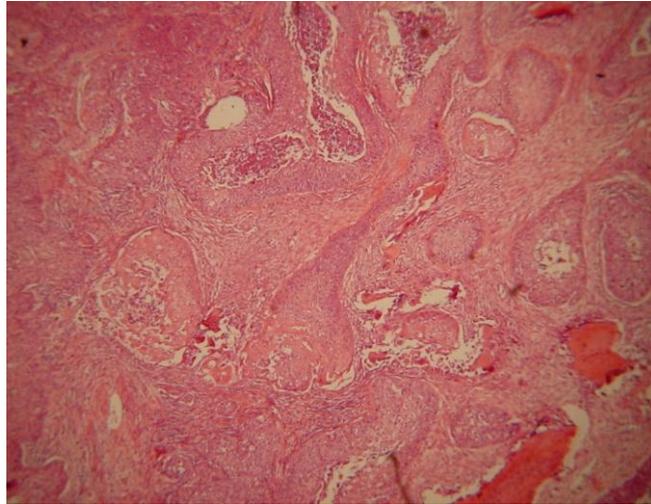


Figura 6. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad nasosinusal, correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa H-E 10X. X-1 (Individuo índice STB 840). Se observa la formación de estructuras glandulares, sobre abundante tejido conectivo. En algunas áreas se observan zonas de queratinización.

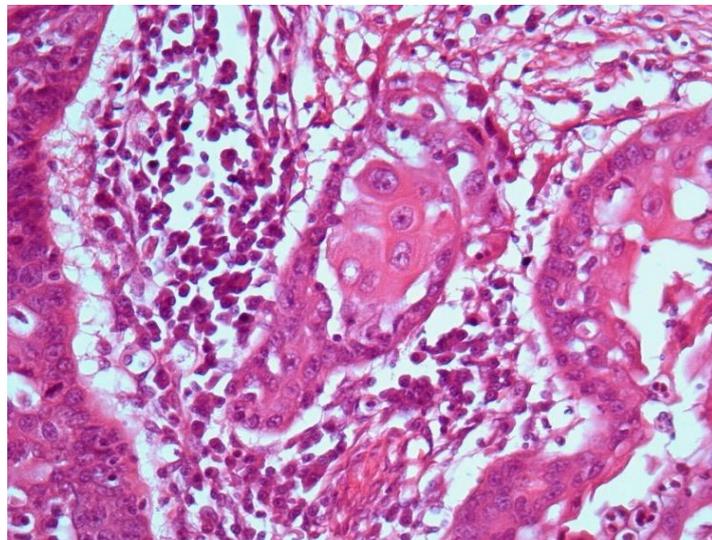


Figura 6a. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad nasosinusal, correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa. H-E 40X. X-1 (Individuo índice STB 840) Acercamiento donde se observa la formación de estructuras glandulares, con diferenciación escamosa central, las células muestran marcado pleomorfismo, y se encuentran rodeadas por abundante infiltrado inflamatorio.

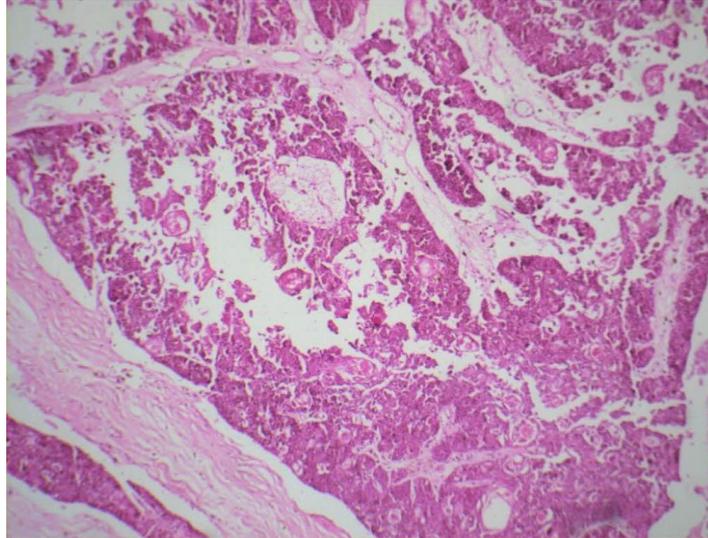


Figura 7. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad naso-sinusal, correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa H-E 10X. VI-1 (STB 535). Formación de glándulas, y queratinización.

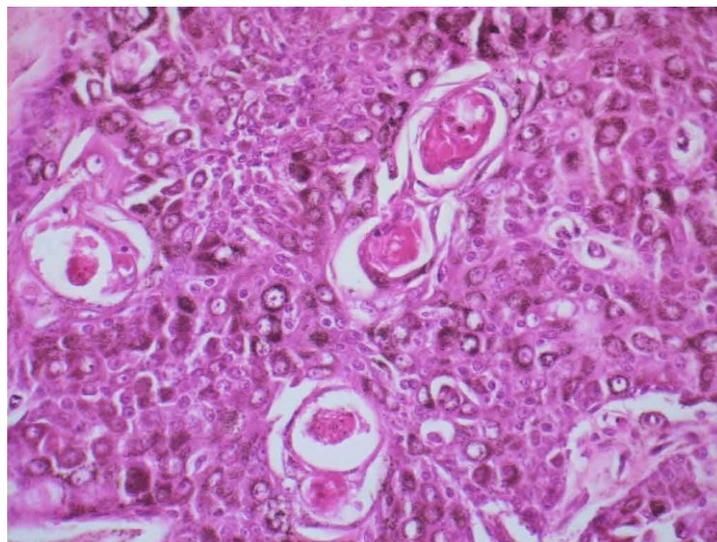


Figura 7a. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad naso-sinusal, adenocarcinoma con diferenciación escamosa. H-E 40X VI-1 (STB 535). Marcado pleomorfismo celular, con reforzamiento citoplasmático, y formación de perlas de queratina.

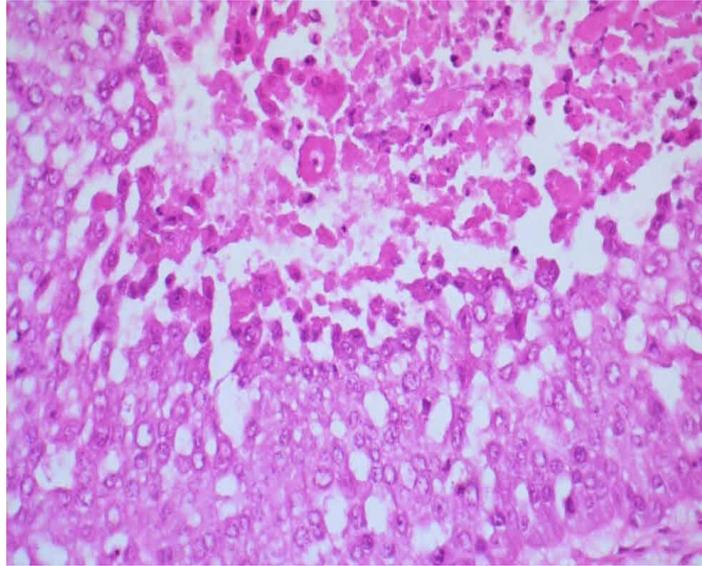


Figura 8. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad nasosinusal, correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa. H&E 40X. VII-3 (STB 537). En la luz de las formaciones glandulares se observa la formación de perlas de queratina.

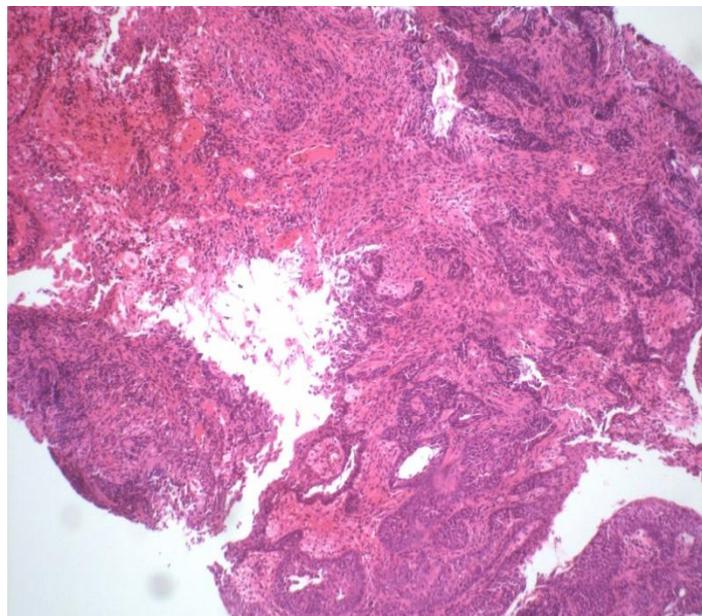


Figura 9. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad nasosinusal correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa H&E 10X. VIII-2 (STB 779). Imagen panorámica donde se aprecia el estroma, la formación de estructuras glandulares, la vascularización, amplias zonas de necrosis e infiltrado inflamatorio.

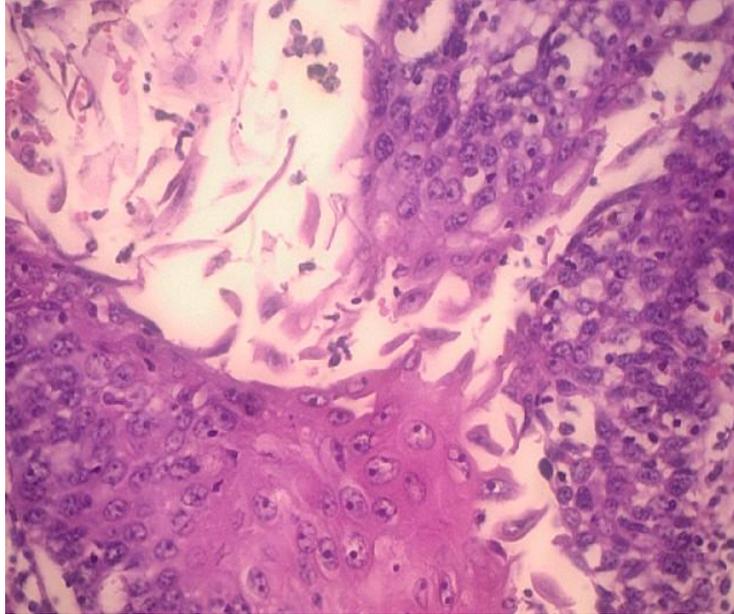


Figura 9a. Fotomicrografía de neoplasia en cavidad nasosinusal correspondiente a adenocarcinoma con diferenciación escamosa H-E 40X. VIII-2 (STB 779). En la luz de las formaciones glandulares se observan células inflamatorias, y restos celulares.

De las neoplasias malignas revisadas, 7 estaban presentes en piel, de estas 6 correspondieron a carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa, figuras 10, 10a, 11, 12; y una más correspondió a Carcinoma de células basales con diferenciación escamosa Figura 13, la cual ocasionó metástasis a región axilar (Ez2), pulmón (Ezp) y páncreas figuras 13^a, 13b y 13c.

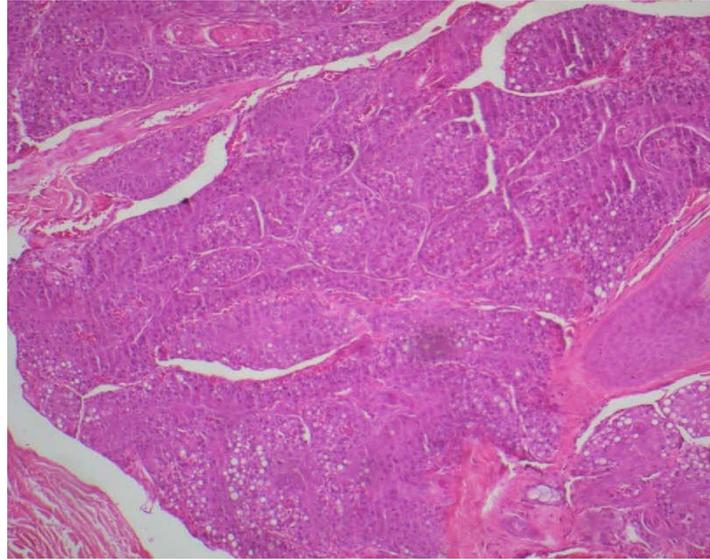


Figura 10. Fotomicrografía de plano nasal. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa H&E 10x. C1 2008. V-9 (STB 158). Se aprecian formaciones glandulares homogéneas con diferenciación escamosa en algunas áreas.

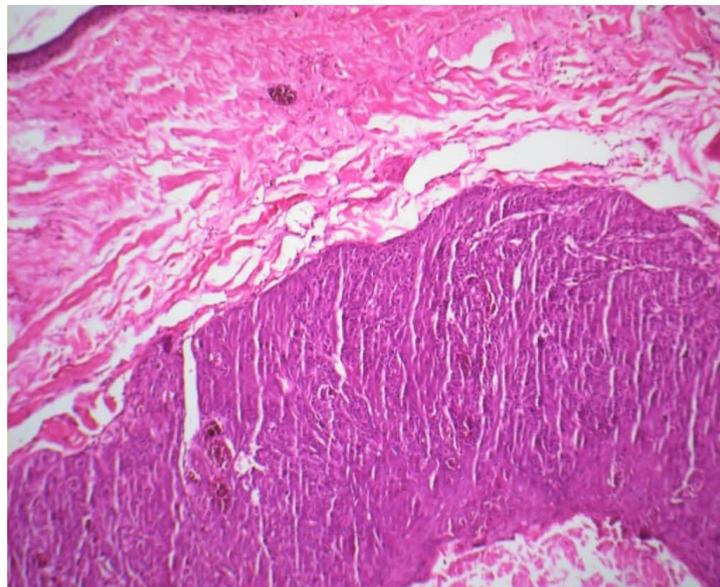


Figura 10a. Fotomicrografía de piel dorso y base de cola. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. H&E 10x. C2 2008. V-9 (STB 158). Se aprecia la epidermis en la región superior, en dermis superficial moderado infiltrado inflamatorio perivascular, y en dermis profunda formación de glándulas sebáceas neoplásicas las cuales presentan diferenciación escamosa hacia la luz.

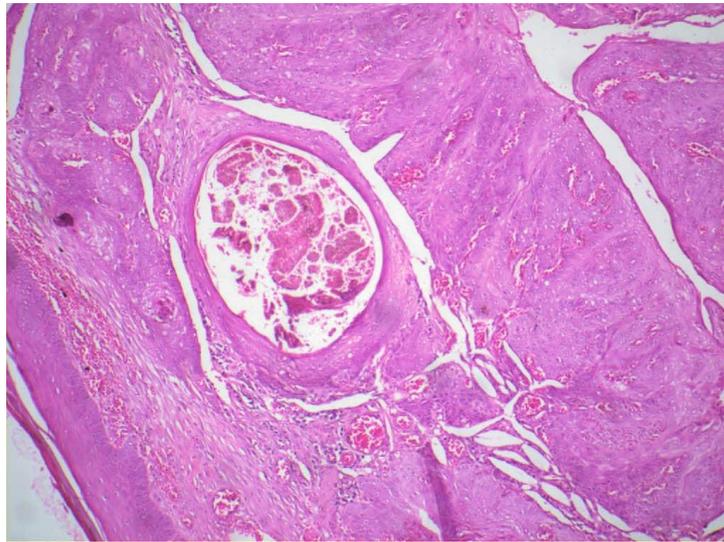


Figura 11. Fotomicrografía de piel dorso. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. H-E 10x. V-7 (STB 142). Se aprecia la epidermis con hiperqueratosis moderada y hemorragias subepidérmicas. En dermis se observa crecimiento neoplásico, con formaciones glandulares que presentan diferenciación escamosa.

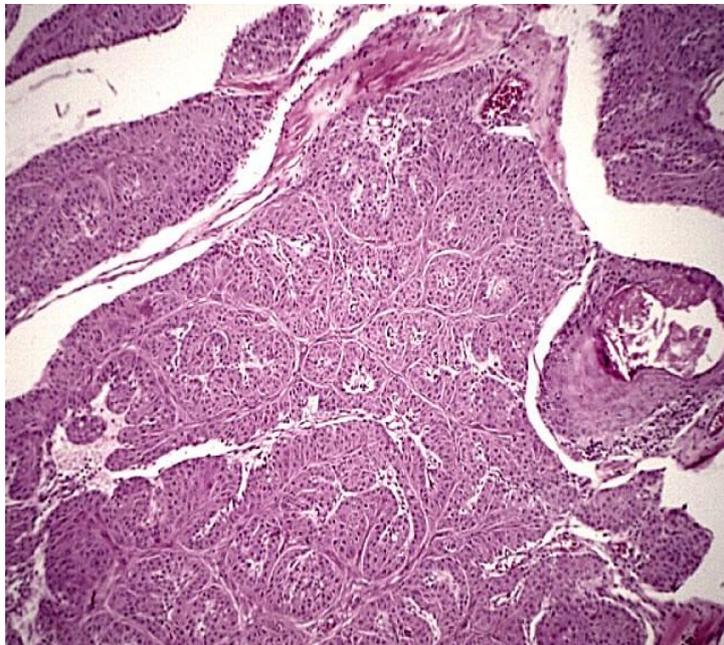


Figura 12. Fotomicrografía de piel dorso. Adenocarcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. 2007. VI-8 (STB 604). Se aprecia crecimiento neoplásico, con múltiples formaciones glandulares que presentan diferenciación escamosa.

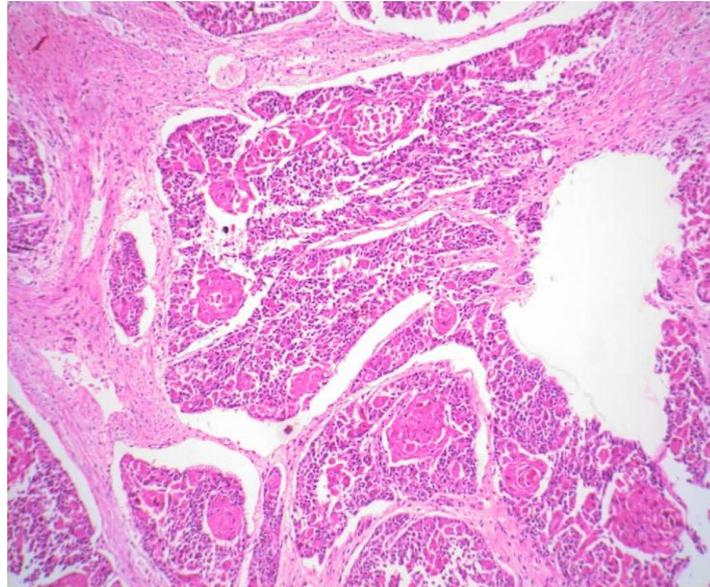


Figura 13. Fotomicrografía de piel dorso. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa H-E 10x. Ez1 2008. V-16 (STB 485). Se aprecia crecimiento neoplásico, infiltrando dermis profunda, donde se aprecia diferenciación escamosa y abundante infiltrado inflamatorio en el estroma.

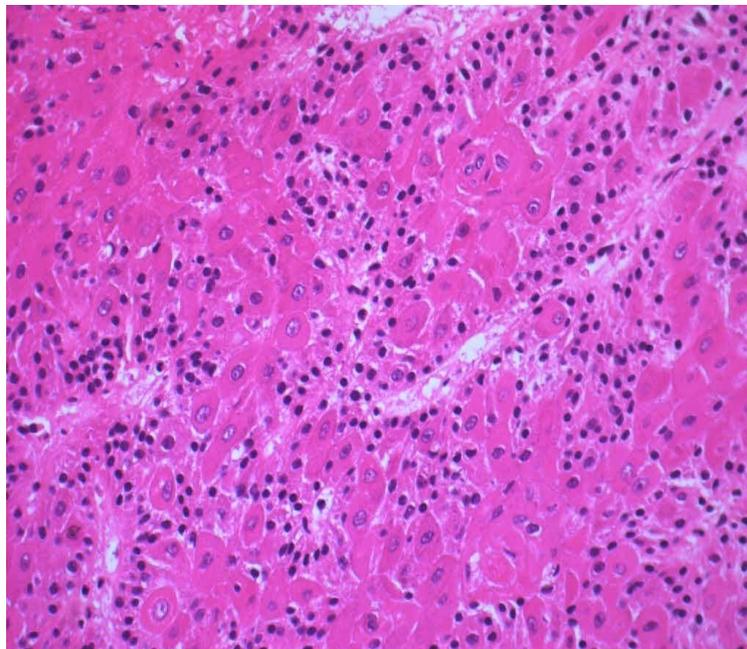


Figura 13a. Fotomicrografía de linfonodo región axilar. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa H-E 40x. Ez2 2009. V-16 (STB 485). Acercamiento de las

células neoplásicas, que presentan marcado pleomorfismo, y algunas presentan diferenciación escamosa celular.

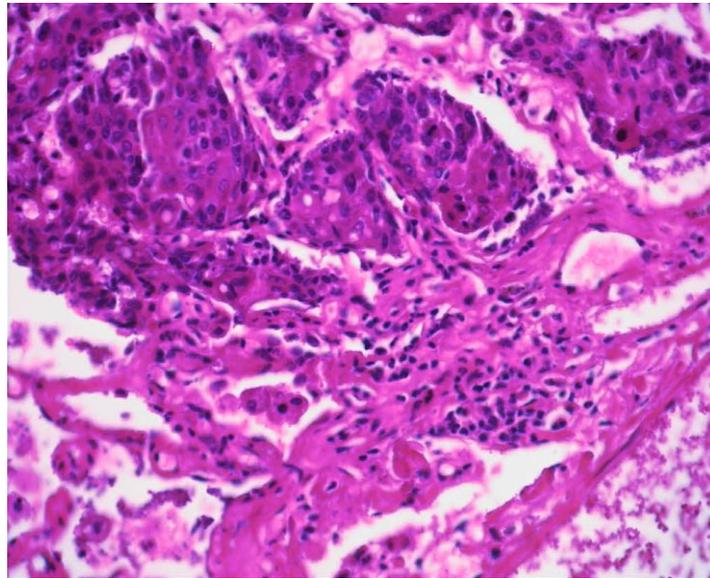


Figura 13b. Fotomicrografía de pulmón. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa H-E 40x. Ezp 2009. V-16 (STB 485). Invasión del parénquima pulmonar, por células neoplásicas pleomórficas, que tienden a formar glándulas, hacia la luz glandular presentan diferenciación escamosa. Se observa moderado infiltrado inflamatorio mononuclear.

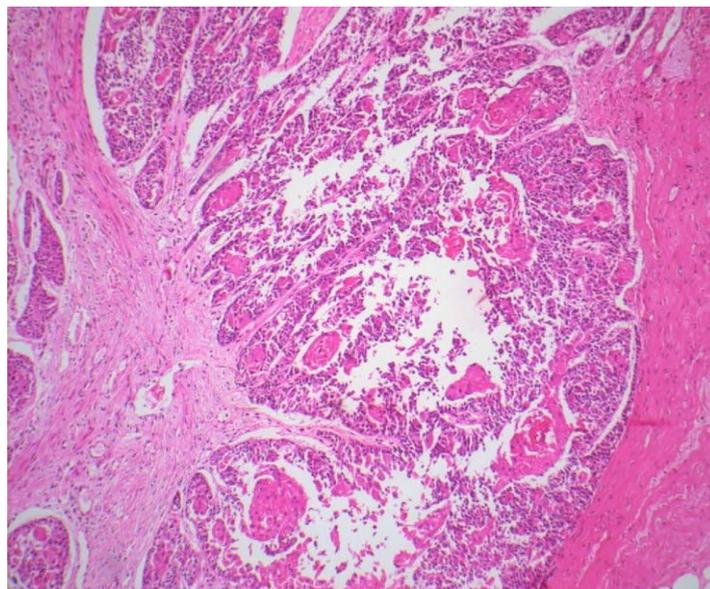


Figura 13c. Fotomicrografía de Páncreas. Carcinoma metastásico con diferenciación escamosa H-E 10x. V-16 (STB 485). Sección de páncreas rodeado por abundante

tejido conectivo, e infiltrado inflamatorio. Se observa tejido neoplásico, el cual tiende a formar glándulas, y donde se aprecia diferenciación escamosa, con moderado estroma fibro-vascular, rodeado por abundante tejido conectivo fibroso.

Las neoplasias mostradas en la figura 14, 14a pertenecían a la hembra STB 160, a quien se le realizó la necropsia en Durango, encontrándose varias neoplasias, las encontradas en pulmón se diagnosticaron como sarcoma osteogénico (fig 14a). En útero se encontró un leiomioma, la única neoplasia benigna revisada. Algunos meses previos a su muerte, había presentado una neoplasia en glándula mamaria, de la cual se pudo obtener un fragmento conservado en formol y a la revisión se clasificó como carcinosarcoma mamario figura 14.

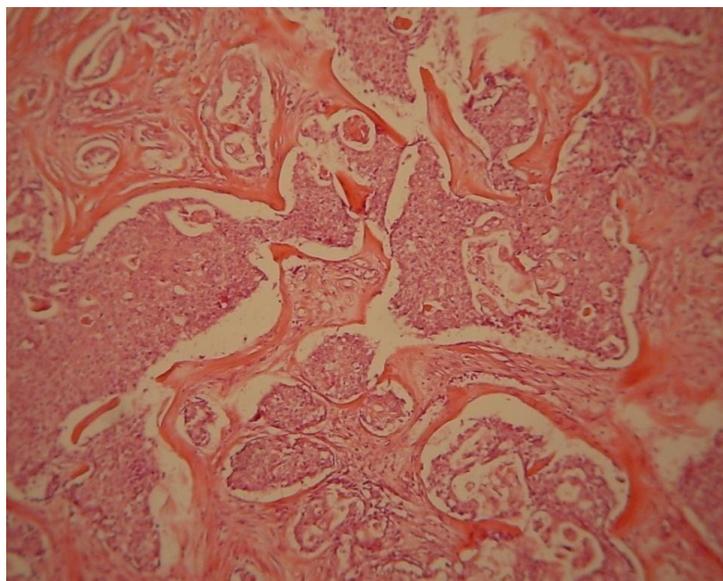


Figura 14. Fotomicrografía de glándula mamaria. Carcinosarcoma mamario. H-E 10x. 2008. V-10 (STB 160). Neoplasia en glándula mamaria, con proliferación de tejido neoplásico maligno de componentes epiteliales y mesenquimales.

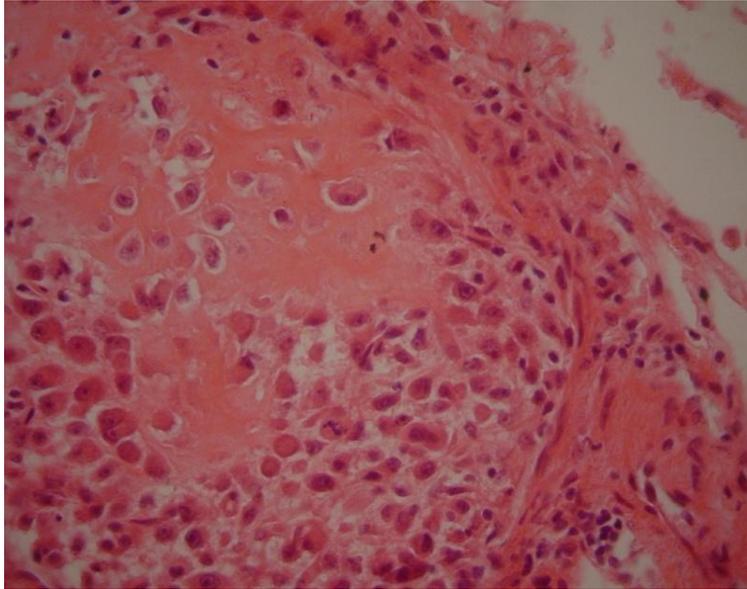


Figura 14a. Fotomicrografía de pulmón. Osteosarcoma pulmonar H-E 40x. V-10 (STB 160). Neoplasia en pulmón, donde se observan células neoplásica con marcado pleomorfismo, se aprecian células binucleadas y mitosis atípicas. Las células neoplásica están produciendo matriz osteoide

6.3 DESCARTE POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA PRESENCIA DE ELEMENTOS VIRALES EN NEOPLASIAS.

Se realizaron los estudios ultraestructurales de ACEcn X-1(STB 840), y los carcinomas con diferenciación escamosa de piel, tanto el sebáceo V-9 (STB 158), como el de células basales V- 16(STB 485). Encontrándose características típicas de las neoplasias escamosas como se muestra en la figura 15. Sin embargo en ninguna de las neoplasias estudiadas, se observó evidencia de partículas virales.

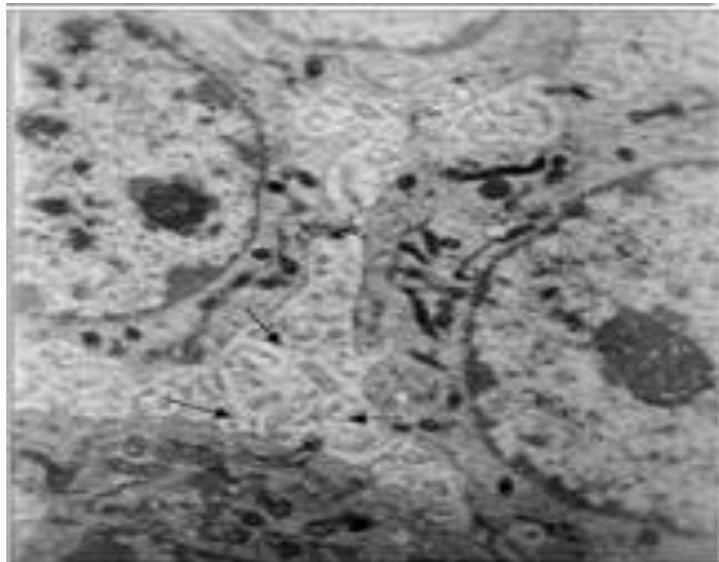


Figura 15. Electrofotografía 7000x Piel. Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa. V-9 (STB 158). Se observan numerosos puentes intercelulares (flechas), conectados por desmosomas (asteriscos).

6.4 COMPARACIÓN DEL CARIOTIPO DE PERRO DOMÉSTICO CON EL CARIOTIPO DEL LOBO GRIS MEXICANO.

Los estudios citogenéticos para evaluar el cariotipo normal del perro doméstico se realizaron en individuos machos de diferentes razas (labrador, bulldog inglés, mestizo y schnauzzer) y de 5 lobos grises mexicanos machos de distintas generaciones (V-16 STB 485, V-7 STB 150, V-9 STB 158, X-1 STB 840 y VIII-2 STB 779) y 3 hembras (VIII-1 STB 663, STB 605 no incluida en el árbol y V-10 STB 160). En principio se obtenían de 2 a 3 metafases por laminilla, una vez estandarizada la técnica, se obtuvieron de 25 a 40 metafases por laminilla.

6.4.1. Cariotipo de perro doméstico.

El cariotipo obtenido del perro doméstico, está compuesto por 38 pares de autosomas acrocéntricas, el Cromosoma X, submetacéntrico, y casi del mismo tamaño que el más grande de los autosomas (CFA1) y el Cromosoma Y, el más pequeño de todos los cromosomas como se muestra en la figura 16.

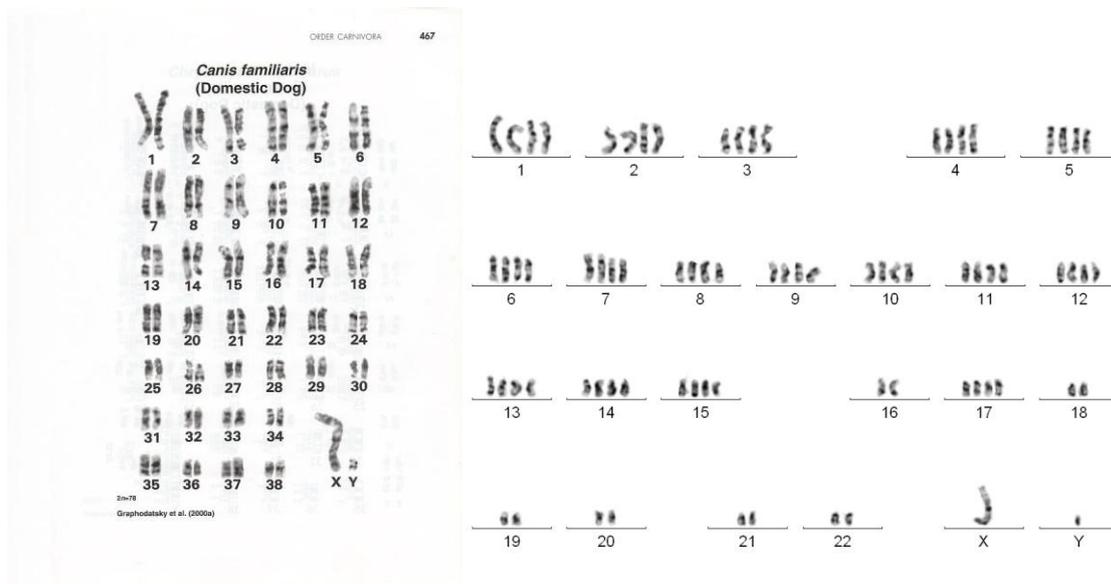


Figura 16. Imágenes Cariotipo perro doméstico

En la imagen de la izquierda se observa el cariotipo del Perro doméstico (*Canis familiaris*), como se muestra en las láminas del "Atlas of Mammalian Chromosomes. 2006. Edited by Stephen J. O'Brien, Joan C. Menninger, William G. Nash. Y en la Imagen de la derecha se observa el cariotipo de perro doméstico (Schanuzzer), realizado en el laboratorio de genética del Hospital General de México montado sobre plantilla del analizador de Imágenes Ikaros™ para 23 pares de cromosomas.

En el cariotipo del bulldog inglés, hubo metafases que se apreciaron con alteraciones numéricas, las cuales no fueron consistentes, por lo que no se contabilizaron. Cabe hacer mención que ésta muestra a las 72 hs de cosecha presentó escasas metafases por laminilla, y se observó una mayor cantidad de metafases a las 96 hs, como la que se observa en la figura 17.



Figura 17. Imagen del Cariotipo de Perro doméstico (Bulldog Inglés) a las 96 horas de cultivo. Utilizando Analizador Ikaros™ para su clasificación, donde se muestran 38 cromosomas autosómico acrocéntricos, el cromosoma X submetacéntrico y el cromosoma Y metacéntrico.

6.4.2. Cariotipo del Lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*).

El cariotipo obtenido del lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), está compuesto por 38 autosomas acrocéntricos, y un par sexual, compuesto por un Cromosoma X submetacéntrico, casi de igual tamaño que el cromosomas más largo (CLbA1) y el cromosoma Y el más pequeño de todos, como se muestra en la figura 18.

En el cariotipo de X-1 (STB 840) 2008, hubo metafases que se apreciaron con alteraciones numéricas y alteraciones en algunos cromosomas, a las 72 hs de cosecha, como la mostrada en la figura 19, donde se observan 36 autosomas acrocéntricos y alteración en 17q.

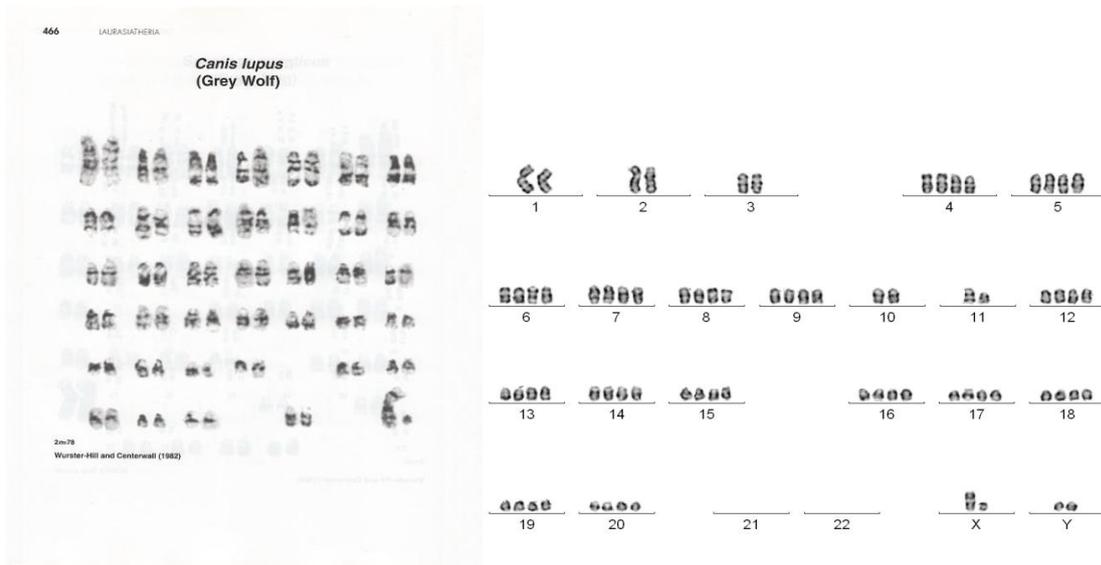


Figura 18. Imagen comparativa entre el Cariotipo del Lobo gris (*Canis lupus*) con el Cariotipo de Lobo Gris Mexicano (*Canis lupus baileyi*)
En la imagen de la izquierda se observa el cariotipo del Lobo gris (*Canis lupus*), como se muestra en las láminas del “Atlas of Mammalian Chromosomes”. 2006. Edited by Stephen J. O'Brien, Joan C. Menninger , William G. Nash. En la imagen de la derecha se observa el cariotipo de lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), realizado en el laboratorio de genética del Hospital General de México montado sobre plantilla del analizador de Imágenes Ikaros™ para 23 pares de cromosomas.

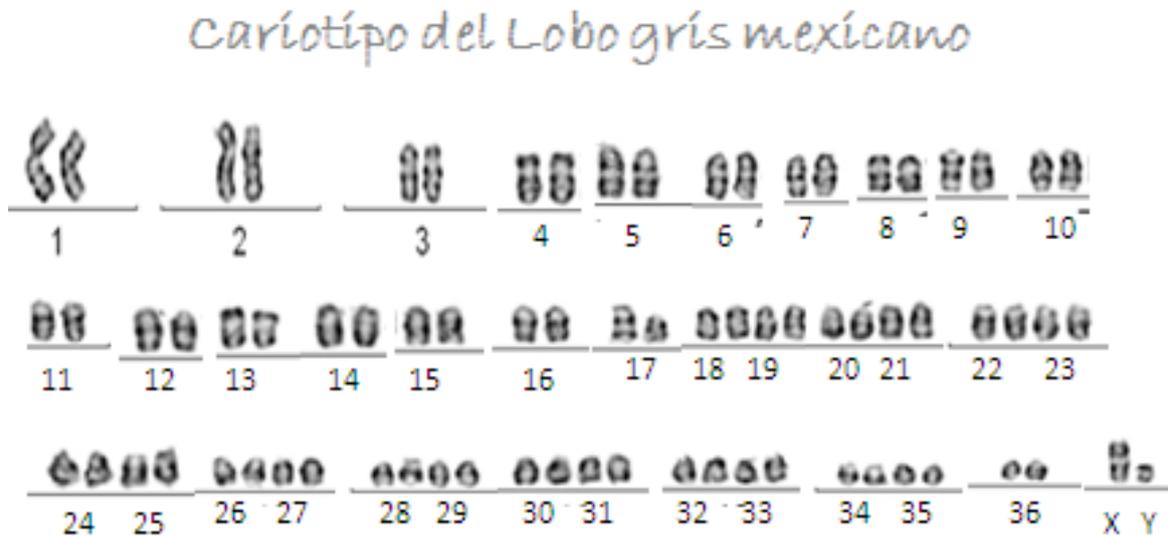


Figura 19. Imagen del Cariotipo de Lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) X-1(STB 840) a las 72 horas de cultivo con alteraciones. Cariotipo de Lobo gris mexicano, utilizando Analizador Ikaros™ para su clasificación, donde se muestran 36 cromosomas autosómicos acrocéntricos, alteración en 17q, el cromosoma X submetacéntrico y el cromosoma Y metacéntrico.

6.4.3 Hibridación *In Situ* con fluorescencia de los cariotipos de perro doméstico y lobo gris mexicano.

Para garantizar la adecuada identificación cromosómica, se realizaron dos estudios dobles de hibridación *in situ* sobre cariotipos de perro doméstico (Bulldog Inglés) y cariotipos de lobo mexicano V-10 (STB 160). Se utilizaron sondas subteloméricas de HSA 14, 20 y X y no se observó positividad, en cromosomas de perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), ni de lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*).

6.5 COMPARACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE PERRO DOMÉSTICO Y LOBO GRIS MEXICANO.

Se secuenciaron todos los fragmentos obtenidos de la PCR de *Myc*, *Tp53*, *Pten* y *Ccnd1*, de muestras consideradas testigo, de perro doméstico (Bulldog inglés) y de lobo gris mexicano (VIII-2 STB 779). Y se realizó la lectura de las secuencias obtenidas del GENE-BANK correspondientes a estos genes en *Canis familiaris* (CF). Se encontraron diferencias a las publicadas en el exón 4 de *Ccnd1*, las diferencias encontradas fueron consistentes tanto en perro como en lobo mexicano. El único gen que mostró diferencias entre las muestras de perro y de lobo mexicano fue el gen *Myc*. Donde se apreciaron diferencias en la segunda fracción del primer exón del gen *Myc*, en la visualización del producto de PCR del lobo, se obtuvieron dos bandas (500pb y 400pb), a diferencia de la observada en perro doméstico, donde solo se observó una sola banda cercana a los 500pb (fragmento esperado 444pb) figura 20. Y la segunda fracción del segundo exón (*Myc* 4) se obtuvo también diferencia en la visualización del producto de reacción, la banda denotó diferencias en la intensidad, sin apreciarse alteraciones en la secuencia del mismo (figura 21). El resto de las secuencias analizadas no presentaron diferencias entre perro y lobo mexicano, con las secuencias publicadas en el GeneBank.

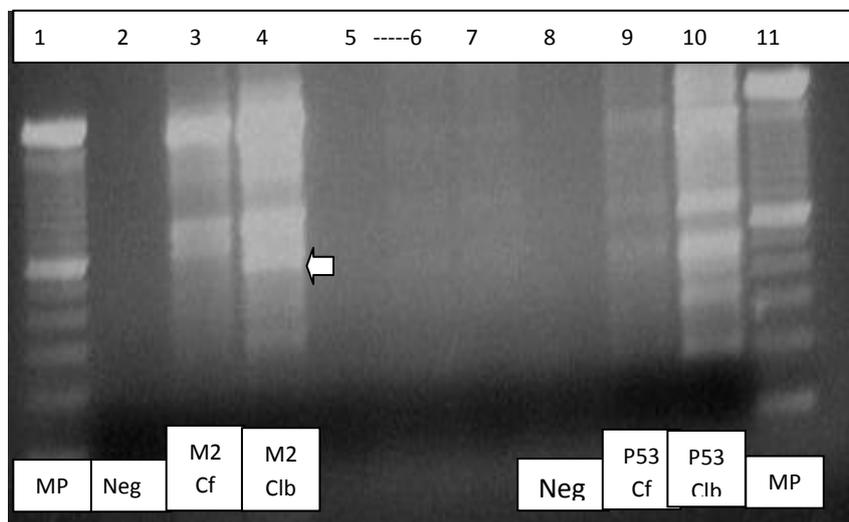


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de la reacción en cadena de polimerasa, correspondientes a *Myc* 2 (*Myc* ex 1b), *Pten* 4, *TP53* 1 en perro y lobo gris mexicano. MP: Marcador de peso (100kb), Neg: Control Negativo, M2: *Myc* 2, Cf (*Canis familiaris*), Clb (*Canis lupus baileyi*), p53: *TP53* 1. La flecha

gruesa marca la banda extra obtenida en la segunda parte del primer exón de *Myc* en la muestra de lobo gris mexicano.

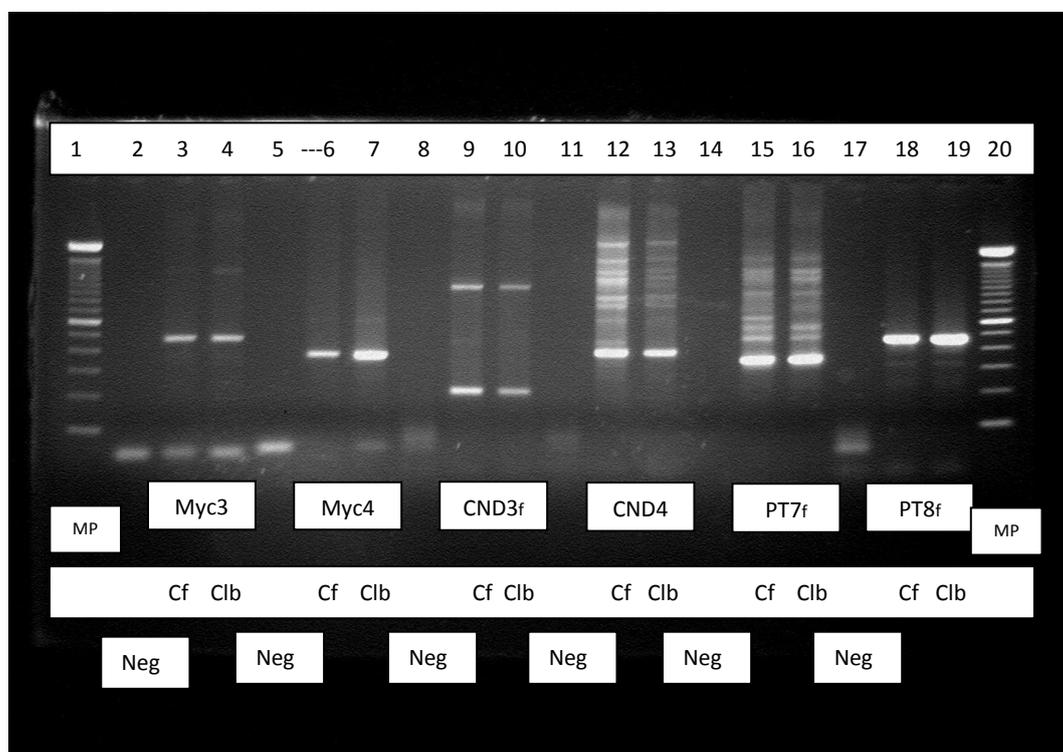


Figura 21. Gel de Agarosa al 1.5%, de los productos de amplificación de reacción, correspondientes a *Myc ex2a*, *Myc ex 2b*, *Ccnd1 ex 3*, *Ccnd1 ex4*, *Pten ex7* y *Pten ex8* en perro y lobo gris mexicano. MP: Marcador de peso (100kb), Neg: Control Negativo, Cf (*Canis familiaris*), Clb (*Canis lupus baileyi*), Myc3: *Myc 2a*, Myc4: *Myc2b*, CND3: *Ccnd1 3*, CND4: *Ccnd1 4*, PT7: *Pten 7*, PT8:PTEN8. Se observan los productos de reacción de la PCR, apreciándose el mismo marcaje entre perro y lobo. La amplificación del segundo fragmento del exón 2 de *Myc*, del lobo mexicano, presenta el mismo peso molecular y denota un marcaje mas intenso.

6.6 DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN DISTINTAS NEOPLASIAS PRESENTES EN EJEMPLARES DE LOBO GRIS MEXICANO.

De los 11 cultivos de tejido realizados, 7 correspondieron a neoplasias (confirmadas por histopatología), cuatro fueron tomados al momento de la necropsia (X-1 STB 840, V-16 STB 485, V-10 STB 160, VIII-2 STB 779) y el resto procedente de biopsias. De los cultivos, se cosechó material celular de cuatro neoplasias, dos de V-10 STB 160,

correspondiente ambas a neoplasias mesenquimales; y el tercero a neoplasia dérmica de V-16 STB 485, y el cuarto a AEcn de VIII-2 STB 779. De las neoplasias epiteliales no fue posible analizar el cariotipo tumoral.

En los cariotipos tumorales revisados, se apreciaron alteraciones en las metafases analizadas, se apreciaron tanto poliformismos, como alteraciones numéricas, siendo más frecuentes las aneuploidias que las poliploidias. De las metafases con carga genética completa, se apreciaron variaciones en los siguientes cromosomas: 3q, 5q, 8q, 11q, 12q, 13q,14q, 15q, 16q, 17q, 18q, 19q, 20q, 24q, 25q, 30q,31q, 34q, 35q, y 37q. En la Figura 22 se observa una metafase completa correspondiente a Osteosarcoma pulmonar V-10 STB 160.

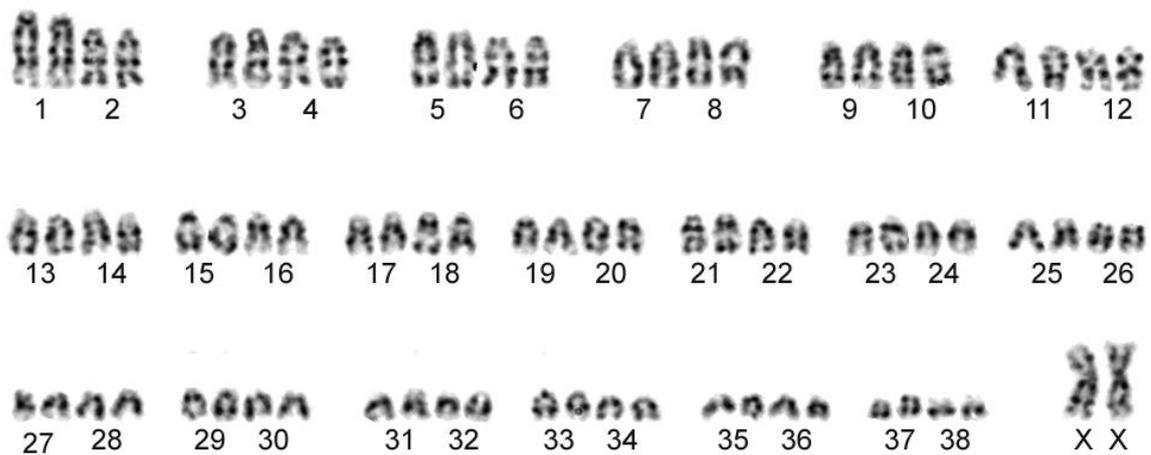


Figura 22. Estudio citogenético con bandas GTG de un osteosarcoma pulmonar en hembra de lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*). Se observa el cariotipo completo compuesto por los 38 pares de autosomas, así como el par sexual, los cuales presentan algunas variaciones, como en Clb3, Clb5, Clb8, Clb11, Clb15, Clb18, Clb25, Clb35. Sin embargo, con bandas GTG no es posible determinar translocaciones, por la dificultad de distinguir regiones características.

6.7 DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN GENES, RELACIONADOS CON DESARROLLO DE NEOPLASIAS EN EL LOBO GRIS MEXICANO.

De los genes analizados, se seleccionaron dos de los reportados alterados con mayor frecuencia en este tipo de neoplasias, *Tp53* y *Myc*. Las muestras tumorales analizadas de tejido fresco fueron: de los siguientes lobos mexicanos: X-1 STB 840, V-7 STB 142, V-9 STB 158, V-16 STB 485, V-10 STB 160 y VIII-2 STB 779. Las muestras analizadas de tejido congelado sin ningún preservado de VI-4 STB 538 y dos muestras consideradas testigo: STB 195 –no listada en el arbol genealógico- (corazón y tejido nasal) linaje McBride, V-1 STB 289 (corazón) linaje Aragón puro. Se analizaron muestras fijadas con diferentes preservadores, como glicerol 20% de VIII-2 STB 779, de formol directo: VI-3 STB 537, VI-1 STB 535, y de parafina, fijados previamente con formol VI-3 STB 537, Maicoh VI-1 535, VI-8 STB 604, V-7 STB 142, V-16 STB 485, y con solución de Schulz de V-10 STB 160 y VIII-2 STB 779. Así como de cultivo celular de V-16 STB 485 y X-1 STB 840.

6.7.1. Alteraciones en *Tp53*

Se encontraron un total de 71 alteraciones en cinco de los exones de *Tp53*, de estas las más frecuentemente observadas fueron las inserciones (35.18%), seguidas por las deleciones (28.16%), Transversiones (25.3%) y finalmente las transiciones (11.26%). En la tabla 5, mostrada a continuación se muestran los cinco exones analizados de *Tp53*, así como el listado de las muestras analizadas que presentaron mutaciones, y al final se indican los que fragmentos que no mostraron alteración. Indicando el nombre del ejemplar y su número de Studbook entre paréntesis.

Tabla 5. Alteraciones encontradas en el gen *Tp53*

Secuencia analizada	Deleciones	Inserción	Transición	Transversión
TP53 2 A1 (VI-4 STB 538)	C (intrón 13pb previo al exón) A 1067 pb		G – A (1539pb)	
TP53 3 C3 (V-7 STB 158) 2008	C (intrón 22 pb previo exón) C 1018 pb			A – T (1019pb)
Tp53 3 Ez1 (V-16 STB 485) 2008		G (intrón 23 pb previo exón)		

Secuencia analizada	Deleciones	Inserción	Transición	Transversión
TP53 3 Ez2 (V-16 STB 485) 2009	A (intrón 29pb previo exón 4) *Perdida de triplete CTCC (11-14pb) T (18 pb) C (58 pb)	A (intrón 26 pb previo exón 4) *Ins. triplete TCCTC (22 pb ex 4) T (intrón 68pb post ex 5) G (intrón 73pb post ex 5)	G – A (intrón 62 pb posterior exón 5)	*Cambio de triplete TAC – GGG 7-10pb
TP53 2 STB 792	C (intrón 5, 13, 20 pb previos exón 4)	*Triplete GGG (intrón 58pb post exón 5)		G – A (intrón 61pb post exón 5)
TP53 3 Ez2 (V-16 STB 485) 2009	C (intrón 33pb previo exón 6) *triplete GGCC (intrón 38pb previo exón 6) G (intrón 46pb previo ex 6) GG (intrón 51pb previo ex6)		TT – CC (18 pb exon 6)	
TP53 3 STB 792	C (intrón 3, 5, 9, 13, 15, 17, 23, 24 pb previo exón 6) G (intrón 1 pb previo exón 6)			
TP53 5 (VIII-2 STB 779) 2010	A (intrón 2,3pb previo exón 8)			
TP53 5 C2 (V-7STB 158) 2008	T (1PB EX 8)			
TP53 5 E2 (X-1 STB 840)		TTACG (4pb Exón 8)		A – C (6pb) G – T (13pb)
TP53 5 A1 (VI-4 STB 538)			T – C (3pb)	AGG – TTTT (intrón post ex 8 97pb)
TP53 5 COY	Secuencia	diferente **	-----	-----

Secuencia analizada	Deleciones	Inserción	Transición	Transversión
TP53 5 ES (V-1 STB 289) MISMA SEC COY	G (154pb a partir del inicio de la sec en rel COY)	T (9, 10, 13, 17, 24, 35, 42, 61, 151pb a partir del inicio de la sec rel COY) G (32pb) A (38, 99pb) *Ins triplete TAA (137pb)	A – G (163pb)	T – G (156pb)
TP53 5 Ezp (V-16 STB 485) MISMA SEC COY			A – G (7, 8pb a partir del inicio de la sec COY)	
TP53 6 C1 (V-7 STB 158) 2008		*Triplete CTTG (5pb Exon 9)		C- GG (8pb Ex9) T- A (11pb Ex 9)
TP53 6 C2 (V-7 STB 158) 2008				T – G (5pb Ex 9) C- A (intrón 56pb previo eX 9)
TP53 6 EZP (V-16 STB 485)				C – G (97 pb Ex9) T – A (112 pb Ex9)
TP53 6 EZ 2 (V-16 STB 485)			T – C (10pb Ex9, intrón 19 pb posterior ex 9)	G – T (100 pb Ex9)
TP53 6 STB 792		C (T – A (C – T (C – G (
TP53 6 ES (V-1 STB 289)		C (
TP53 1 L (VIII-2 779 sangre)	Sin alteraciones	-----	-----	-----
TP53 2 C2 (V-7 STB 158)	Sin alteraciones	-----	-----	-----

Secuencia analizada	Deleciones	Inserción	Transición	Transversión
TP53 5 LH Lobo híbrido	Sin alteraciones			
TP53 5 C1 (V-7 2008) STB 158	Sin alteraciones	_____	_____	_____
TP53 6 C3 (v-7 2009) STB 158	Sin alteraciones	_____	_____	_____
TP53 6 EZ 1 (V-16 STB 485)	Sin alteraciones	_____	_____	_____
TP53 6 E2 (X-1 STB 840)	Sin alteraciones			

6.7.2. Alteraciones del gen *Myc*

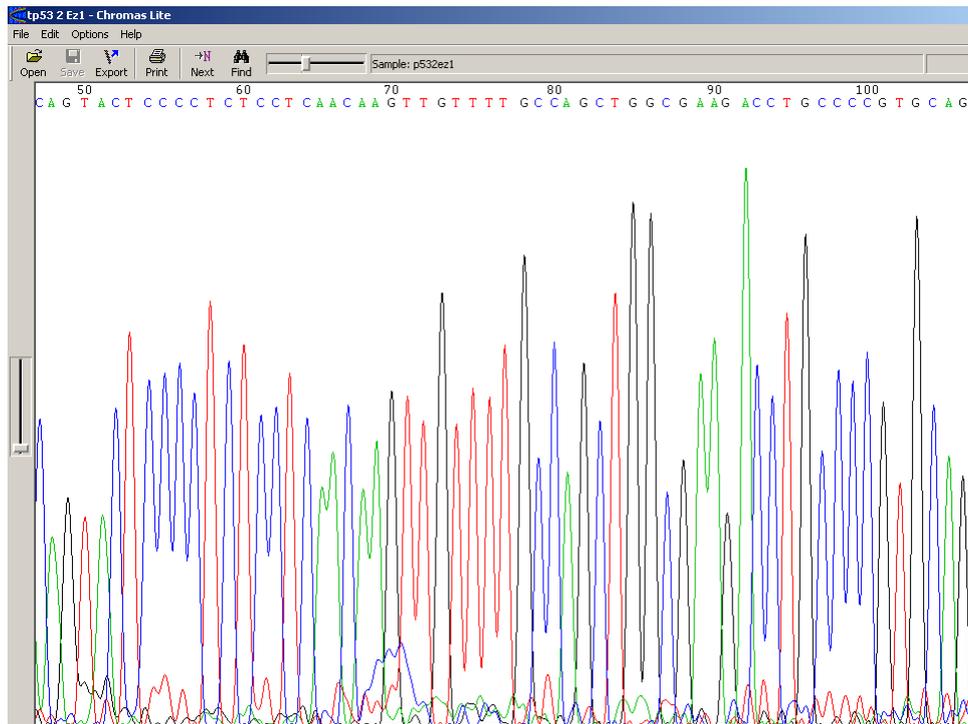
De los dos exones de *Myc*, se secuenció un fragmento exón 2, se encontraron un total de 68 alteraciones, las más frecuentes, fueron las mutaciones puntuales, y de estas las deleciones representaron el 31% del total de alteraciones, seguidas, por las inserciones, que representaron un 27%, las transversiones representaron un 20%, y las transiciones entre bases, representaron el restante 12%. Cabe hacer mención que se detectó la deleción de un fragmento de 32pb, en una de las muestras tumorales de V-16 STB 485. En la tabla 6, se muestra el fragmento delectado, así como el listado de las muestras analizadas que presentaron mutaciones, indicando el nombre del ejemplar y su número de registro (STB) entre paréntesis.

El estudio del segundo fragmento del exon 1 En la segunda parte del exón 1 (MYC 2) de la muestra procedente del Individuo VIII (STB 779) identificó alteraciones en el fragmento obtenido por la PCR, pero no fue posible secuenciar el fragmento.

Tabla 6. Alteraciones encontradas en las secuencias analizadas de *Myc*

Secuencia analizada	Deleciones	Inserción	Transición	Transversión
MYC3 A1 VI-4 (STB 538)	Intron (C-9pb, A- 2pb previo exón) Exon (A-31pb, 33pb, 51pb)	Exon (C-71pb)		A-T (234pb) T-A (254pb)
MYC3 C1 (V-7 STB 158) 2008	Intrón (C-9pb) Exón (i 32pb, 34pb, 38pb)	Exón (C72pb, 318pb)		
MYC3 Ez2 (V-16 STB 485) 2008	T 28pb, 67pb, 71pb, C 69pb, 138pb, 140pb, 141pb A 105pb, 128pb, 133pb G 147pb	C 25pb, 32pb, 158pb, 172pb Triplete CCT 150pb	C-T 30pb, 120pb, 162pb, 178pb A-G 38pb, 180pb	G-T 62pb C-G 144pb, 159pb T-A 155pb, 165pb, 184pb T-G 168pb *Cambio de triplete TCT – GGT 149pb
MYC3EZ1 (V-16 STB 485) 2008	A ,15pb, 79pb C 45pb *fragmento ccacagcaaa cctcctcaca gcccgctggt cc 81pb	T (intrón 1pb previo exón 2),27pb, 48pb, 116, 120pb, G 4pb A 23pb, 28pb T 43pb *fragmento aattttt	T - C 56pb, 59pb A – G 63pb, 76pb, 122pb	T – G 25pb T – A 33pb A – C 39pb, 44pb

En las figuras 22 y 23 se observan Imágenes de los electroferogramas obtenidos al revisar las secuencias, donde se observan las bases en la parte posterior y la gráfica identificando el color designado para cada una.



Figuras 22. Electroferograma, correspondiente al exón 2 de *Tp53* de muestra neoplásica de V-16 STB 485.

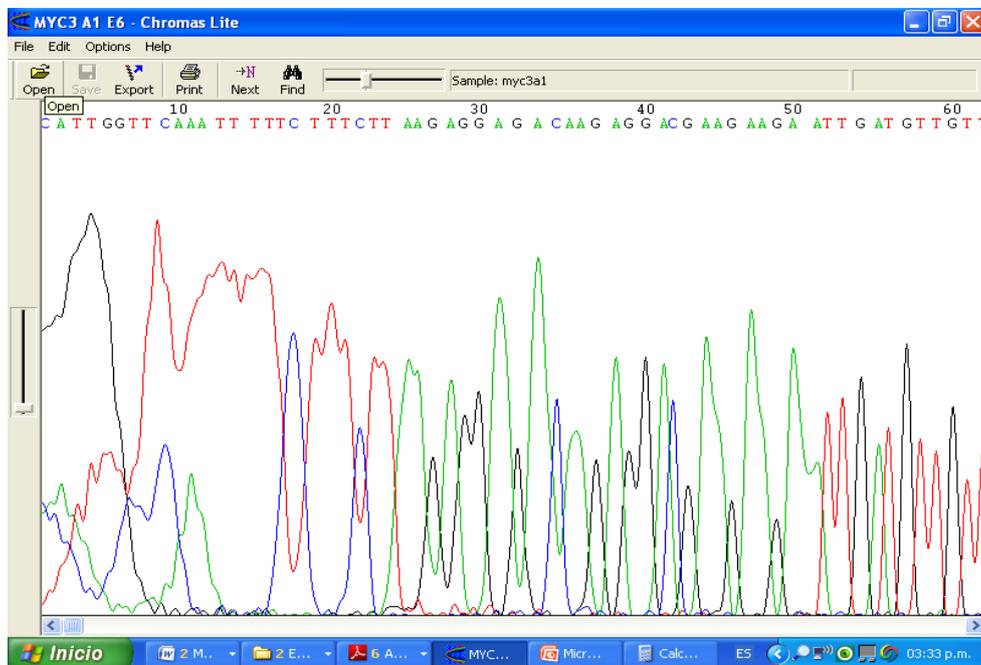


Figura 23. Sección de Electroferograma, correspondiente al exón 3 de *Myc* de muestra neoplásica de VI-4 STB 538

6.8 COORELACIÓN DE LAS MUTACIONES ENCONTRADAS CON SU EXPRESIÓN CELULAR POR INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para correlacionar las alteraciones genéticas, con su manifestación celular, se utilizó Inmunohistoquímica de c-Myc, para evidenciar la alteración en la producción proteica tumoral. Se revisaron tanto neoplasias epiteliales, como mesenquimales, correspondientes a las siguientes muestras: VI-4 (A1), V-7(C1, C3), V-16(Ezp, Ez2), V-16 2007, X-1(E2), VI-3, VI-1, VI-8 STB604, y V-10(G1), VIII-2 STB 779, y STB 663. En la tabla 7, se encuentran las muestras procesadas, con la identificación de la neoplasia, del individuo afectado con su número de registro (STB), el tipo de neoplasia que presentó, así como el resultado para la técnica de Inmunohistoquímica, para c-Myc. Se aprecia que las muestras que marcaron positivamente para c-Myc, las cuales presentaron una sobre-expresión citoplasmática y/o una sobre-expresión nuclear (Figuras 28,29, 30,31, 32, 33, 34, 35) estuvieron relacionadas con la muerte del ejemplar, apreciándose incluso positividad en muestras 2 años previos al deceso del ejemplar (V-16 2007,2008 Ez2 y 2009Ezp, figuras 33, 34 y 35). Por el contrario en las muestras analizadas que no marcaron para c-Myc, no hubo relación de la neoplasia con la muerte del individuo afectado, a pesar de que todas las neoplasias por histopatología se clasificaron como malignas (Figuras 26, 27), donde no se observó ningún marcaje, siendo incluso mayor el marcaje basal observado en el testigo de c-Myc de expresión normal, para el cual se utilizó tejido hepático, con inflamación, sin neoplasia (figura 25).

Tabla 7. Listado de resultado de la Inmunohistoquímica de c-MYC en muestras tumorales de lobo gris mexicano.

Identificación	Diagnóstico	Resultado
VI-4 (A1) STB 538	Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa	Positivo
V-7 STB 158	Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa	Negativo
V-16 (pulmón, piel) STB 485	Carcinoma con diferenciación escamosa	Positivo
V-16 (piel 2007) STB 485	Carcinoma sebáceo	Positivo
X-1 STB 840	Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa	Positivo
V-10 (pulmón) STB 160	Sarcoma osteogénico	Positivo
VI-3 STB 537	Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa	Positivo
VI-1 STB 535	Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa	Positivo
VI-8 STB 604	Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa	Negativo
VIII- 2 (STB 779)	Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa	Positivo
VIII-1 STB 663	Carcinoma gástrico	Negativo

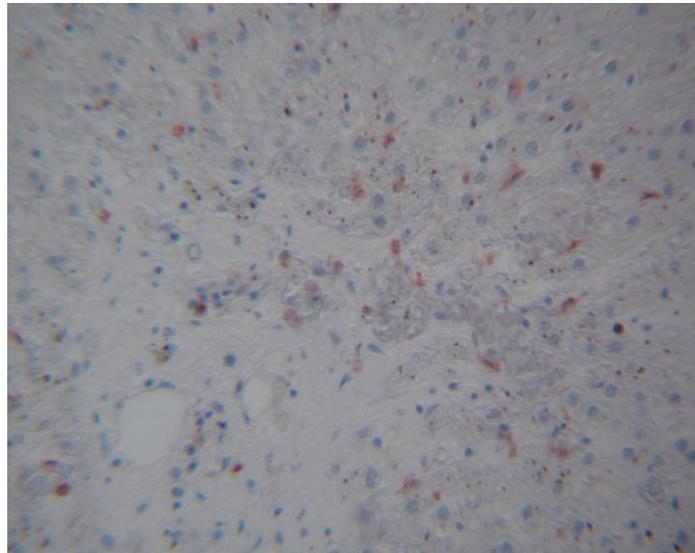


Figura 25. Fotomicrografía de Inmunohistoquímica de Hígado. Dilución 1/500, Imagen contrastada con Hematoxilina 40X. Control de expresión normal de c-MYC en tejido sin neoplasia para Inmunohistoquímica. Sección de hígado de lobo gris mexicano, con infiltrado inflamatorio y necrosis mediozonal moderada. En algunos hepatocitos, cercanos a la reacción inflamatoria se observa marcaje en citoplasma.

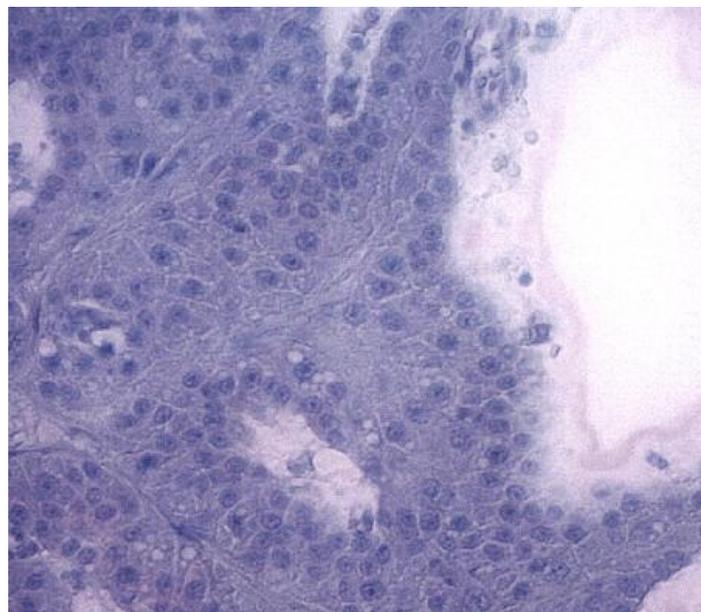


Figura 26. Fotomicrografía de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x. 1/400 Piel. Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa, VI-8 STB 604. Negativa, contrastada con hematoxilina.

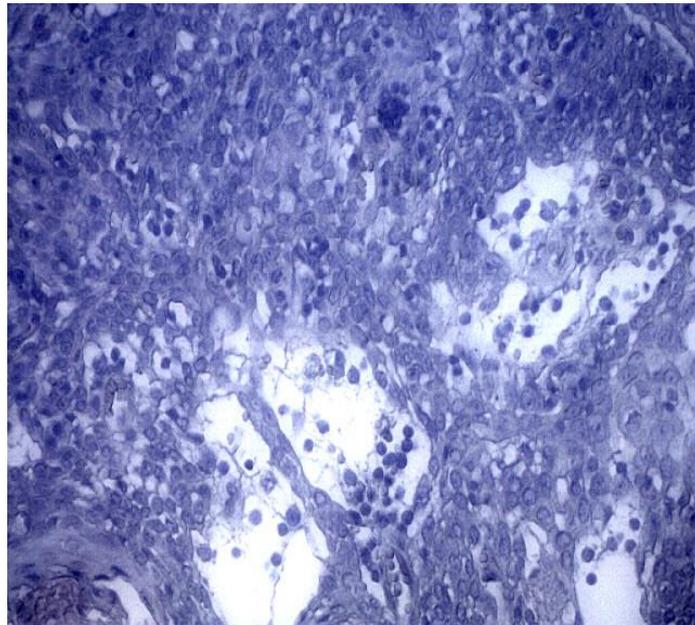


Figura 27. Fotomicrografía de inmunohistoquímica de c-Myc de Piel 40x, 1/400 en Carcinoma sebáceo con diferenciación escamosa, V5(STB 158) 2008. Negativa contrastada con hematoxilina.

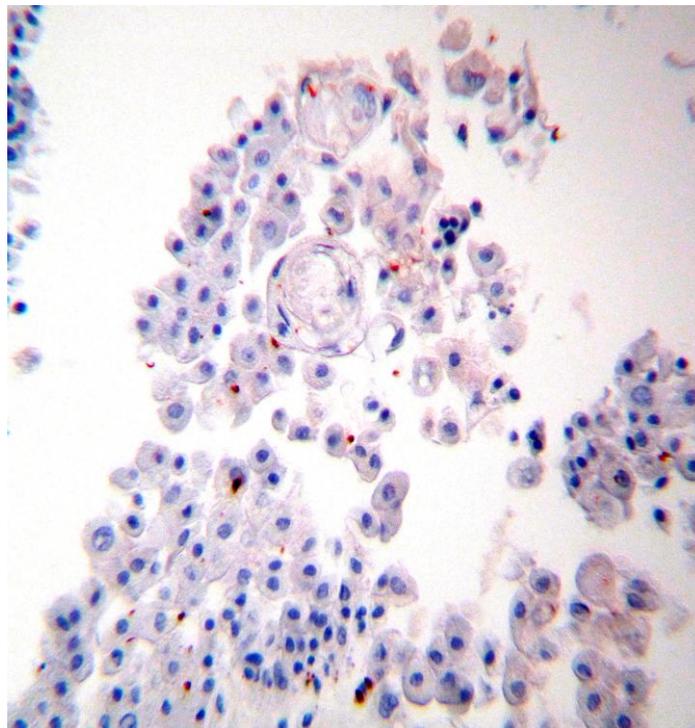


Figura 28. Fotomicrografía de Cavidad Nasal. Inmunohistoquímica c-Myc 40x. 1/400. Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-3(STB 537). Contrastada con hematoxilina Positiva, sobreexpresión de c-Myc citoplasmática.

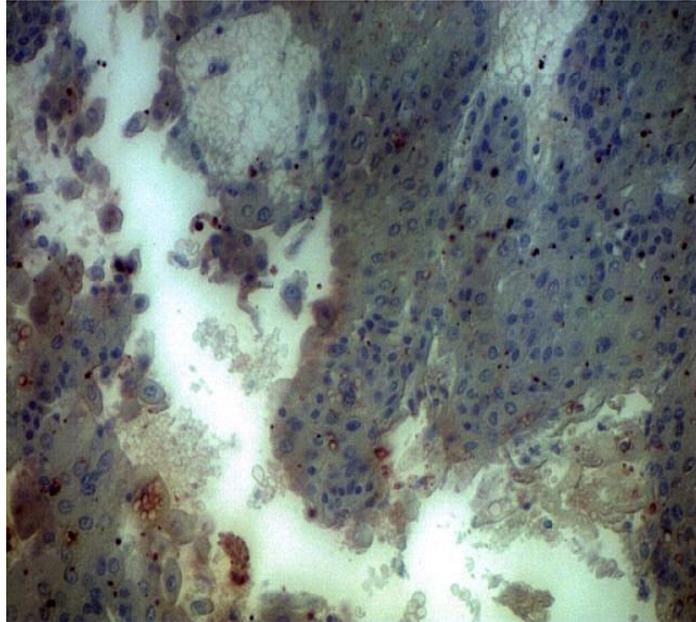


Figura 29. Fotomicrografía de Neoplasia en Cavidad Nasal 40x. 1/400. Inmunohistoquímica de c-Myc en Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-1 STB 535. Contrastada con hematoxilina, Positiva, sobre-expresión citoplasmática de c-Myc.

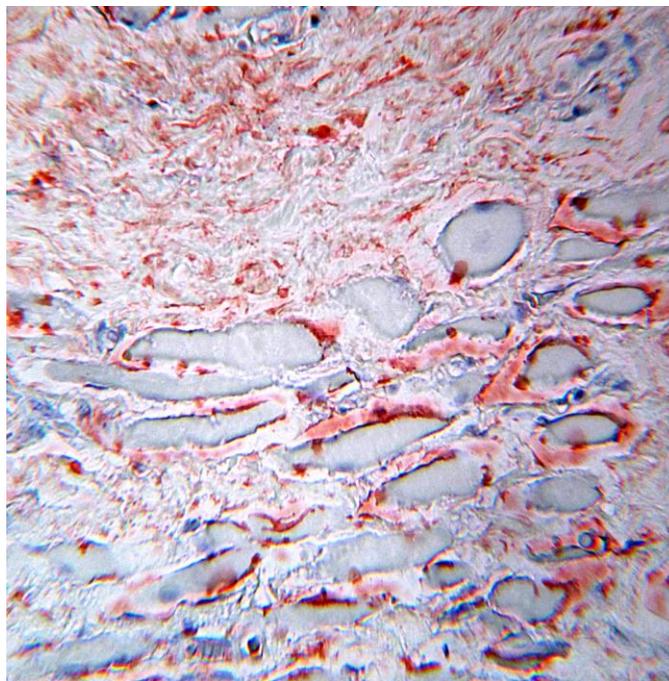


Figura 30. Fotomicrografía de Neoplasia en Cavidad Nasal 40x. 1/400. Inmunohistoquímica de c-Myc en Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa, VI-3 STB 538. Sección histológica contrastada con hematoxilina 40x. 1/400. Positividad nuclear y en tejido conectivo.

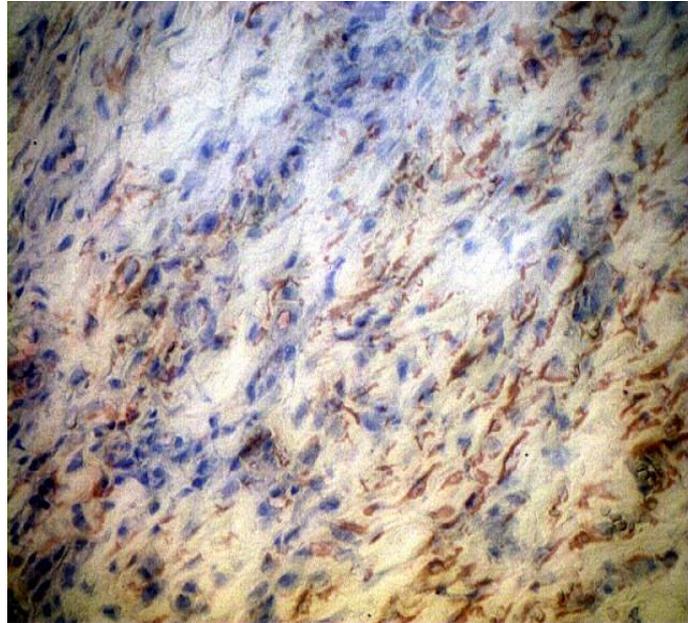


Figura 31. Fotomicrografía de Inmunohistoquímica de c-Myc 40x 1/400 Cavity nasal. Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa, VIII-2 STB 779.. Positiva contrastada con hematoxilina.

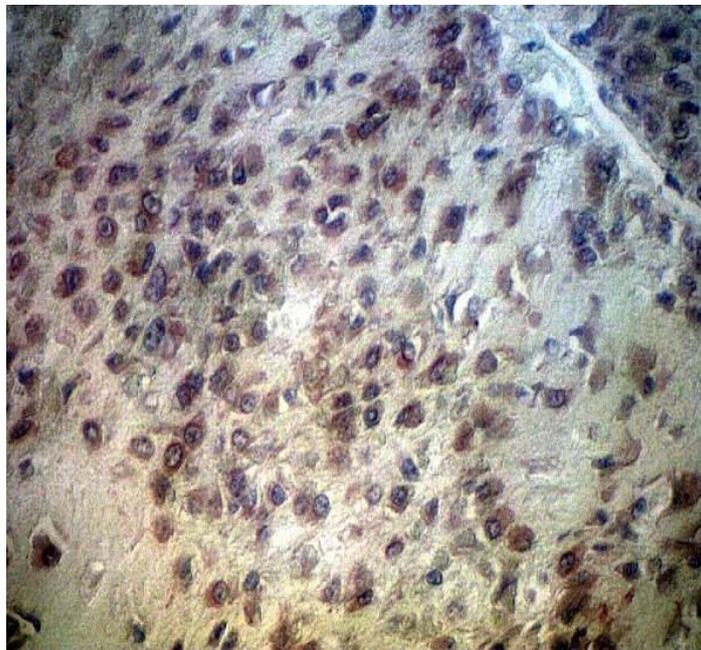


Figura 32. Fotomicrografía de Inmunohistoquímica de c-Myc pulmón 40x. 1/400. Osteosarcoma pulmonar, V-10(STB 160). Positiva marcaje citoplasmática y nuclear, contrastada con hematoxilina.

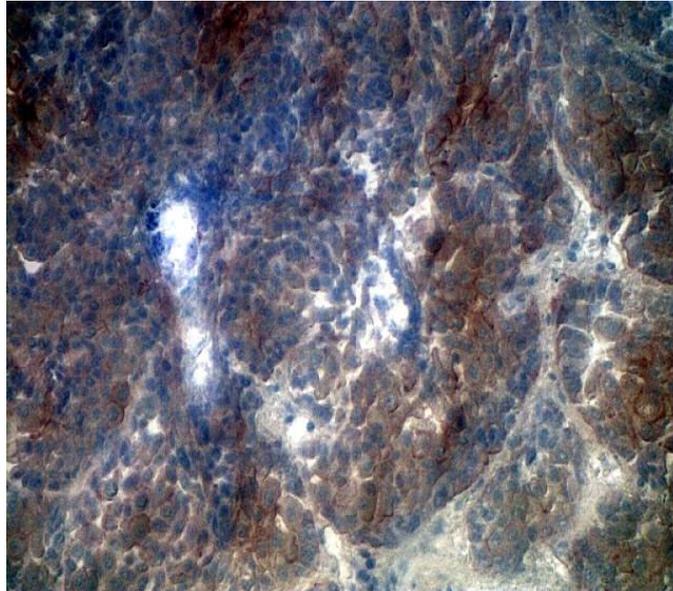


Figura 33. Microfotografía de Inmunohistoquímica de piel 40x. 1/400. Carcinoma metastásico a pulmón 2009. V-16 (STB 485). Positiva con hematoxilina.

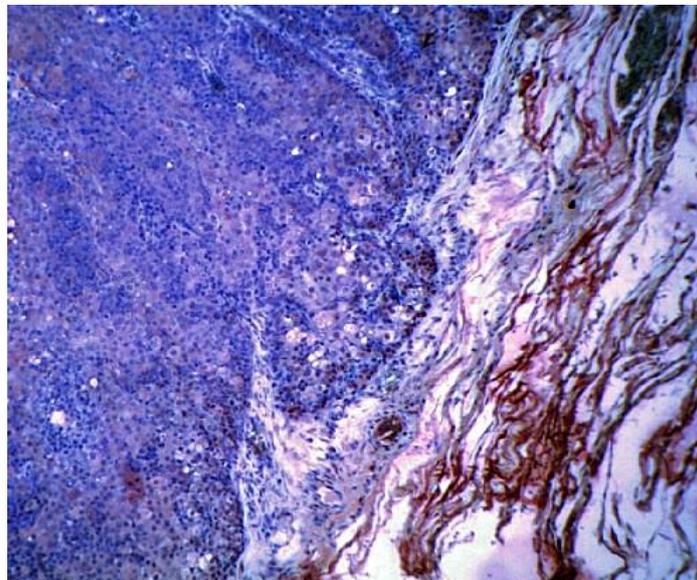


Figura 34. Microfotografía de inmunohistoquímica de Piel 40x. 1/400. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa. Recidiva dorso 2008. V-16 (STB 485). Ez1. Marcaje citoplasmático y nuclear positivo contrastada con hematoxilina.

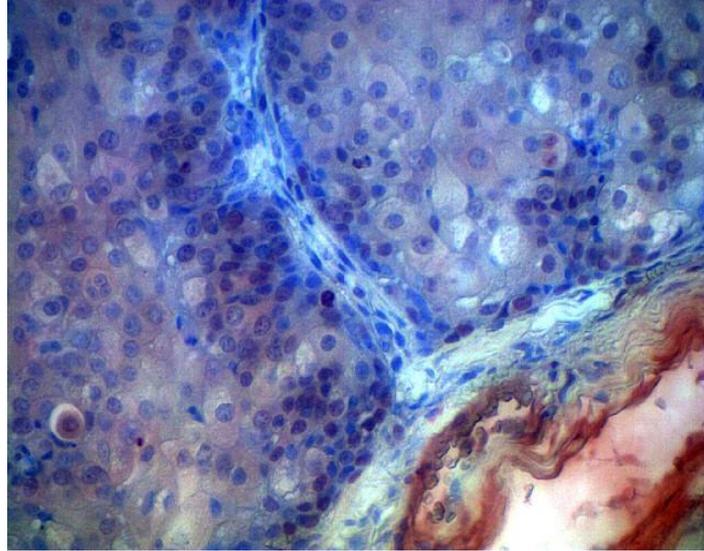


Figura 35. Fotomicrografía de Inmunohistoquímica de c-Myc piel 40x. 1/400. Carcinoma basocelular con diferenciación escamosa. Primario dorso 2007. V-16 (STB 485). Marcaje citoplasmático y nuclear positiva, contrastada con hematoxilina.

CAPITULO VII. DISCUSIÓN

Los Resultados del presente trabajo, validan parcialmente la hipótesis planteada, ya que si bien, se demostró la presencia de alteraciones tanto cromosómicas, como genéticas, en varias neoplasias, incluyendo el Adenocarcinoma con diferenciación escamosa en el lobo gris mexicano y el estudio familiar denota la presentación de un cáncer familiar con un patrón de herencia autonómico dominante, que corrobora la transmisión de al menos una alteración específica a los descendientes, no fue posible caracterizar dicha alteración.

La información recolectada de las causas de muerte, y la casuística de neoplasias presentes en la población del lobo gris mexicano que consta en los registros de la especie hasta el 2010, pone de evidencia un total de 39 individuos afectados, que representan el 3.99% de la población, en 35 individuos (3.58%) se ha considerado al proceso neoplásico en sí, como causa de muerte, lo cual queda dentro de los parámetros esperados de la incidencia de neoplasias en una población, la cual se acepta desde el 5% hasta el 10% (OMS 2007, Griner 1983). De las neoplasias reportadas en los lobos mexicanos, se observa un marcado predominio de neoplasias epiteliales, las cuales representan el 82% del total, lo que concuerda con la incidencia esperada según los estudios de neoplasias sólidas (Mitelman 2007, Das 2005); siendo neoplasias mesenquimales el 18% restante. Del total de individuos afectados por neoplasias, se aprecia un predominio del 66.6% (22/33 individuos) de machos afectados.

La neoplasia observada más frecuente en la población de lobos grises mexicanos, desde 1980 hasta el 2010, es el Adenocarcinoma naso-sinusal con diferenciación escamosa (ACEcn), encontrándose afectados en este periodo 15 individuos, lo que representa el 38.46% (15/39) del total de neoplasias, cuando la incidencia reportada en caninos domésticos es de alrededor del 0.8% del total de neoplasias, lo cual indica un incremento de 4807.5 veces (Meuten 2002, Reznik 2000, Hayes 1982). En comparación en el humano, el cáncer en senos nasales y paranasales son poco frecuentes, presentan una incidencia del 0.0005 al .0015 % del total de casos por año, agrupados en las neoplasias de cabeza y cuello, de las cuales representan menos del 3%, siendo hasta 4 veces más frecuentes en hombres que en mujeres. Del total de neoplasias de cabeza y cuello, las epiteliales son las más frecuentes, el CaCE en cavidad oral, faringe y laringe representa casi el 80% y se ha asociado a algunos virus como VPH, Epstein-Barr, herpes simplex, varicela zoster, adenovirus y citomegalovirus (Perez Escudero 2007). Sin embargo el adenocarcinoma nasosinusal es muy poco frecuente y se ha asociado principalmente a la exposición profesional al polvo de madera y a la exposición prolongada al formaldehído, con un incremento de hasta 500 veces mayor que al resto de varones no expuestos y hasta casi 900 veces más que el resto de la población, y presenta mecanismos moleculares diferentes al CaCE (Llorente 2008, Das 2005, Olsen 1986, Pérez Escudero 2007).

Si bien el incremento en la presentación en humanos por la exposición profesional es importante, se encuentra muy por debajo de la observada en el lobo mexicano. No se detectó relación aparente en la incidencia de esta neoplasia, con exposiciones ambientales en los

lobos mexicanos afectados. Cinco lobos machos (33% del total de lobos con ACEcn) vivieron por varios años, expuestos a la contaminación ambiental –polución aérea- de la Ciudad de México, la cual presenta variaciones en los niveles de contaminación por zona geográfica valorados de acuerdo a los grados IMECAS –relacionados por la cantidad de ozono y partículas sólidas difundidas en el aire- (Secretaría de Medio Ambiente, Distrito Federal). Estos cinco individuos se alojaron en tres Instituciones diferentes, detectándose tres (III-6, IV-11 y VIII-2) en la zona Noroeste de la Ciudad, la cual presenta los niveles más altos de contaminación. Solo uno de los afectados, (VI-3) se alojaba en la zona centro, la cual presenta niveles de medios a altos de contaminación de las tres zonas, y otro más (X-1) en la zona sureste de la ciudad, una de las zonas con menor contaminación. Dos individuos más se albergaron en el Norte del País (Centro Ecológico de Sonora), el cual presenta características desérticas, (altas temperaturas y baja o nula humedad relativa ambiental), las cuales predisponen a alteraciones en vías respiratorias superiores por efectos irritativos. Dos lobos más se albergaron en León Gto., con clima templado con una temperatura media anual de 22°C, humedad relativa del 40 al 60%, y baja contaminación ambiental. Seis lobos más se albergaron en diferentes Instituciones en los Estados Unidos, con características climáticas distintas, pero en su mayoría características de bosque templado (comunicación personal con los encargados de las Instituciones).

En los lobos mexicanos la incidencia de neoplasias, que siguen en frecuencia al ACEcn son: el adenocarcinoma sebáceo con metaplasia escamosa 13% (4/39), el mesotelioma 7.89%(3/39) y el carcinoma de células basales con diferenciación escamosa 5.26%(2/39). En este estudio se realizaron estudios de microscopia electrónica de transmisión para los tres tipos de neoplasias epiteliales más frecuentes, y no se detectó evidencia de infecciones virales asociadas a ninguna de estas. La incidencia de neoplasias epiteliales en los lobos mexicanos 82%(32/39), coincide con las frecuencias reportadas de hasta el 80% (Llorente 2008, Das 2005), apreciándose que de estas, en los lobos grises predominan las que tienen una diferenciación escamosa 65%(21/32).

El estudio retrospectivo de las neoplasias en los tres linajes de lobo gris mexicano, pone de evidencia que el linaje Mc Bride es el más afectado, apreciándose que a partir de la hembra fundadora (I-4) se comienzan a presentar varios tipos de neoplasias en sus crías, por lo que es este ejemplar la posible portadora inicial de inestabilidad cromosómica, considerada factor predisponente a la presentación de neoplasias (Pellman 2007). Y si bien tanto los análisis de Kimura como los estudios de Weaver (Kimura 1969, Pellman 2007) indican que estas alteraciones en algunas ocasiones pueden inhibir el crecimiento tumoral, también lo pueden inducir, hasta la fijación de una posible mutación específica, que como hipotetizamos en este caso origina la presentación de una neoplasia en particular (ACEcn) que se está heredando de manera dominante en la población, se ha presentado *de novo* al menos en tres ocasiones (III-3, IV-4, y V-6), presentándose con mayor frecuencia en machos presentando una incidencia de 78.5% (11/14) lo que podría indicar que se pueda encontrar ligado al ClbX.

La aplicación del modelo matemático para evaluar la probabilidad de que se fije un gen mutado en una población, denota que la introducción de los linajes Ghost-Ranch y Aragón, al linaje

principal McBride, presenta un efecto de rescate genético, lo cual coincide con estudios previos (Asa 2007, Hedrick 2000, Fredrickson 2007). Sin embargo la información más reciente generada del monitoreo de los lobos mexicanos liberados en USA, para intentar repoblar algunos de los antiguos parajes originales de estos, indican que la población no está aumentando –a diferencia de las mismas observaciones en su contraparte lobo gris, de poblaciones que partieron de poblaciones silvestres con mas fundadores que han crecido rápidamente y han alcanzado las metas de recuperación en un periodo aproximado a una década- lo que inclina a cuestionar la sobrevivencia de la especie (Wayne 2010). Sin embargo, a pesar de estas expectativas, el rescate genético de grandes carnívoros se puede y debe realizar, ya que son las especies más afectadas por la competencia directa con el hombre, y a pesar de que los lobos han demostrado ser una especie con capacidad de recuperarse, adaptarse y lograr el crecimiento y dispersión de su población, es también una realidad que estas mismas características implican la necesidad de contar con grandes territorios prístinos para su sobrevivencia, por lo que es importante determinar y respetar áreas libres protegidas, que garanticen la sobrevivencia de las especies silvestres de nuestro país (Wayne 2010, Ceballos 2002).

En relación a la importancia de la presentación de neoplasias en Fauna silvestre, si bien se encuentra mucha información de diversos tipos de neoplasias en varias especies silvestres, principalmente mantenidas en cautiverio (Owston 2008, Lupi 2008, Klaphake 2005, Sato 2002, Miller 2000), son en general reportes aislados de individuos afectados. Sin embargo son escasos los reportes de neoplasias que pongan en peligro la preservación de alguna especie, como el Carcinoma en cara en el demonio de Tasmania, la fibropapilomatosis de tortugas marinas, y neoplasia en ballenas belugas, entre los principales (Aguirre 2004, McCallum 2008, McAloose 2009). En el caso del lobo gris mexicano, como en el de muchas especies en peligro de extinción, la pérdida de diversidad genética origina un proceso endogámico, que ha ocasionado –igual que en las razas de perros domésticos- selección y fijación de algunos genes, y aunque en los lobos mexicanos se han evaluado los efectos inmediatos de depresión por endogamia (Asa 2007, Hedrick 2000), a largo plazo la carga genética de alelos deletéreos, derivan en altas incidencia de cáncer, así como la pérdida de variabilidad genética que ocasiona principalmente inmunosupresión, que implica falta de reconocimiento de las células tumorales en los estadios tempranos de la enfermedad (Munson 1993, Fredrickson 2007, Leberg 2008). Si bien los perros domésticos comparten el mismo número cromosómico, hay más de 400 razas diferentes con gran variación de fenotipos, que les confieren características externas particulares, y también los predispone a distintos padecimientos (Reinmann 1996, 1999, Breen 1999, Breen 2011), como alteraciones congénitas (Li 2006), alteraciones cardiacas (Jubb 1993), nefropatía juvenil en varias razas (Peeters 2000), ó predisposición a ciertos tumores como linfomas(Thomas 2002), o a sarcomas de tejidos blandos en algunas razas particulares como en el Bernés de la Montaña y el Cobrador de pelo liso, con incidencias cercanas al 50%, cuando de manera general en el resto de caninos estas presentan una incidencia del 1% (Breen 2011); o bien los predispone a susceptibilidad a ciertos fármacos, como la sensibilidad a ivermectinas descrita en Collies (Vanderlip 2009, Mealey 2001, 2002). Algunas de estas patologías se han intentado caracterizar identificando alteraciones cromosómicas específicas, tal y como se ha hecho en una gran cantidad de patologías en

humanos, o bien incluso caracterizando los genes afectados, las cuales han demostrado tener importancia diagnóstica y pronóstica, ya que mucho de estos procesos implican un serio riesgo para el bienestar de esas razas, e incluso los estudios sirven para comprender la génesis tumoral. Así se ha detectado la neurotoxicidad por ivermectinas, derivada de una mutación por delección en el gen *MDR1*; la nefropatía hereditaria o Síndrome Alport por delección del exón 9 del *COL4A5*; la leucoencefalomielopatía asociada a mutación en el citocromo b, o como similitudes encontradas en tumores cerebrales de humanos y perros (Breen 2001, Cabrera 2005, Lindblad-Toh 2005, Li 2006, Mc Neil 2000, Mitelman 2007, Mealey 2001).

Es sabido que se comparten alteraciones genéticas y cromosómicas y se considera al perro un excelente modelo para estudiar enfermedades genéticas del humano, el proceso no ha sido sencillo, ya que desde las primeras descripciones del cariotipo canino, -particularmente del perro doméstico (*Canis familiaris*)-, se acepta que es uno de cariotipos más difíciles para trabajar, de todos los mamíferos (Reinman 1999, Breen 2008). El cariotipo del lobo gris mexicano, corroboramos que igual que el del perro doméstico, está formado por 78 cromosomas; 76 autosomas acrocéntricos, parecidos en forma, que van disminuyendo gradualmente el tamaño; los cromosomas sexuales, el X submetacéntrico y el Y el más pequeño de todos, metacéntrico (Reinmann 1999, Breen 1999 y 2008). En este estudio se apreciaron alteraciones numéricas en el cariotipo del bulldog inglés, donde se observaron metafases con diferentes números cromosómicos (pérdidas), las cuales no fueron consistentes entre sí, ni por los tiempos de cosecha- por lo que no se contabilizaron, sin embargo estas alteraciones denotan inestabilidad cromosómica, cabe mencionar que este individuo tenía historial de alteraciones reproductivas -infertilidad-, lo cual en humanos se ha encontrado asociado a diversas alteraciones cromosómicas (CNIO 2009). También se apreciaron alteraciones numéricas y alteraciones en algunos cromosomas, en el cariotipo del lobo gris mexicano, sin embargo no se pudieron corroborar alteraciones consistentes en las metafases revisadas. Estas alteraciones se detectaron en los cultivos de lobo mexicano VIII-2, hasta dos años previos a la presentación de neoplasia; y también se apreciaron en el cariotipo sanguíneo de X-1, una vez detectada la neoplasia. Sin embargo utilizando técnicas citogenéticas convencionales -Bandas G-, no fue posible determinar las regiones cromosómicas traslocadas, lo cual concuerda con los estudios para la estandarización del Cariotipo del Perro (*Canis familiaris*), que acepta sólo reconocibles por técnicas convencionales los primeros 21 pares de autosomas y los sexuales (Breen 1999). Para corroborar la adecuada caracterización de los cariotipos caninos, se han desarrollado técnicas citogenéticas moleculares, como las pruebas de hibridación *In situ* con fluorescencia (FISH); sin embargo los estudios que realizamos con esta técnica no marcaron en cromosomas de perro doméstico (*Canis familiaris*), ni de lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), lo cual asociamos a que las regiones identificadas en las sondas utilizadas, son más conservadas (Reinmann 1999, Breen 1999, Breen 2008, Speicher 2005, Switonski 2008).

En los cariotipos tumorales revisados, se apreciaron alteraciones en las metafases analizadas, se apreciaron tanto poliformismos, como alteraciones numéricas, siendo más frecuentes las aneuploidias que las poliploidias. De las metafases con carga genética completa, se apreciaron

variaciones en al menos 20 cromosomas, sin embargo no fue posible distinguir translocaciones específicas, ya que por las características de los cromosomas, a pesar de estar bandeados con la técnica de rutina –bandas G-, no se pueden distinguir regiones características, a diferencia de lo que sucede en cariotipos humanos (McNeil 2000, O'Brien 2006, Reinman 1996, 1999, Speicher 2005, Tönnies 2002).

Para realizar el análisis citogenético convencional del cariotipo tumoral, se observaron muchas dificultades con los cultivos de tumores dérmicos (carcinomas y adenocarcinomas), sin embargo fue relativamente más sencillo el cultivo y de los tumores mesodérmicos (sarcoma, y leiomioma). Lo cual corrobora, las dificultades descritas en el estudio de carcinomas, lo cual se ha asociado a la importancia del sustento celular del epitelio, ya que estudios recientes en las interacciones epitelio-mesenquimales, está clarificando el rol de los fibroblastos adyacentes a los carcinomas (Wenig 200). Se ha determinado que los fibroblastos adyacentes a los carcinomas tienen un fenotipo diferente al de otras partes del cuerpo, son parecidos a fibroblastos fetales, los cuales liberan factores de crecimiento y proteasas en respuesta a las citocinas liberadas por las células epiteliales neoplásicas y los factores liberados por los fibroblastos pueden acelerar la progresión del cáncer y facilitar la movilidad celular, encontrándose también aparentemente involucrado en la evasión inmunológica de los mismos (Weinberg 2007, Science 2010). Se realizaron varios intentos por colocar células de adenocarcinoma sobre una cama de fibroblastos fetales humanos, que dieran sustento a la neoplasia, sin embargo los cultivos tumorales se contaminaron en la toma de la muestra y no se pudo lograr el crecimiento. En la última muestra obtenida de adenocarcinoma naso-sinusal se realizaron dos cultivos primarios, uno de la porción proliferada (epitelio) y otro donde se colocó una mayor parte de estroma tumoral, esta segunda muestra presentó mejor crecimiento, sin embargo la adición de diferentes mitógenos y co-adyuvantes a las muestras, mejoraron bastante la sobrevivencia -desde 1 y hasta 3 meses- y sobretodo la proliferación (cantidad y velocidad de crecimiento) celular neoplásica, lo que corrobora prácticamente la interacción epitelio-mesenquimal, además de indicar una alta demanda energética celular de las neoplasias.

En este estudio pudimos comprobar las dificultades descritas en los estudios citogenéticos de neoplasias sólidas, tanto en las técnicas en el cultivo, como en el análisis de las alteraciones cromosómicas observadas, ya que aunque fueron importantes en las neoplasias estudiadas, no se pudieron caracterizar, y se reporta que es precisamente la complejidad de las mismas, lo que dificulta identificar las anormalidades presentes (Mitelman 2007, Albertson 2003). El estudio citogenético de neoplasias sólidas, benignas y malignas, representan cuando mucho el 27% de todas las anormalidades citogenéticas tumorales descritas, es decir existe actualmente menos información de las neoplasias malignas más frecuentes -los carcinomas-, de la que existía hace 20 años de las neoplasias hemáticas humanas, que son las neoplasias más estudiadas hasta el momento (Mitelman 2007). Y aunque se menciona que ciertas alteraciones cromosómicas se consideran eventos iniciales en la génesis tumoral, entre las que se incluyen alteraciones en ploidias, ganancias o pérdidas de cromosomas individuales o de porciones cromosómicas, todas muy frecuentes en cáncer, –como las observadas en el estudio

citogénético neoplásico del lobo mexicano- sigue siendo controversial si estas alteraciones son precursoras del cáncer, o bien consecuencia de este (Mitelman 2007, Pellman 2007, Albertson 2003).

Se ha determinado que la inestabilidad cromosómica es factor predisponente de varios tipos de neoplasias apreciándose aumento en la incidencia de neoplasias de hasta 3 veces en individuos que las presentan, hecho que se comprobó en este estudio, donde se realizaron estudios citogénéticos sanguíneos de individuos en diferentes estadios, previos a la aparición de algún proceso tumoral visible y posteriormente durante la fase de inicio del proceso tumoral –una vez detectado- así como en etapas terminales del mismo, y la principal consistencia observada fue la inestabilidad cromosómica desde el inicio, lo cual en un principio se le atribuyó a la estandarización de las técnicas, más que a un proceso propio de los individuos estudiados (Pellman 2007).

Sin embargo los hallazgos cromosómicos más frecuentemente observados en las neoplasias, fueron principalmente pérdida de cromosomas, es decir alteraciones cromosómicas completas y complejas. No se pudo corroborar si existen alteraciones específicas en los tejidos previos a la presentación de alguna neoplasia, (cavidad naso-sinusal) ya que el material obtenido, no tuvo la calidad necesaria para su estudio.

La caracterización de las alteraciones cromosómicas, brinda información muy valiosa para determinar genes candidatos en el inicio y desarrollo de las neoplasias; puesto que las razas de perros representan poblaciones genéticamente homogéneas, permiten realizar evaluaciones rápidas y relativamente fáciles de los genes involucrados en diversas patologías, como la identificación de genes asociados a cáncer (Breen 2010). Para determinar los genes que se analizaron en este estudio se realizó una búsqueda bibliográfica de genes frecuentemente alterados en diversas neoplasias en perros, así como posibles genes candidatos en ACEcn en humanos. Se secuenciaron todos los fragmentos obtenidos de la PCR de *Myc*, *Tp53*, *Pten* y *Ccnd1*, de muestras consideradas testigo, de perro doméstico (Bulldog inglés) y de lobo gris mexicano (VIII-2 STB 779), pero puesto que este presentó ACEcn posteriormente se utilizaron como testigo muestras de V-1 STB 289, ejemplar de linaje Aragón puro y de VI-6 STB 195 linaje McBride puro. Se realizó la lectura de las secuencias obtenidas del GENE-BANK correspondientes a estos genes en *Canis familiaris* (CF). Se encontraron diferencias a las publicadas en el exón 4 de *Ccnd1*, las diferencias encontradas fueron consistentes tanto en perro como en lobo mexicano. El único gen que mostró diferencias entre las muestras de perro y de lobo mexicano fue el gen *Myc*. Diferencias en la segunda fracción del primer exón del gen *Myc* en la visualización del producto de PCR, en el lobo se obtuvieron dos bandas (500pb y 400pb), a diferencia de la observada en perro doméstico, donde solo se observó una sola banda cercana a los 500pb (fragmento esperado 444pb), además de apreciarse diferencia en la visualización del producto de reacción de la segunda fracción del segundo exón (*Myc* 4), - aumento en la intensidad, que puede denotar sobre-expresión del mismo, ya que no se observaron alteraciones en la secuencia del mismo. El resto de las secuencias analizadas no presentaron diferencias entre perro y lobo mexicano, con las secuencias publicadas en el GeneBank.

En las muestras neoplásicas se encontraron un total de 71 alteraciones en cinco de los exones de *Tp53*, y 68 alteraciones en un solo exón del *cMyc*. Las alteraciones observadas en *Tp53* con mayor frecuencia fueron las inserciones (35.18%), seguidas por las deleciones (28.16%), transversiones (25.3%) y finalmente las transiciones (11.26%). Las alteraciones más frecuentes en *cMyc*, fueron las mutaciones puntuales, y de estas las deleciones (31%) encontrándose en la muestra de V-16 deleción de un fragmento de 32pb, seguidas por inserciones (27%), transversiones (20%), y transiciones (12%). Hasta el 2008 se reportaban 83 genes diferentes descritos en tumores malignos sólidos, en 71 fusiones de genes. Por las características descritas previamente, el grupo más estudiado es el de neoplasias mesenquimales, de los cuales se han descrito 41 fusiones de genes en 17 diferentes tipos de sarcomas. Se creía que las fusiones de genes y las anomalías cromosómicas balanceadas, comunes en los desórdenes hemáticos (LMC 100% de fusión BCR-ABL1), no tenían relevancia en la patogénesis de los carcinomas (Albertson 2003, Mitelman 2007); Sin embargo el estudio del carcinoma prostático, - neoplasia más frecuente en el tracto reproductor del hombre- y algunos otros carcinomas (Ca de células pequeñas pulmonar), están rompiendo los paradigmas previamente planteados al respecto (Mitelman 2007, Fröhling 2008). Las alteraciones encontradas en *cMyc* en el lobo gris mexicano, nos inclinan a considerarlo como posible precursor de alteraciones neoplásicas, ya que se encontraron alteraciones en muestras sanguíneas, previas a la presentación de neoplasia, además de apreciarse un gran número de alteraciones en las neoplasias, lo cual coincide con las alteraciones detectadas por MLPA en ACEcn (Llorente 2008).

Para correlacionar las alteraciones genéticas, con su manifestación celular, se realizó Inmunohistoquímica de c-Myc, para evidenciar la alteración en la producción proteica tumoral. Se revisaron neoplasias epiteliales y mesenquimales, correspondientes a muestras de VI-4 (A1), V-7(C1, C3), V-16(Ezp, Ez2), V-16 2007, X-1(E2), VI-3, VI-1, VI-8 STB604, y V-10(G1), VIII-2 STB 779, y STB 663. De las muestras positivas para c-Myc, las que presentaron sobre-expresión citoplasmática y/o sobre-expresión nuclear estuvieron relacionadas con la muerte del ejemplar, apreciándose incluso positividad en muestras 2 años previos al deceso del ejemplar (V-16 2007,2008 Ez2 y 2009Ezp). Por el contrario las muestras analizadas que no marcaron para c-Myc, no tuvieron relación con la muerte del individuo afectado, a pesar de que todas las neoplasias por histopatología se clasificaron como malignas. Lo que nos lleva a considerar a c-Myc como marcador de progresión y pronóstico desfavorable tumoral en las neoplasias de la especie. Y queda pendiente por realizar pruebas inmunohistoquímicas con *Tp53*, *Pten* y *Rb*, los cuales también podrían predisponer a la aparición de cáncer, al estar involucrados en inestabilidad cromosómica (Pellman 2007).

En base a los hallazgos obtenidos en este estudio, y la bibliografía consultada, sería conveniente realizar estudios moleculares posteriores con algunos genes específicos como *CENP-E*, (proteína centromérica E) que interviene en la disgregación cromosómica encontrado frecuentemente alterado en inestabilidad cromosómica (Pellman 2007). *PIK3CA* localizado en el cromosoma CFA34, el cual se ha asociado a una gran cantidad de neoplasias caninas, como en la leucemia mieloides aguda, y crónica, en apoptosis, en receptores de linfocito B, en cáncer colo-rectal, endometrial, gliomas, melanoma, cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer

prostático y pancreático (Switonkski 2008). *EGFR* (Factor de receptor de crecimiento epidérmico) el cual se localiza en el CFA18, y se ha asociado a proliferación celular epitelial (Buvinic 2007), en la revisión de cariotipos tumorales del lobo mexicano, se observaron alteraciones en los cromosomas CLb18 y CLbA34, los que podrían corresponder a alteraciones en estos genes.

También sería conveniente considerar otros posibles genes como *PTP4A3* (Protein tyrosine phosphatase type IV A member 3), *PDCD8* (Factor inductor de Apoptosis asociado a Mitocondria AIFM1), *TNRFSF* (Gen que codifica para la Super Familia de Receptores para el Factor de Necrosis tumoral), *RECQL4* y *LMO2* BCL2 (B Cell Lymphoma 2), IL13 (InterLeukine 13), ABCB1 (ATP-binding Cassette Transporters1) y RB1 (Retinoblastoma 1), PIK3CA (Phospatidiylinositol 3-cinasa catalítica alfa) y CDH1 (Cadherina 1, CD324) encontrados alterados en ACEcn y F3 (factor de coagulación III-tromboplastina) asociado principalmente al efecto inflamatorio en la carcinogénesis (Holmila 2008, Llorente 2008 Ariza y Cobos 2003, Rodrigo 2000). A pesar de la incidencia de susceptibilidad a cáncer en tumores por alteraciones en *BRCA1* en humanos, estudios en perros demuestran que este gen se encuentra poco involucrado en los tumores caninos (Sugiura 2006). Y a *p19/ARF*, el cual demostró detener el crecimiento celular *in vitro*, por lo que se podría considerar como posible candidato en terapia génica a las neoplasias (Pellman 2007).

Como apoyo al diagnóstico patológico tradicional, desde hace varias décadas se utilizan técnicas inmunohistoquímicas, en el diagnóstico en humanos, sin embargo en patología diagnóstica veterinaria no son tan comunes, principalmente por la falta de anticuerpos específicos. Sin embargo se han utilizado con éxito una gran cantidad de anticuerpos que presentan reactividad cruzada con los antígenos humanos y animales (Sueiro 2005). En algunos procesos tumorales, se ha determinado conveniente realizar además del estudio histopatológico completo, el uso tanto de inmunohistoquímicas, como técnicas de Hibridación *in situ*, como en el caso de detectar alteraciones de *HER2*, - también conocido como *ErbB2* -oncogén localizado en el HSA17- asociado a progresión y evolución desfavorable de cáncer de mama (Cabrera 2005, Morales 2008, Uribe 2003). Por lo que el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, ha determinado que el diagnóstico debe incluir al menos dos de las tres técnicas mencionadas (Cabrera 2005, Morales 2008, Uribe 2003). Por lo que es conveniente que se utilice el mismo criterio en veterinaria, y en el caso de neoplasias de lobo gris mexicano, el uso de inmunohistoquímica de *c-Myc* como marcador de evolución y pronóstico desfavorables al estar sobre-expresado en núcleo y citoplasma.

Los esfuerzos por conservar al lobo gris mexicano, han mantenido una vigilancia estrecha en los individuos mantenidos en cautiverio, manteniéndose los registros de las parejas reproductoras, las crías, grado de parentesco y porcentajes de consanguinidad, de la misma forma se lleva el registro de la mortalidad y en la mayoría de los casos, de las causas del deceso. El Plan de Supervivencia de la Especie (SSP) del lobo gris mexicano, es un claro ejemplo del trabajo organizado y sistemático que se ha realizado con esta especie. Los datos recolectados proporcionan una gran fuente de información para estudios posteriores, como

los utilizados en este estudio en relación a las causas de muerte desde el inicio del programa.
(Siminsky 2005, 2007, 2008, 2009).

CAPITULO VIII.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El cariotipo del Lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), queda descrito como 38 autosomas acrocéntricos, y un par sexual, compuesto por un Cromosoma X submetacéntrico, casi de igual tamaño que el cromosomas más largo –el autosoma 1- (CLbA1) y el cromosoma Y, es el más pequeño de todos los cromosomas metacéntrico.
2. El estudio de las neoplasias presentes en los individuos de lobo gris mexicano, pertenecientes al programa de conservación de la especie, indican que la incidencia se encuentra dentro de los parámetros esperados (3.99%). Sin embargo se observa una alta incidencia (38.46%-) de Adenocarcinoma nasosinusal con diferenciación escamosa-, el cual se está heredando de manera dominante en la población, afectando principalmente a machos (80:20).
3. La introducción de dos linajes –Aragón y Ghost Ranch- denota un efecto de rescate genético en la población, considerando que la inestabilidad cromosómica se transmite del linaje McBride. Sin embargo las retrocruzas con McBride, están derivando en la presentación de esta neoplasia (ACEcn) en particular.
4. Por lo que continúa siendo importante realizar un estudio más detallado para caracterizar a detalle las alteraciones citogenéticas presentes en las neoplasias de los lobos mexicanos, principalmente ahora que el linaje McBride se encuentra inmerso completamente en los linajes Ghost Ranch y Aragón.
5. El Adenocarcinoma nasosinusal con diferenciación escamosa, no denota evidencia de infección viral previa. Podría asociarse a efectos irritativos constantes y la pérdida de variabilidad genética que deriva en pérdida de Heterocigocidad inmunológica.
6. La presentación del Adenocarcinoma Nasosinusal con diferenciación escamosa es el primer reporte de Cáncer familiar en lobo gris mexicano y el primer reporte de Cáncer familiar en fauna silvestre.
7. Los estudios moleculares realizados a las neoplasias presentes en lobos mexicanos, indican que las alteraciones genéticas detectadas en *TP53*, *PTEN* y *CND1* son derivados del proceso neoplásico en sí.
8. Las alteraciones presentes en *c-MYC* en algunos casos se observaron previas a las neoplasias y podrían ser desencadenantes de las mismas.
9. La Inmunohistoquímica de *c-Myc*, probó ser útil como marcador para progresión y evolución desfavorable de neoplasias escamosas del lobo gris mexicano, cuando se encuentre sobre-expresado en citoplasma y/o presente en núcleo.
10. El realizar inmunohistoquímica de *cMyc* en cualquier neoplasia con diferenciación escamosa, puede ayudar a seleccionar la mejor terapia en cada caso.
11. Es conveniente continuar realizando estudios inmunohistoquímicos de otros genes como *Rb*, *Pik3ca*, *Tp53* y *Pten* que pudieran brindar información útil en la carcinogénesis en los lobos grises mexicanos.
12. En apoyo al Programa de Conservación del Lobo gris mexicano, es conveniente realizar un estudio molecular de *cMYC* en la población, lo que podría apoyar en la selección de parejas reproductoras.

13. Aunque en algunos lugares se utilizan métodos múltiples de detección en la patología veterinaria, principalmente en animales de compañía, el uso de técnicas como hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, PCR y microscopía electrónica, han sido de mucha utilidad en el estudio de enfermedades familiares en el lobo gris mexicano. Por lo que estas técnicas deberían ser incluidas en la práctica diagnóstica cotidiana, como pruebas complementarias al diagnóstico histopatológico tradicional, en especies de fauna silvestre.

CAPITULO IX.

REFERENCIAS

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. Inmunología celular y Molecular. Quinta Edición. Saunders. Elsevier. 2007.
2. Aguirre Alonso, et al. Conservation Medicine. 2002
3. Alberts B, Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th Ed Garland Science. Taylor & Francis Group. 2002
4. Albertson Donna G., Collins Colin, McCormick F., Gray J.W. Chromosome aberrations in solid tumors. Nature Genetics. August 2003. Vol 34. Number 4. Pp369-376.
5. Alison Malcom R. Cancer. 2001. Encyclopedia of life Sciences. Nature Publishing Group
6. Aljanabi Salah M., and Martinez Iciar. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 22 pp 4692-4693.
7. Ariza Cobos M., Llorente Pendás et al. Acta Otorrinolaringol Esp. 2003 54: 23-30
8. Asa C., Miller P., Agnew M., Rebolledo J.A.R., Lindsey L., Callahan M. & Bauman K. Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. Animal Conservation. 2007. Vol 10. Pp326-331.
9. Bell R.J., Lees G.E., Murphy K.E. X chromosome inactivation patterns in normal and X-linked hereditary nephropathy carrier dogs. Cytogenet Genome Res 122: 37-40. 2008.
10. Bockmühl Ulrike, Schlüns Karsten, Küchler Ingeborg, Petersen Simone and Petersen Iver. Genetic Imbalances with impact on Survival in Head and Neck cancer patients. American Journal of Pathology, vol 157, No 2. 2000.
11. Boudewijn J.M. Braakhuis, C. René Leemans, Ruud H. Brakenhoff. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. J Oral Pathol Med. 2004 33: 317-322
12. Breen, Matthew, PhD. C.Biol. M.I.Biol. Canine array- CGH.
13. Breen, Matthew. Molecular Cytogenetics.
14. Breen, Matthew. Canine Cytogenetics from band to basepair. Cytogenet Genome Res. 2008 ; 120(1-2): 50-60.
15. Breen, Matthew. Cytogenetic Investigation of Canine Soft Tissue Sarcomas and Histiocytic malignancies. Informed Consent. 2011
16. Bronson Ellen, Bush Mitchell, Viner Tabitha, Murray Suzan, Wisely M. Samantha, Deem Sharon. Mortality of Captive Black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) at Smithsonian's National Zoological Park, 1989-2004. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 38(2):169- 176, 2007.
17. Buvinc S, Bravo-Zehnder M, Boyer JL, Huidobro-Toro JP, González A. Nucleotide P2Y1 receptor regulates EGF receptor mitogenic signaling and expression in epithelial cells. J Cell Sci. 2007 Dec 15;120 (Pt 24):4289-301
18. Cabrera Morales, C. M. Estudio comparativo de la amplificación de Her2/neu mediante FISH y PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama. Oncología (Barc.), vol.28, n.10 pp. 26-30. ISSN 0378-4835. 2005
19. Ceballos G, Arroyo-Cabrales J y Medellín R. Mammals of Mexico: Conservation, Distribution and Conservation Status. Occasional Papers. Museum of Texas TECH University. Num 218. Dec

- 2002.
20. Ceballos Gerardo, Ehrlich Paul. Mammal Population losses and the extinction crisis. *Science* Vol. 296. May 2002.
 21. Cerda A.A., Soberón F.M. Análisis de la población certificada del lobo mexicano y lineamientos para su manejo genético y demográfico. Facultad de Ciencias. UNAM 1997
 22. CNIO: Cáncer familiar. <http://www.cnio.es/es/programas/prog504a1.asp>. 2009
 23. Cullen J.M., Page R. and Misdrop W. An overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. Cap. 1 in *Tumors in Domestic Animals*. Meuten, Donald Editor. 4th Ed. Blackwell Publishing. 2002.
 24. Cupples G. Claire. Mutagenesis Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001
 25. Das Sudip and Kirsch Claudia F E. Imaging of lumps and bumps in the nose: a review of sinonasal tumours. *Cancer Imaging* Vol. 5, pp 167-177. 2005
 26. Doetsch Paul W. DNA Damage. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001
 27. Encyclopedia Encarta. <http://www.encyclopedia.com>. El lobo mexicano.
 28. Frankham Richard. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology* (2008) 17, 325-333.
 29. Frankham, Richard. Quantitative genetics in conservation biology. *Gen Res.*, Camb. 1999, Vol 74 pp. 237-244
 30. Fredrickson R. and Hedrick P. Body size in endangered Mexican wolves: effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Animal Conservation* 2002 5 39-43.
 31. Fredrickson Richard, Siminski Peter, Wolf Melissa and Hedrick Philip. Genetic rescue and inbreeding depression in Mexican wolves. *Proceedings of the Royal Society B* doi:10.1098/rspb.2007.0785 Published online
 32. García-Rojo M, Morillo-Castro A. Técnicas de Biología molecular en el diagnóstico dermatológico. *Dermatología Peruana*. 1999. Vol 9, Suplemento 1.
 33. García Normand, Salamanca Fabio, Astudillo-de la Vega Horacio, Curiel-Quesada Everardo, Alvarado Isabel, Peñalosa Rosenda y Arenas Diego. A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* 2005, 5:93 <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/93>
 34. Gibson J.P. & Bishop S.C., Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* 2005, Vol. 24 (1), Pp. 343-353.
 35. Greer A.L. and Collins J.P. Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population. *Journal of Animal Ecology* 2008, 77. 364-369.
 36. Grenfell B. and Harwood J. (Meta)population dynamics of infectious diseases. *TREE* 1997. Vol 12. No. 10. 395-399.
 37. Griner Lynn A . *Pathology of Zoo Animals*. Zoological Society of San Diego, Press. 1983
 38. Groombridge B. Editor. 1992. *Global biodiversity: status of the Earth's living resources: a report compiled by the World Conservation Monitoring Centre*. Chapman and Hall, London U.K.
 39. Hayes, H.M., Wilson, et al. 1982. Carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs: Descriptive epidemiology. *Cronell Vet* 72:168-179.
 40. Hedrick P.W. and Fredrickson R.J. Captive breeding and the reintroduction of Mexican and red wolves. *Molecular Ecology* (2008) 17, 344-350

41. Hedrick Philip, Miller Philip, Geffen Eli and Wayne Robert. Genetic Evaluation of the Three Captive Mexican Wolf Lineages. *Zoo Biology* 1997 Vol 16 pp 47-69
42. Hedrick P.W & Kalinowski, S.T. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 31: 139-162.
43. Hess George. Conservation Corridors and Contagious Disease, a cautionary note. *Conservation Biology* 1994. Vol. 8, No 1. 256-262.
44. Holmila Reetta, Cyr Diane, Luce Danièle, Heikkilä Pirjo, Dictor Michael, Steiniche Torben, Stjernvall Tuula, Bornholdt Jette, Wallin Hakan, Wolff Henrik and Husgafvel-Pursiainen Kirsti. COX-2 and p53 in human sinonasal cancer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *Int J Cancer.* 2008 May; 122(9): 2154-2159.
45. Instituto Nacional de Ecología. Proyecto de recuperación del lobo mexicano. Primera edición. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. 2000
46. IUCN Red List of Threatened Species IUCN 2007.
http://www.iucnredlist.org/info/2007RL_Stats_Table%201.pdf
47. IUCN Red List of Threatened Species IUCN 2006.
<http://www.iucn.redlist.org/search/details.php/3756/summ>
48. Jones et al. "Global Trends in Emerging Infectious Disease". 2008
49. Jubb K.V.F., Kennedy P.C, Palmer N. Pathology of Domestic Animals. Fourth Edition. Academic Press, 1993. Vol. 3 Pp 550-553
50. Karp Gerald. Cell and Molecular Biology. Concepts and experiments. Fourth Ed. John Wiley & Sons, Inc. 2005
51. Karran Peter. Human Mismatch Repair: Defects and Predisposition to Cancer. 2001. *Encyclopedia of Life Sciences.*
52. Key Marc. Ed. Immunohistochemical staining methods. Fourth Edition. Dako. 2006.
53. Kimura Motoo. Average time until fixation of a mutant allele in a finite population under continued mutation pressure: Studies by analytical, numerical, and pseudo-sampling methods. 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci* Vol 77. No.1, pp 522- 526. *Genetics*
54. Kimura Motoo and Ohta Tomoko. The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. 1969. *Genetics* 61: 763- 771. March
55. Klapake Eric, Shoieb Ahmed, Ramsay Ed, Schumacher Juergen, and Craig, Linden. Renal adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, and pancreatic islet cell carcinoma in a binturong (*Arctictis binturong*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36(1): 127–130, 2005
56. Leberg Paul L and Firmin Brigitte D. Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular Ecology* (2008) 17, 334-343.
57. Lewin Benjamin. *Genes* VI. Oxford University Press. 1997
58. Li Fang-Yuan, Cuddon Paul A., Song Jonathan, Wood Sheri L., Patterson Jon S., Shelton Diane G. and Duncan Ian D. Canine spongiform leukoencephalomyelopathy is associated with a missense mutation in cytochrome b. *Neurobiology of Disease* Vol. 21 pg 35-42. 2006
59. Li Wen-Hsiung. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 2000
60. Liberg Olof, Andrén Henrik, Pedersen Hans-Christian, Sand Håkan, Sejberg Douglas, Wabakken Petter, Akesson Mikael and Bensch Staffan. Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biol. Lett.* (2005) 1, 17-20.

61. Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D.B., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokass III, E.J., Zody M.C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R.K., Ostrander E.A., Potting C.P. Galibert F., Smith D.R., deJong P.J., Kirkness E, Alvarez P, Biagi T., Brockman W., Butler J., Chin C-w, Cook A., Cuff J., Daly M.J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr Manfred, Kellis M., Cléber M., Bardeleben C., Goodstadt L., Heder A., Hitte C., Kim L., Koepfli K-P., Parker H.G., Pollinger J.P., Searle S.M.J., Sutter, N.B., Thomas R., Webber C., Broad Institute Genome Sequencing Platform & Lander, E.S. Genome sequence, comparative análisis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. Vol 438. December 2005. doi:10.1038.
62. López Islas G., Rangel Rodríguez I.C., Vázquez González C., Ramos Magaña X., Yáñez Muñoz I., Ríos Ovando M. Presencia de Carcinoma Epidermoide en línea familiar de Lobo mexicano. 2003. *Memorias XX Congreso de la AZCARM, Boca del Río, Veracruz, 18 – 21 de septiembre*
63. López Islas G., Vazquez Gonzalez C. Linaje de Lobos Mexicanos “San Juan de Aragón”. Historia, evidencias de su autenticidad y posibilidad de certificación. 1993. *Memorias Primer Simposium Nacional sobre el Lobo gris Mexicano. Zoológico San Juan de Aragón. INE, DDF, FES-Cuautitlán UNAM. Agosto*
64. Llorente José L., Aldama Patricia, Alvarez-Marcos César, Escudero Jhudit, Alonso-Guervós Marta, Fresno Florentino, Suárez Carlos y Hermsen Mario. Análisis genético molecular con MLPA en adenocarcinoma nasosinusales. *Acta Otorrinolarigol ESP*. 2008; 59 (4):151-158.
65. Luppi Marcela, Malta Marcelo, Costa Maria E. L. T., Motta Rafael O. C., and Santos Renato L. Multicentric squamous cell carcinoma in a paca (*Agouti paca*) resembling bowen’s disease. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39(2): 244–247, 2008.
66. McAloose Denise and Newton Alisa. Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Reviews/ Cancer*. 2009 Vol 9. July.
67. McCallum Hamish. Tasmanian devil facial tumor disease: lessons for conservation biology. 2008. *Trends in Ecology and Evolution* Vol. 23. No. 11
68. Mc Neil N., Ried Th. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert reviews in molecular medicine*. Cambridge university Press. Sept 2000. <http://www-ermm.cbcu.ac.uk>
69. Mealey, Katrina L.a; Bentjen, Steve A.a; Gay, John M.a; Cantor, Glenn H.b. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* Vol 11. 8. Pp 727-733. Nov 2001. (Abstract)
70. Mealey K.L., Bentjen S.A., Waiting D.K. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *Am J Vet Res*. 2002 Apr;63(4):479-81.
71. Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*, 4th Edition Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, 2002.
72. Miller Christine L., Templeton Richard S., Karpinski Lorraine. Successful treatment of oral Squamous Cell Carcinoma with intralesional fluorouracil in a Malayan tapir (*Tapirus indicus*) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(2): 262–264, 2000.
73. Mitchell Charles, Tilman David and Groth James. Effects of Grassland plant species diversity, abundance, and composition on foliar fungal disease. *Ecology* 83 (6), 2002.

74. Mitelman Felix, Johansson Bertil and Mertens Fredrik. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews. Cancer*. 2007. Vol 7. 233-245
75. Morales Luisa, Reigosa Aldo, Caleiras Eduardo et al. Expresión del HER2/neu en pacientes venezolanas con cáncer de mama localmente avanzado. *Invest. clín.*, vol.49, no.1 p.69-78. ISSN 0535-5133. Mar. 2008
76. Munson Linda. Inbreeding and Disease in Captive Wild Animal. In *Current Therapy 3*. Edited by W.Fowler 1993.
77. Nagal M.A. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999. 32:897- 904.
78. O'Brien Stephen, Menninger Joan C., Nash William G, Editors. *Atlas of Mammalian Chromosomes*. 2006.
79. Olsen J.H., Asnaes S.. Formaldehyde and the risk of squamous cell carcinoma of the sinonasal cavities. *British Journal of Industrial Medicine*. 43; 769-774. 1986
80. Owston Michael A., Ramsay Edward, Rotstein David. Neoplasia in Felids at the Knoxville Zoological Gardens, 1979 – 2003. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39(4): 608–613, 2008
81. Patz 2004.
82. Peeters D., Clercx C., Michiels L, Desmecht D., Snaps F, Henroteaux M, and Day MJ. Juvenile nephropathy in a Boxer, a Rottweier, a Collie and an Irish Wolfhound. *Aust Vet J* Vol. 78 No 3, March 2000.
83. Pellman David. Aneuploidy and Cancer. *CELL BIOLOGY. Nature* vol 446. Pp 38-40. 2007
84. Pérez Escuredo J, Llorente JL, Melòn S, de Oña M, García Martínez J, Alvarez Maracos C, Hermesén M. Viral infection of herpes simplex, Epstein—Barr, varicela zoster, human papilloma, cytomegalovirus or adenovirus are not related to sinonasal adenocarcinomas. *Acta otorrinolaringol ESP* 2007. Aug-Sep; 58(7):311-315.
85. Petak Istvan, Houghton Janet A., Kopper Laszlo. Molecular Targeting of Cell Death Signal Transduction Pathways in Cancer. *Current Signal Transduction Therapy*, 2006. I, 113-131.
86. Purvis, A., J. I. Gittleman, G. Cowlshaw y G.M. Mace. 2000. Predicting extinction risk in declining species. *Proceedings of the Royal Society of London* 267: 1,947- 1,952
87. Reetta Holmila, Diane Cyr, Daniéle Luce, Pirjo Heikkila, Michael Dictor, Torben Steiniche, Tuula Stjernvall, Jette Bornholdt, Hakan Wallin, Henrik Wolff, and Kirsti Husgafvel-Pursiainen. Cox-2 and p53 in human sinonasal cáncer: COX-2 expression is associated with adenocarcinoma histology and wood-dust exposure. *International Journal Cáncer*. 2008 May; 122(9): 2154-2159
88. Reimann N., S. Bartnitzkea, J. Bullerdieka, U. Schmitza, P. Rogallaa, I. Nolteb, M. Rønnecc. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics*, Vol. 73, No. 1-2, 1996.
89. Reimann N., Bartnitzke S., Nolte I. and Bullerdlek j. Working with Canine Chromosomes: Current Recommendations for Karyotype Description. *The American Genetic Association* 1999. Vol 90 pp 31-34.
90. Reznik Gerd and Stinson Sherman. *Nasal Tumor in Animals and Man*. Vol III. Experimental Nasal Carcinogenesis. CRC Press, Inc. 2000
91. Rodrigo Juan P., García Luis A., Ramos Sofía, Lazo Pedro S., and Suárez Carlos. EMS1 Gene Amplification Correlates with Poor Prognosis in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*. Vol. 6, 3177-3182, 2000.

92. Rodríguez-Cuevas Sergio A., Capurso García Marino. Epidemiología del cáncer de mama. Artículo de revisión. *Ginecol Obstet Mex* 2006; 74: 585-593.
93. Roschke Anna V, Tonnon Giovanni, Gehlhaus Kristen McTyre Nicolas, Bussey Kimbely J, Lababidi Samir. Karyotypic Complexity of the NCI-60 Drug-Screening Panel. *CANCER RESEARCH* 63, 8634–8647, December 15, 2003
94. Sato Tsuneo, Higuchi Tomomi, Shibuya Hisashi, Ohba Shigeo, Nogami Sadao, Shirai Wataru, Watanabe Hideaki, and Honda Shigeaki. Lingual squamous cell carcinoma in a california sealion (*Zalophus californianus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(4): 367–370, 2002
95. Scudiero Dominic A., Weinstein John N., and Kirsch Ilan R. Karyotypic Complexity of the NCI-60 Drug-Screening Panel. *CANCER RESEARCH* 63, 8634–8647, 2003.
96. Santos Gda C, Zielenska M, Prasad M, Squire J.A. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *Journal of Clinico pathology*. 2008. (Downloads for jcp.bmj.com)
97. Secretaria de Medio Ambiente, Distrito Federal. <http://www.sma.df.gob.mx/simat2/>
98. Siminski, P. 2009. Mexican wolf, *Canis lupus baileyi*: International Studbook Update, 31 July 2009. The Living Desert, Palm Desert, CA. 39pp.
99. Siminski, D.P. 2008. Mexican Wolf, *Canis lupus baileyi*, International Studbook, 2008. The Living Desert, Palm Desert, California, U.S.A. 89 pp.
100. Siminski, P. 2007. Mexican wolf, *Canis lupus baileyi*: International Studbook Update, 31 July 2007. The Living Desert, Palm Desert, CA. 48pp.
101. Siminski, D.P. 2005. Mexican Wolf, *Canis lupus baileyi*, International Studbook, 2005. The Living Desert, Palm Desert, California, U.S.A. 125 pp.
102. Siminski Peter. Population Analysis and Breeding Plan. Review Draft for Institutional Representatives. Species Survival Plan. Comments on October 2010
103. Siminski P. Mexican Wolf Reestablishment and Recovery Program. WAZA News. Feb 2011
104. Speicher M.R. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Techniques. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Willey & Sons, 2005. Advanced article.
105. Strickberger M.W. Genética. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A., 1982. Pp 498-504
106. Sueiro Ruiz Felipe, Carlos Alessi Antonio, Aparecido Chagas Cristiano, Aparecido Pinto Glauce, Vasallo José. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review (Imuno-histoquímica na patologia veterinária diagnóstica: uma revisão crítica). *J Bras Patol Med Lab* Vol. 41 N. 4 pp. 263-70. Agosto 2005
107. Sugiura Takaaki, Matsumaya Satoshi, Akiyosi Hideo, Takenaka Shigeeo, Yamate Jyoji, Kuwamura Mitsuru, Aoki Mica, Shimada Terumasa, Ohashi Fumihito, Kubo Kihei. Expression Patterns of the BRCA1 splicing variants in Canine Normal Tissues and Mammary gland tumors. *Journal of Veterinary Medicine Sciences* 2007. 69(6): 587-592.
108. Switonski Marek, Szczerbal Izabela. Comparing the Human and Canine Genomes. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2008 John Willey & Sons. Ltd. www.els.net
109. Thomas R. Molecular cytogenetic analysis of recurrent chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas. In *Genes, Dogs and Cancer: 2nd Annual Cancer Conference-2002*. International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Ithaca, New York, USA.
110. TÖnnies Holger. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *TRENDS in Molecular Medicine* 2002.Vol.8 No.6 June pp 246- 250.

111. United States Fish and Wild Life Services. Mexican Gray wolf recovery program. 1987
112. Universidad de Michigan. DNA Sequencing Core. <http://sequcore.brcf.med.umich.edu/> . Update Nov 17, 2010.
113. Uribe Marleny. Progresos Recientes y Expectativas futuras en oncología desde la perspectiva de la Anatomía patológica, FISH y Citogenética. Hospital de Clínicas Caracas. 2003
114. Valladares Adán, Salamanca Fabio, Madrigal-Bujaidar Eduardo, Arenas Diego. Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 152 (2004) 163-166.
115. Vanderlip Sharon. The collies and the mdr1 deletion gene – setting the record straight. Copyright © Vanderlip Sharon DVM. 2009
116. Verma, Ram S., Babu Arvind. Human Chromosomes. Principles and Techniques. Second Edition. Mc Graw Hill, Inc. 1995.
117. Wayne R., Hedrick P. Genetics and wolf conservation in the American West: lessons and challenges. *Heredity* 1-4 *Heredity advance online publication*, 1 December 2010; doi:10.1038/hdy.2010.147. 2010
118. Weinberg Robert A. The Biology of Cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 2007
119. Wenig BM. Undifferentiated malignant neoplasms of the sinonasal tract. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 May; 133 (5): 669- 712
120. Wilson D.W. and Dungworth. Tumors of the Respiratory Tract. In *Tumors in Domestic Animals*. Donald J. Meuten, Editor. Iowa Stat Press 2002. 4th edition pp 365-373.
121. Wikipedia Enciclopedia Virtual. http://es.wikipedia.org/wiki/Canis_lupus_baileyi. Vistado 19 mar 2008
122. Wurster- Hill D.H., Centerwall W.R. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. 1982. *Cytogenet Cell Genet* 1982;34:178-192
123. Wurster- Hill D.H., Gray C.W. The interrelationships of chromosome banding patterns in procyonids, viverrids, and felids. 1975. *Cytogenet Cell Genet* 1975;15:306-331
- 124.