



## ORIGINAL BREVE

## Análisis citogenético en *Canis lupus familiaris* con neoplasias Cytogenetic analysis in *Canis lupus familiaris* with neoplasm

Mario Verano-Zelada<sup>1</sup>; Jeel Moya-Salazar<sup>2\*</sup>; Rafael Vega-Vera<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>D.V.M. Oncología veterinaria, Departamento de Diagnóstico y Laboratorio Clínico, Veterinaria Clini-Vet;

<sup>2</sup>M.T., Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia;

<sup>3</sup>M.T., Área de Citogenética Humana y Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé, Lima, Perú.

\* Correspondencia: Jr. Pacifico 957, Urb. San Felipe, Lima 07, Lima, Perú. Tel.: 51 1487 3681, e-mail: [jeel.moya.s@upch.pe](mailto:jeel.moya.s@upch.pe)

Recibido 18 enero 2016, Aceptado 1 febrero 2016.

DOI: <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.2375371.v3>

© 2016 Todos los derechos reservados

### Resumen

El presente estudio busca correlacionar la presencia de neoplasias y el ordenamiento cromosómico en perros con aproximación al pronóstico. Se diseñó una investigación experimental, prospectiva de corte transversal en el laboratorio de genética y genómica «Golberd Hognes» de la clínica veterinaria «Clini-Vet». El procesamiento citogenético convencional fue en medio de cultivo PB-MAX™, el bandeo GTG y el reporte con ISCN según el *Committee for the Standardized Karyotype of the Dog*. De siete pacientes evaluados, 71,4% presentaron neoplasias malignas, el 84,8 % de pacientes con neoformaciones presentaron alteraciones cromosómicas, el 14,2% presentó cariotipo normal, el 28,6 % correspondieron a neoformaciones benignas y el 28,6 % de pacientes presentaron más de un tipo diferente de neoplasias durante su vida. La aberración cromosómica de mayor aparición fue la trisomía (57,1%), seguido de dos heterocromatinas constitutivas (28,5%), deleciones terminales (14,2%) y cromosomas en anillo (14,2%); todos los pacientes del estudio estuvieron vivos durante el periodo (2015-2016). Este estudio citogenético permite la determinación de aberraciones cromosómicas y es una herramienta pronóstica.

**Palabras clave:** análisis citogenético, oncología veterinaria, cromosoma canino, neoplasia.

### Abstract

This study aims to correlate the presence of neoplasms and the chromosomal arrangement in dogs with an approach to the prognosis. An experimental, cross-sectional prospective study was designed in the laboratory of genetics and genomics "Golberd Hognes" of veterinary clinic "Clini-Vet". Conventional cytogenetic processing was done in culture medium PB-MAX™, GTG banding and the report with ISCN according to the Committee for the Standardized Karyotype of the Dog. From seven evaluated patients, 71.4% had malignant neoplasms, 84.8% of patients with neoplasms had chromosomal abnormalities, 14.2% showed normal karyotypes, 28.6% had benign neoplasms and 28.6% of patients had more than one different type of neoplasm during their lifetime. The chromosomal aberration with the higher occurrence was trisomy (57.1%), followed by two constitutive heterochromatin (28.5%), terminal deletions (14.2%) and ring chromosomes (14.2%). All patients were alive during the study period (2015-2016). This cytogenetic study allows the determination of chromosomal aberrations and it is a predicted tool.

**Key words:** cytogenetic analysis, veterinary oncology, canine chromosome, neoplasm.

### Introducción

En la actualidad el abordaje de los problemas oncológicos en caninos ha mejorado con respecto a décadas anteriores, debido a la disponibilidad de pruebas de laboratorio, imágenes, así como el aumento de investigaciones y preparación de los profesionales en esta rama de la medicina veterinaria.

El cáncer es el crecimiento celular desordenado caracterizado por una excesiva proliferación del tejido sin aparente relación con las demandas fisiológicas de un organismo implicado. El cáncer se origina por la acumulación de desarreglos genéticos y epigenéticos dentro de la célula, acompañado de una progresiva pérdida de regulación del crecimiento celular (1). El cáncer es el mayor problema de salud en perros y gatos. Se calcula que uno de cada cuatro perros morirá de cáncer o alguna enfermedad relacionada a esta patología (2, 3).

Algunas razas de perro han sido asociadas a tipos específicos de tumores, como el boyero de Berna (histiocitosis sistémica maligna) y el Lobero irlandés (osteosarcoma); otros como el bóxer, el *Golden Retriever* y el *rottweiler* están asociados con mayor riesgo de tumores en general. Esta observación presenta, asimismo, importantes implicaciones genéticas, sugiriendo que lo que sucede en algunas razas puede ser similar al raro síndrome Li-Fraumeni humano, en él una mutación de la línea germinal en un gen supresor de tumores (P53) resulta en predisposición hereditaria a sufrir determinadas formas de cáncer (4). Las características que estas enfermedades presentan son el crecimiento descontrolado y la proliferación de células huésped, con poca diferenciación celular, frecuentemente en detrimento del hospedador.

Es así que en la búsqueda de la estadificación de la enfermedad neoplásica, intentamos también aproximarnos al conocimiento de la carga genética del paciente, mediante el uso de la citogenética veterinaria como una manera de aumentar el porcentaje de éxito en la emisión de un pronóstico de acuerdo al tratamiento a realizar porque para proponer un estadiaje, tratamiento y estimación del pronóstico y sobrevida de los pacientes se depende de la diferenciación entre tumores malignos y benignos, generalmente en base a los siguientes criterios: invasión, metástasis, diferenciación celular, rango de crecimiento tumoral, iniciación, expansión y progresión (1).

Este estudio busca correlacionar la presencia de neoplasias y el ordenamiento cromosómico de los pacientes en mención, aproximándonos al pronóstico.

## **Materiales y Métodos**

Se diseñó una investigación experimental, prospectiva de corte transversal en el laboratorio de genética y genómica «Golberd Hognes» del departamento de diagnóstico y laboratorio clínico, de la clínica veterinaria «Clini-Vet» en Lima, Perú. En base a los criterios de inclusión y exclusión establecidos, se seleccionaron únicamente pacientes (*Canis lupus familiaris*) con neoplasias, el tamaño muestral se determinó con EPIDAT 4.1 (Xunta de Galicia, España) considerando una sensibilidad de 0,95, una heterogeneidad de 50%, una prevalencia de 74% y una precisión de 0,04.

### **Técnica de recolección de datos y procesamiento de la muestra:**

El cultivo de sangre periférica para el análisis cromosómico tuvo tres fases de procesamiento: la fase pre-analítica que consistió en la recolección de sangre periférica (heparina sódica), almacenamiento y transporte de la muestra, las cuales fueron procesadas frescas y en el menor tiempo posible, o almacenadas en refrigeración por 2±1 horas como máximo. La fase analítica comprende el cultivo, cosecha, bandeado y lectura de los preparados celulares. El cultivo celular se realizó en PB-MAX™ Karyotyping Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) manteniéndose en incubación a 37±1°C por 96 horas (5).

La cosecha se realizó de manera convencional bajo la colchinización inicial (colcemid 0.1 ug/ml), hipotonización (cloruro de potasio 0.075 M) y fijación (fijador Carnoy). Para el bandeado y coloración de los preparados cromosómicos se utilizó bandeado GTG con coloración giemsa (*Leishman's stain*). La lectura se realizó por microscopía de luz a 100X para observar anomalías cromosómicas de acuerdo con a los ideogramas establecidos con patrones de bandas. Finalmente, la fase post-analítica comprendió el reporte de resultados mediante el sistema ISCN (*International System for Cytogenetics Nomenclature*) articulado para reportes citogenético de animales domésticos por el *Committee for the Standardized Karyotype of the Dog* en 1994 (6). Asimismo, los resultados entregados a los dueños de los pacientes en los tiempos estipulados (6-8)

Los datos fueron analizados utilizando IBM SPSS v21.0 (Armonk, USA) y Microsoft Excel para Windows (Redmond, USA).

## **Resultados y Discusión**

De las evaluaciones en curso se han logrado obtener siete análisis citogenéticos concluidos. Los hallazgos en pacientes evaluados corresponden a trisomía del cromosoma 13 presente en varias neoplasias, como en la del linfoma donde es considerado como factor de mejor pronóstico (9). Así mismo trisomía del cromosoma 18; 24 y cromosoma 2 en anillo, deleción del cromosoma 1, translocaciones recíprocas balanceadas, entre otras (Tabla 1).

Los pacientes con neoplasias malignas fueron 71,4 %, el 84,8 % de pacientes con neoformaciones presentaron alteraciones cromosómicas, el 14,2% presentó cariotipo normal, el 28,6 % correspondieron a neoformaciones benignas y el 28,6 % de pacientes presentaron más de un tipo diferente de neoplasias durante su vida.

La aberración cromosómica de mayor aparición es la trisomía (57,1%), principalmente la del cromosoma 13, seguido de dos heterocromatinas constitutivas (28,5%), deleciones terminales (14,2%) y cromosomas en anillo (14,2%); todos los pacientes del estudio estuvieron vivos durante el periodo (2015-2016).

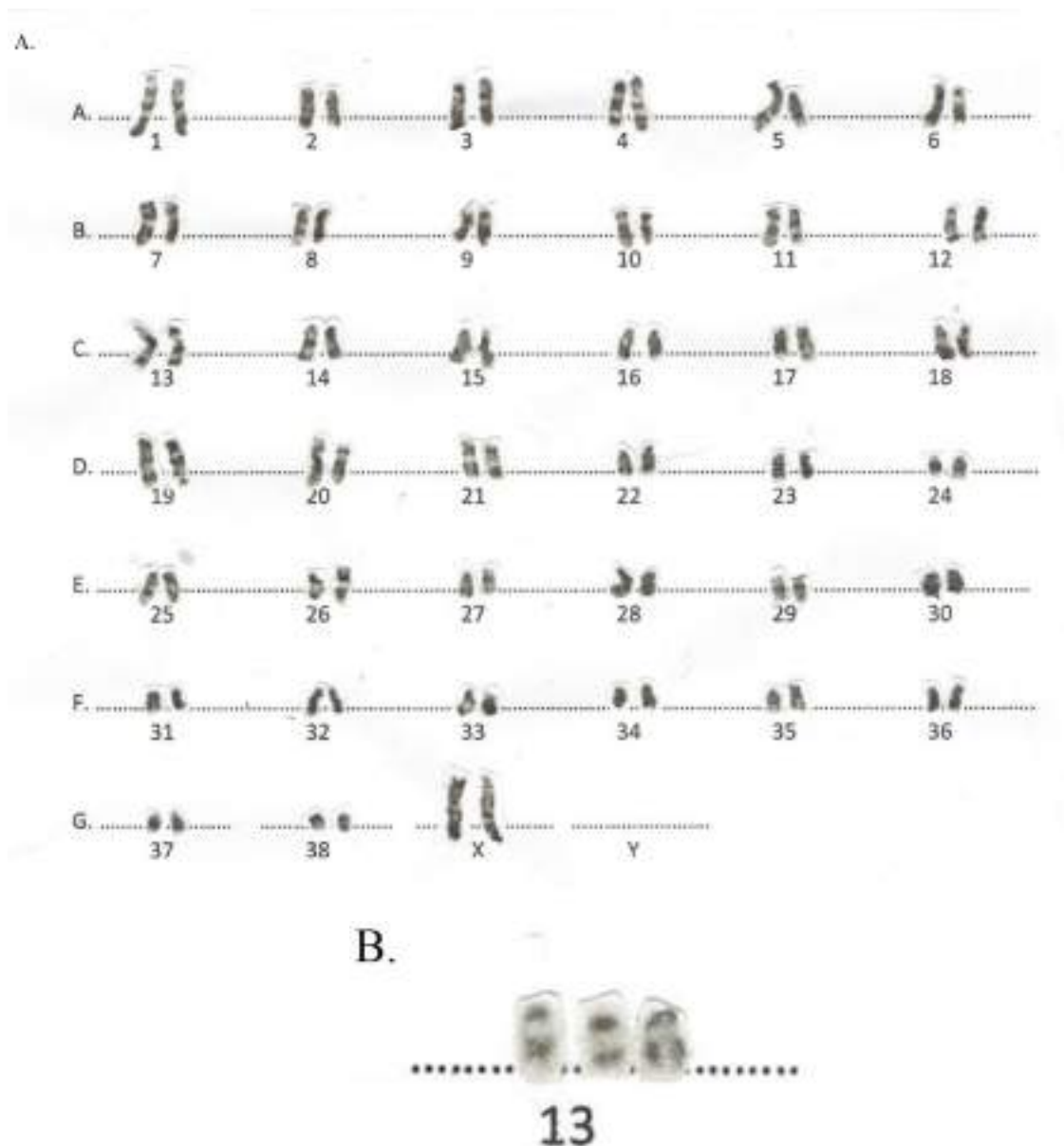
Dentro de las neoplasias observadas y correlacionadas con el cariotipo observamos: adenocarcinomas mamarios, linfoma cutáneo, mastocitomas sarcoma oral de bajo grado, melanosarcoma, adenocarcinoma de glándulas de hepatoideas y casos de hiperplasia prostática y mamaria, algunos individuos presentaron más un tipo de tumor a lo largo de su vida. Todos estuvieron vivos en un periodo de seis meses a un año post diagnóstico y evaluación, es importante señalar que dos pacientes presentaron neoplasias con un cariotipo normal (Figura 1A) con una enfermedad de comportamiento benigno y de mejor respuesta, corroborando el hecho de que a menores alteraciones

cromosómicas mejor pronóstico, así mismo las neoplasias pueden aparecer de manera espontánea sin necesidad de alteración genética previa y por factores ambientales como virus, radiaciones, insecticidas, entre otros (10-12).

**Tabla 1.** Epítome de hallazgos citogenéticos

Paciente	Edad	Sexo	Tipo de tumor	Alteración
1. Maltes	8 años	H	adenocarcinoma mamario; mastocitoma grado 2	79, XX, +13,+r2
2. Golden retriever	7 años	H	CCT vejiga	80, XX,+18,+24
3. Golden retriever	6 años	H	Linfoma epiteliotropico	80, XX, +13, +18
4. Bealge	8 años	M	Metaplasia escamosa prostática	79, XY,+13, t(10;18)
5. Pekines	5 años	H	Quiste mamario	78, XX, 2qh++
6. Shi tzu	6 años	M	Sarcoma oral Bajo grado	78,XY
7. Mestizo	16 años	M	Adenocarcinoma de hepatoides; Melanosarcoma	78, del(1p), 13qh+

**Figura 1.** Estudio citogenético. **A.** Cariotipo 78, XX, 26qh+ obtenido mediante técnica de bandas GTG. **B.** Cromosomas 13 de paciente con linfoma epiteliotrópico (80, XX, +13, +18)



Estas aberraciones cromosómicas se correlacionan con otros parámetros clínicos e histopatológicos de un tipo determinado de tumor. En ese sentido, las aberraciones recurrentes más comunes son las ligadas al cromosoma 13, y las ganancias genéticas (por translocaciones y adiciones) y finalmente las deleciones, resultados que coinciden con diversos estudios (4, 7, 13). La evaluación de las alteraciones del cromosoma 13 resultan significativas ya que los datos ofrecen importante evidencia sobre la homología del cromosoma 13 con las regiones HSA4 y HS8 humanos relacionados con los proto-oncogenes c-KIT y c-MYC implicados en el desarrollo y progresión carcinogénica (14). Aunque el análisis citogenético convencional de anomalías cromosómicas en neoplasias, se ve obstaculizada por el bajo índice mitótico y la mala calidad de metafases, resulta en una herramienta diagnóstica accesible e inicial que brinda aproximaciones del pronóstico, de manera general, y sobrevida en especial de los pacientes (15, 16). En ese sentido el impacto de los estudios citogenéticos proporcionan un mejor entendimiento de la biología de la tumorigénesis y permiten un mejor estadiaje, estimación del pronóstico y terapéutica (17).

## Conclusiones

La importancia del estudio citogenético radica en conocer de manera aproximada el ordenamiento cromosómico con el posible desempeño genético del paciente ante el cáncer, principalmente como herramienta pronóstica, pero también como herramienta terapéutica. Buscando una aproximación a individualizar la terapia contra el cáncer en caninos, se está desarrollando la citogenética veterinaria con gran precisión clínico-científica que permita un mejor entendimiento del cáncer y para la decisión diagnóstica- pronóstica para el manejo del paciente canino con neoplasia.

## Referencias Bibliográficas

1. Hahn KA, Richardson RC. Cancer Chemotherapy, a veterinary book. Pennsylvania: Williams & Wilkins; 1995.
2. Morris J, Dobson J. Small Animal Oncology. Osney Mead, Oxford: Blackwell Science; 2001: 125.
3. González-Chávez M, Peraza GB, Fabré RY, Rodríguez AJ, Calaña SL, Márquez AM, et al. Frequency of neoplasm presentation in canines of the municipality of San Miguel del Padrón, Havana, Cuba. *Rev Salud Anim.* 2015;37(1):39-46.
4. Tabori U, Malkin D. Risk stratification in cancer predisposition syndromes: lesson learned from novel molecular developments in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer res.* 2008;68(7):2053-7.
5. Czepulkowski B. Analyzing Chromosomes. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd; 2001: 19.
6. Switonski M, Reimann N, Bosma AA, Long S, Bartnitzke S, Pienkowska A, et al. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). *Chromosome Res* 1996;4:306–309.
7. Reiman N, Bartnitzke S, Nolte I, Bullerdiek J. Working with canine chromosomes: Current recommendation for Karyotype description. *J Hered.* 1999;90(1):31-34.
8. Langford CF, Fischer PE, Binns MM, Holmes NG, Carter NP. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Res.* 1996;4:115–123.
9. Moore AS, Ogilvie GK. Manejo del paciente canino oncológico: Guía práctica para la atención compasiva. Argentina: Editorial Inter-Médica S.A.I.C.; 2008.
10. Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP, Jessen CR, McCurnin DM, Richardson RC. Case-control Study of Canine malignant Lymphoma: Positive association with dog owners use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer inst* 1991;83:1126-31.
11. Breen M. Canine Cytogenetics - From band to basepair. *Cytogenet Genome Res.* 2008 ; 120(1-2): 50–60
12. Milne BS, Hoather T, O'Brien PC, Yang F, Ferguson-Smith MA, Dobson J, et al. Karyotype of canine soft tissue sarcomas: a multi-colour, multi-species approach to canine chromosome painting. *Chromosome Res.* 2004;12(8):825-35.
13. Thomas R, Smith KC, Ostrander EA, Galibert F, Breen M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *Brit J Cancer* 2003; 89:1530–37.
14. Reimann-Berg N, Murua Escobar H, Nolte I. Relevance of chromosome 13 aberrations in canine tumours. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 2012;40(4):267-70.
15. Kolialexi A, Tsangaris GT, Kitsiou S, Kanavakis E, Mavrou A. Impact of cytogenetic and molecular cytogenetic studies on hematologic malignancies. *Anticancer Res.* 2005;25(4):2979-83.
16. Murua Escobar H1, Becker K, Bullerdiek J, Nolte I. The canine ERBB2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet.* 2001;94(3-4):194-5.
17. Breen M, Modiano JF. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans-man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res.* 2008;16 (1):145-54.