



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

ESTUDIO RETROSPECTIVO DE TUMORES EN PERROS
DIAGNOSTICADOS POR HISTOPATOLOGÍA EN EL CIESA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA:
ELVA GARCÍA GUADARRAMA

COMITÉ DE TUTORES:
PhD. Raúl Cuauhtémoc Fajardo Muñoz
Dr. Simón Martínez Castañeda
M. en C. Dionicio Córdova López

TOLUCA, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

ESTUDIO RETROSPECTIVO DE TUMORES EN PERROS
DIAGNOSTICADOS POR HISTOPATOLOGÍA EN EL CIESA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA:
ELVA GARCÍA GUADARRAMA

COMITÉ DE TUTORES:
PhD. Raúl Cuauhtémoc Fajardo Muñoz
Dr. Simón Martínez Castañeda
M. en C. Dionicio Córdova López

TOLUCA, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2018

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado a mi hermana Sidney.

Gracias por todo tu apoyo y amor. Sé que estos momentos pueden ser los más difíciles para ti y Emilio, Evan y Yare, pero nunca olviden que los amamos y siempre vamos a estar ahí para todo lo que sea necesario.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. Mamá, Sidney, Hilda, Emilio, Evan, Yare, Mateo, Brenda y Servando. Gracias por todo su apoyo e incentivos que me dieron para iniciar, y ahora poder culminar este proyecto. Ustedes son el pilar de mi vida.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por brindar espacios de investigación como el CIESA, para nuestra formación.

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Al Doctor Fajardo, por todas sus enseñanzas, así como su exigencia que me dieron otra perspectiva de la investigación.

Al Doctor Simón, por sus enseñanzas y asesorías que me orientaron a la culminación de este trabajo.

Al Doctor Dionicio, por todas las horas cansadas de estar leyendo números, así como las asesorías proporcionadas aun con la distancia que teníamos.

A Aide, por todo el apoyo brindado principalmente en el primer año de maestría.

Al Doctor Francisco (Panchito) y a todo su equipo de trabajo (Adán, Arturo Marco), por darme la oportunidad de trabajar mi experimental en su laboratorio.

A mis amigos, Macotella, Aylin, Polet, Juve y todos los estudiantes CIESA, que con risas y charlas interminables hicieron más divertida esta etapa.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Estudios epidemiológicos de tumores en perros a nivel mundial	3
2.2 Estudios epidemiológicos de tumores en perros de México	7
2.3 Descripción de los tumores más frecuentes.....	8
2.3.1 Mastocitoma	8
2.3.2 Carcinoma de células escamosas.....	10
2.3.3 Tumor mixto benigno	11
2.3.4 Tumor Venéreo Transmisible canino (TVTC)	13
2.4 Factores de riesgo para tumores en perros	15
2.4.1 Factores genéticos.....	15
2.4.2 Factores del individuo	18
2.4.2.1 Edad	18
2.4.2.2 Raza	19
2.4.2.3 Sexo	21
2.4.3 FACTORES MEDIOAMBIENTALES	23
2.4.3.1 Agentes virales	23
2.4.3.2 Factores físicos (Radiación)	25
2.4.3.3 Agentes químicos.....	26
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1 Estudio retrospectivo de tumores diagnosticados en CIESA	32

6.2 Encuesta aplicada a los habitantes del municipio de Toluca	32
6.3 Evaluación de características histopatológicas del tumor más frecuente	33
6.4 Inmunohistoquímica del tumor más frecuente.	33
6.5 Sistema de puntuación de inmunoreactividad para inmunohistoquímica	34
6.6 Análisis estadístico	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Epidemiología descriptiva de los tumores	36
7.2 Encuesta a los habitantes del municipio de Toluca	39
7.3 Análisis del tumor más frecuente diagnosticados en CIESA	41
7.4 Marcadores de malignidad HIF-1 α Y GLUT-1	45
7.5 Artículo enviado	48
7.6 Carta de aceptación artículo	64
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	71
10. BIBLIOGRAFÍA	72
11. ANEXOS	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia para los principales sitios tumorales en perros (100 000/año)	5
---	---

Figura 2. Tumores más frecuentes por localización anatómica en perros diagnosticados en CIESA en el periodo 2002-2016.	36
--	----

Figura 3. Frecuencia de los diez tumores de piel más frecuentes diagnosticados en el CIESA. Los tumores asociados con la exposición a la radiación ultravioleta se muestran en amarillo.	37
--	----

Figura 4. Cortes histológicos de tumor venéreo transmisible canino (TVTC). A) Mitosis aberrantes tetrapolares. B) Destrucción de endotelio vascular con invasión de células neoplásicas. C) Alto índice mitótico. D) Ulceración de epitelio con infiltrado de células inflamatorias (flecha negra). Tinción H&E	43
--	----

Figura 5. Tres grupos de Tumor Venéreo Transmisible. a) tumor de células claras (250X) b) Tumor de células bien diferenciadas (TCBD) (400x) c) Tumor de células anaplásicas (TCA)(400x). Tinción H&E. 44

Figura 6 Cortes histológicos con marcaje positivo a HIF-1 α (a, b, c). A) Células bien diferenciadas B) células anaplásicas. C) células claras. D) Marcaje negativo con GLUT-1 en células bien diferenciadas de TVTC. Se muestran eritrocitos marcados como control positivo. Contra tinción H&E 47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia de cáncer en perros y características de la población canina en base en base a registros oncológicos de varios países..... 4

Tabla 2. Razas de perros con mayor predisposición a tumores 20

Tabla 3. Características biológicas de los tumores y de los individuos diagnosticados en CIESA en el periodo 2002-2016..... 38

Tabla 4. Características de la población canina del municipio de Toluca obtenidas a través de una encuesta. 40

Tabla 5. Características histopatológicas de malignidad y benignidad del tumor venéreo transmisible (TVTC)..... 42

Tabla 6. Nueva clasificación de TVTC de acuerdo las características histopatológicas más representativas 45

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de inmunoreactividad de HIF-1 α en tres grupos de tumor venéreo transmisible canino (TVTC)..... 46

RESUMEN

En México, los estudios epidemiológicos sobre oncología veterinaria son limitados a un número escaso de publicaciones, lo que conlleva al desconocimiento de datos certeros sobre la frecuencia de los tumores en perros en nuestro país, así como los factores de riesgo. En este trabajo se realizó un estudio retrospectivo y transversal de tumores en perros diagnosticados por histopatología en el (CIESA) del periodo 2002 al 2016 y a la par, se analizaron características de la población canina para conocer los posibles factores de riesgo. Un total de 393 tumores fueron diagnosticados, de los cuales el tumor venéreo transmisible canino (TVTC) fue el más frecuente (13.7%), seguido por fibroma (9.1%) y mastocitoma (7.8%). Se presentaron más tumores en hembras (52.9%) que en machos, y el rango de edad fue mayor de 7 años (54.7%). En relación a las características de la población canina se reportaron más machos que hembras (53.4% vs 46.6%), el rango de edad fue de 1 a 7 años (62.1%) y hubo más perros de raza pura (62.7%). Esto indicó una estrecha asociación en la raza, edad y sexo de la población canina de Toluca y las variantes tumorales diagnosticadas en perros. Posterior a este estudio, se realizó un análisis del comportamiento biológico del tumor más frecuente en CIESA que fue el TVTC, encontrando características histológicas de malignidad, así como expresión de HIF-1 α sugiriendo un comportamiento agresivo del tumor.

Palabras clave: Epidemiología, tumores, perro, TVTC.

ABSTRACT

In Mexico, epidemiological studies on veterinary oncology are limited to a number of publications, which entails the lack of knowledge of accurate data on the frequency of tumors in dogs in our country, as well as risk factors. In this work, a retrospective and cross-sectional study of the tumors diagnosed by histopathology in the (CIESA) from 2002 to 2016 was carried out, and characteristics of the canine population were analyzed to know the possible risk factors. A total of 393 tumors were diagnosed. Canine transmissible venereal tumor (CTVT) was the most frequent (13.7%), followed by fibroma (9.1%) and mastocytoma (7.8%). There were more tumors in females (52.9%) than in males, and the age range was greater than 7 years (54.7%). Regarding the characteristics of the dog population, more males than females were reported (53.4% vs. 46.6%), the age range was 1 to 7 years (62.1%) and there were more purebred dogs (62.7%).). This indicated a close association in the race, age and sex of the canine population of Toluca and the tumor variants diagnosed in dogs. After this study, an analysis of the biological behavior of the most frequent tumor in CIESA that was the TVTC was performed, finding histological characteristics of malignancy, as well as the expression of HIF-1 α suggesting an aggressive behavior of the tumor.

Keywords: epidemiology, tumors, dog, CTVT.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los tumores son una de las principales causas de muerte en la práctica veterinaria de las especies pequeñas, esto se debe a que el tiempo de supervivencia ha aumentado en estas especies, así como en los humanos (Fleming *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2016). Por tal razón, la epidemiología centró su atención en la rama oncológica desde hace más de 60 años. Uno de los primeros registros conocidos en animales de compañía fue el California Animal Neoplasms Registry (CANR) que inició en 1963 en Estados Unidos. Posteriormente, la mayoría de los datos recabados en el CANR sirvieron para obtener la incidencia de los tumores más comunes utilizándose como referencia por otros países para la actualización de datos epidemiológicos. En general, se estima que la incidencia de cáncer canino tiene un rango de 99.3 a 272.1 por cada 100,000 perros, dato generado de varios registros de cáncer como Italia, Dinamarca y Noruega. No obstante, no existen estimaciones precisas sobre la mortalidad y morbilidad que causa esta enfermedad debido a tres factores: la falta de censos en la población canina, la confirmación de casos presuntivos a neoplasias por falta de estudios complementarios, y por último, la falta de certificados de defunción que no permite estimar la mortalidad real de la población canina (Vail y Withrow, 2007).

Aun con estas subestimaciones, se han generado datos que nos demuestran que las neoplasias más comunes en esta especie son en la piel, seguidas de glándula mamaria, sistema hematopoyético y los tejidos blandos (Brønden *et al.*, 2010; Grüntzig *et al.*, 2016). Así mismo, se han generado conocimientos sobre los factores de riesgo involucrados en la presencia de tumores (Fleming *et al.*, 2011). Se sabe que las características del individuo como edad, raza y sexo, desempeñan un papel esencial para el desarrollo de neoplasias. Existen razas como la Labrador, Boxer, Golden Retriever, Rottweiler, entre otras, que tienen una predisposición genética al cáncer (Dobson, 2013). También se considera que, a cualquier edad, el individuo es susceptible de desarrollar tumores, sin embargo, existe una predisposición marcada en animales longevos, esto asociado con una acumulación progresiva de mutaciones

genéticas que conducen al cáncer (Reif, 2007). Sobre los factores ambientales involucrados en el desarrollo de neoplasias, los contaminantes químicos presentes en el medio ambiente como piretroides se han asociado con la presencia de carcinomas de glándulas mamarias (Reif, 2007). Los rayos de luz ultravioleta, principalmente los UVB, también se han estudiado como causa del carcinoma de células escamosas (SCC) en animales con mala pigmentación de la piel (Reif, 2007).

Sin embargo, a pesar de contar con esta información que nos permite tener una visión general de algunos factores de riesgo y distribución de la enfermedad, en México la información epidemiológica en esta especie es escasa limitando la información en pocas revistas científicas y trabajos presentados en congresos. Algunos estudios que han dirigido su atención a la epidemiología de tumores en nuestro país han sido en por Fajardo y col. (2013) en el municipio de Toluca y Salas y Col. (2016) en la capital el país. Otros estudios en revistas no indexadas incluyen investigaciones de prevalencia del tumor venéreo transmisible (TVT) en Mérida (Ortega *et al.*, 2003), frecuencia de TVT en área metropolitana (Pineda *et al.*, 2010) y frecuencia de neoplasias en Tamaulipas (De la Cruz *et al.*, 2017). Aunado a esto, un segundo problema es la falta de conocimiento sobre las características esenciales de la población canina, así como aspectos que involucran la tenencia de mascotas (vivienda, alimentación y salud) que pueden guiarnos a comprender las causas para desarrollar cáncer. En México, existen pocos estudios sobre las características de la población canina; sin embargo, están orientados a la investigación de enfermedades zoonóticas locales (Ortega *et al.*, 2007; Kisiel *et al.*, 2016).

Por lo cual, el presente proyecto tuvo como finalidad realizar un estudio epidemiológico retrospectivo para conocer los tumores más frecuentes en esta especie, evaluando los posibles factores de riesgo para los tumores más frecuentes en asociación con las características de la población canina en el municipio de Toluca, para generar datos que contribuyan al entendimiento de la enfermedad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estudios epidemiológicos de tumores en perros a nivel mundial

Los estudios de epidemiología en medicina veterinaria han centrado su atención en el estudio del cáncer debido que es una de las principales causas de muerte en perros a nivel mundial (Brodén, 2013, Choi *et al.*, 2013). No obstante, no existen estimaciones precisas sobre la mortalidad y morbilidad que causa esta enfermedad debido a tres factores: la falta de censos en la población canina, la confirmación de casos presuntivos a neoplasias por falta de estudios complementarios como ultrasonido, radiografías o biopsias que confirmen el diagnóstico, y por último, la falta de certificados de defunción que no permite estimar la mortalidad real de la población canina (Vail y Withrow, 2007).

Uno de los primeros registros conocidos en animales de compañía fue el California Animal Neoplasms Registry (CARN) que inició en 1963 con el objetivo de identificar todas las neoplasias diagnosticadas en un periodo de tres años en Alameda y Contra Costa. El rango de incidencia anual fue de 3.8 casos de cáncer por cada 1000 perros y en gatos fue de 1.5 por cada 1000 individuos (Vail y Withrow, 2007).

Otro registro importante que también abrió brecha en la epidemiología en tumores fue el Veterinary Medical Data Base (VMDB) que surgió en 1964 iniciando la colección de datos en 11 hospitales para posteriormente incluir 26 universidades de ese país. Esta base de datos ha permitido el conocimiento de factores de riesgo asociados a la edad, raza y sexo en varios tipos de cáncer en sistema linfático, piel, hueso, ovario y testículo (Flores, 1986). Así mismos, se pretendió estimar la tasa de mortalidad en perros con cáncer donde se estimó que aproximadamente el 20% de las causas de muerte en perros de 5 años es por cáncer y en perros de 10 años aumenta al 40% soportando la idea de Bronson en 1982, que sugería al cáncer como el líder de mortalidad en perros longevos.

Posteriormente, la mayoría de los datos recabados en el CANR sirvieron para obtener la incidencia de los tumores más comunes utilizándose como referencia por otros los países que a través de los años han contribuido a la actualización de estos datos epidemiológicos. En general, se estima que la incidencia de cáncer canino tiene un rango de 99.3 a 272.1 por cada 100,000 perros, dato generado de varios registros de cáncer como Italia, Dinamarca y Noruega que se mencionan en el cuadro 1.

Tabla 1. Incidencia de cáncer en perros y características de la población canina en base a registros oncológicos de varios países.

REGISTRO	PERIODO	CASOS/POBLACIÓN EN RIESGO	INCIDENCIA
Genoa registry of animal Tumors (Genoa, Italia)	1985-2002	3303/107,981; 1,943 725 perros	Machos 99.3/ 100 000 Hembras 272.1/100000 (perros al año)
Animal Tumor Registry (Venecia Italia)	2005	2509/296, 318 perros	140/100 000 perros al año.
Danish Veterinary Cancer Registry DVCR (Dinamarca)	2005-2008	1523 perros/perros en DVCR, agosto 2006	Razas con tasas de morbilidad < de 2. Bóxer, Bernes de la montaña, West Highland White terrier
Norwegian Canine Cancer Registry (Noruega)	1990-1998	14,401 tumores/censo perros noruega 1992-93	Bóxer 28 y 14/100 000 perros por años del total de tumores malignos.
California Animal Neoplasms Registry (USA)	1963-1966	1624/80 006 perros	381.2/100 000 en un período de 3 años

Información tomada y modificada de Vail y Withrow, 2007.

A la par de esto, otras investigaciones en torno a los factores de riesgo involucrados en la presencia de tumores comunes es esta especie se fueron desarrollando, aquellas que involucraban características propias del individuo como edad, raza, sexo y condición corporal (Criag, 2001) así como factores exógenos (físicos, químicos e infecciosos) en relación a la presentación de los tumores más frecuentes en esta especie como linfoma (Dorn *et al.*, 1967),

carcinomas mamarios (Sonnenschein *et al.*, 1991) y osteosarcoma (Kelsey *et al.*, 1998).

En relación a la incidencia de tumores por localización se ha establecido que los tumores en piel, glándula mamaria, hematopoyéticos, digestivos, respiratorio y de tracto reproductor son los más frecuentes, soportado por datos generados en la actualidad en países como Dinamarca, Suiza y Korea (Vail y Withrow, 2007; Morris y Dobson, 2001; Bronden, 2013; Grüntzig *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2013) (Figura 1).

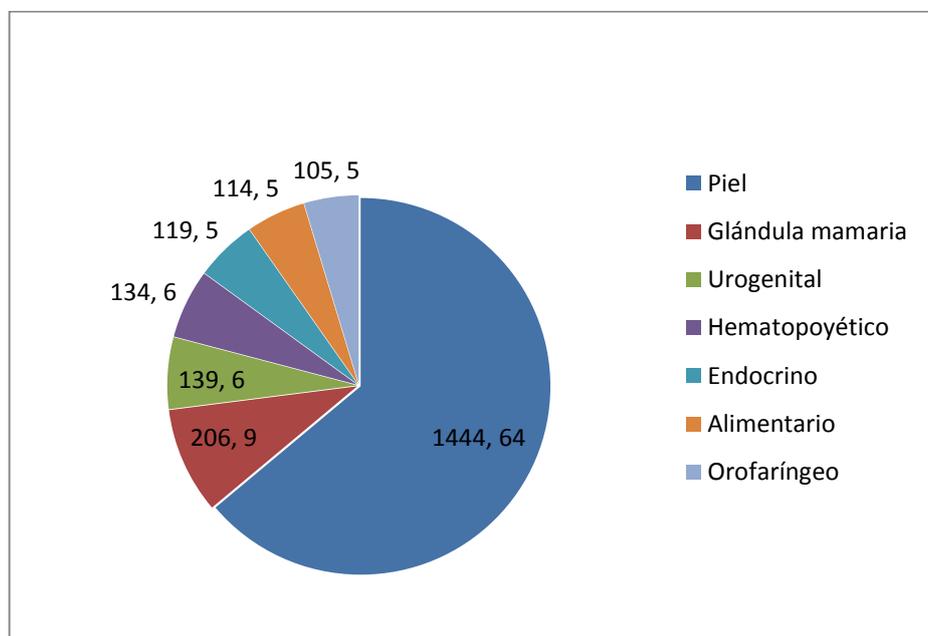


Figura 1. Tasa de incidencia para los principales sitios tumorales en perros (100 000/año)

* Datos obtenidos y modificados de Morris and Dobson, 2001.

Dentro del grupo de tumores de piel los tumores de células redondas como el mastocitoma (21.3%) e histiocitoma (14%) se han reportado como los más frecuentes, así mismo, tumores relacionados a la exposición con la radiación ultravioleta como el carcinoma de células escamosas (6.9%) basales (5.5%) y melanoma (5.0%) se han reportado en países como Brasil (Dos Santos *et al.*, 2012), Estados Unidos (Moore, 2014) y Reino Unido (Vail y Withrow, 2007).

Otros tumores de importancia en piel son fibroma (7.4%), lipoma (8.6%) y adenoma sebáceo (6.8%) (Scott and Miller, 2001).

En cuanto a tumores en glándula mamaria se hicieron dos clasificaciones, la primera en 1974 por la ONU publicado en el “International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals”, posteriormente se realizó una en 1999 y recientemente Goldschmidt y colaboradores trabajaron en una nueva en 2011 en donde citan a los carcinomas los tumores mixtos benignos (45.5%), carcinomas sólidos (16.9%), adenocarcinoma tubular (15.4%), y adenocarcinoma papilar (8.6%) como los más frecuentes.

Por último, otro grupo de tumores que tiene alta incidencia son los tumores urogenitales. En sistema urinario el 17% de todos los tumores se presentan en vejiga, el 2.3% en uretra y 4.6% en riñón. en el sistema reproductor en las hembras la mayor frecuencia es en vagina (14.6%) por tumor venéreo transmisible (36%), seguidos por tumores en ovarios (10.7%) principalmente de origen epitelial (71.%). Por su parte, los machos presentan más tumores en testículos (42.3%) principalmente por seminomas (62%) y en próstata y pene (4.9%) algunos tumores localizados son por tumor venéreo trasmisible (Sapierzyński *et al.*, 2007)

2.2 Estudios epidemiológicos de tumores en perros de México

A pesar de que la medicina veterinaria en México ha avanzado abismalmente; en nuestro país, los estudios epidemiológicos sobre oncología son escasos, limitando la información a revistas de carácter no científico y trabajos presentados en congresos. Algunos estudios que han dirigido su atención a la epidemiología de tumores en nuestro país han sido en por Fajardo y col. (2013) en el municipio de Toluca en donde realizaron un estudio de prevalencia de tumores en un periodo de 2002 al 2008, Salas y Col. (2016) por su parte, se centran en el estudio de tumores en glándula mamaria en un periodo de 2002 al 2012 en la capital el país. Otros estudios en revistas no indexadas incluyen investigaciones de prevalencia del tumor venéreo transmisible (TVT) en Mérida (Ortega *et al.*, 2003), frecuencia de TVT en área metropolitana (Pineda *et al.*, 2010) y frecuencia de neoplasias en Tamaulipas (De la Cruz *et al.*, 2017).

Al igual que en otros estudios a nivel mundial, en México, los tumores en piel se reportan como los de mayor frecuencia, siendo el mastocitoma (6%), fibrosarcoma (12%) y carcinoma de células escamosas (5%) los más frecuentes (De la Cruz *et al.*, 2017; Fajardo *et al.*, 2013). En cuanto a glándula mamaria, los tumores más frecuentes son tumor mixto benigno (35.9%), adenoma complejo (30.9%) y fibroadenoma (2.4%) (Salas *et al.*, 2016). Y en tracto reproductor el TVT se reporta como el más frecuente en los estudios antes mencionados (17.48% Merida, 9% Tamaulipas).

Las edades que presentan mayor presentación de tumores son sobre los 7 años (Fajardo *et al.*, 2013; De la Cruz *et al.*, 2017) y las razas más frecuentes son la Labrador (18.4%), Pastor alemán (12%), Poddle (18,1%) y Cocker (15.5%) son las más frecuentes en tumores de piel y glándula mamaria (Fajardo *et al.*, 2013; De la Cruz *et al.*, 2017; Salas *et al.*, 2016) y en relación a tumores del tracto reproductor el perro mestizo se reporta como el que más lo presenta (Ortega *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2010).

2.3 Descripción de los tumores más frecuentes

2.3.1 Mastocitoma

El mastocitoma es una de los tumores más comunes en perro, representando el 20% de todos los de piel. Tiende a afectar a animales viejos, pero puede ocurrir a cualquier edad (de 4 meses a 18 años) (Moulton, 1978). No existe predilección por sexo y las razas que más lo presentan son la bóxer, Boston terrier, bull terrier, labrador, Beagle, schnauzer (Vail y Withrow, 2007).

Se clasifica dentro del grupo de tumores de células redondas junto con el tumor venéreo transmisible, histiocitoma y melanoma. Este tumor no tiene una presentación clínica típica, presentándose de varias formas. La mayoría se presentan de forma solitaria sin embargo del 11 al 14% de los animales tienen lesiones múltiples. Algunos tumores presentan ulceraciones y los más agresivos se observan como lesiones difusas mal definidas en la piel (Morris y Dobson, 2001).

Según la clasificación de Patnaik y col (1984) los mastocitomas de grado I presentan células bien diferenciadas en la dermis superficial o profunda, dispuestas en cordones o pequeños grupos. Las células son redondas a ovales, uniformes con citoplasma abundante y bien delimitado, su núcleo es redondo y hay ausencia de mitosis.

Los de grado II presentan moderada o gran cantidad de células, con invasión de la dermis profunda y el subcutáneo. Las células son redondas a ovales, moderadamente pleomórficas presentando raramente células binucleadas, el citoplasma es moderado a escaso, el núcleo es redondo con uno o más nucléolos visibles. Son raras las figuras mitóticas (0 a 2/campo de mayor aumento). Existen áreas de edema y necrosis. Y los mastocitomas de grado III tienen una localización extensiva en la dermis y subcutáneo. Las células son pleomórficas acumuladas en tapetes o cordones estrechos, el citoplasma es escaso, el núcleo es redondo con uno o más nucléolos prominentes (3 a 6 mitosis / campo de mayor aumento).

Existe la presencia de células multinucleadas y células gigantes, y áreas de edema, hemorragia y necrosis frecuentemente (Patnaik *et al.*, 1984; Moulton 1978).

Esta clasificación ha servido para determinar el pronóstico del paciente, así como su tratamiento. La mayoría de los perros con mastocitomas bien diferenciados y moderadamente diferenciados tienen un tiempo de supervivencia largo después de la cirugía excisional, en contraparte, los pacientes con tumores mal diferenciados tratados quirúrgicamente tienen un tiempo de supervivencia menor a un año debido a la recurrencia local del tumor o metástasis (Patnaik *et al.*, 1984; Sabattini *et al.*, 2014). Otros métodos empleados para la determinación del tiempo de supervivencia son en base a la presencia de AGNORS y Ki67 correlacionado con el grado histológico por servir como un marcador indirecto de proliferación (Simoes *et al.*, 1994).

En cuanto al tratamiento, la cirugía se ha empleado como la mejor elección en tumores bien diferenciados. Así mismo en tumores poco diferenciados se ocupa en conjunto con quimioterapéuticos como la vincristina, vinblastina, ciclofosfamida y doxirubicina. Otras terapias incluyen radioterapia que ha servido en el tratamiento de mastocitomas de cualquier grado (Sabattini *et al.*, 2014).

2.3.2 Carcinoma de células escamosas

El carcinoma de células escamosas (CCE) es un tumor epitelial que se origina en el estrato escamoso de la epidermis. Es el tumor de piel más común en gatos y el segundo más común en perros representando el 20% de todos los tumores de piel (Blackwood *et al.*, 2014). Normalmente afecta animales viejos y no presenta una predisposición racial, aunque razas como Keeshond, Schnauzer, Basset Hound, Collie, Boxer, Dálmata, Staffordshire Bull Terrier, Pit Bull Terrier Americano y Beagle lo tienden a presentar más (Silva *et al.*, 2015). Este tumor se observa principalmente en tronco, piernas, escroto, lecho ungueal y cavidad oral aunque puede presentarse en cualquier parte del cuerpo (Blackwood *et al.*, 2014). En cavidad oral representa el 25% de los tumores y se pueden originar en cualquier superficie de esta incluyendo gingiva, lengua, amígdalas y labios (Silva *et al.*, 2015).

Los CCE presentan con frecuencia un aspecto parecido a placas o pueden formar masas ulceradas, crateriformes o fungiformes o pueden ser erosivos formando lesiones ulceradas.

Histológicamente el tumor se compone por masas o cordones de células epidermales que proliferan invadiendo la dermis y la hipodermis. Una característica importante de este tumor es que forma perlas de queratina debido a que las células de origen son queratinocitos. El porcentaje de queratina que se produzca dependerá del estado de maduración de las células neoplásicas. En tumores bien diferenciados se observan grandes números de perlas de queratina, las cuales se componen de capas concéntricas de células escamosas que muestran un incremento en la queratinización hacia el interior. En células poco diferenciadas se observa queratinización ocasional. Otra característica importante de este tumor es la presencia de puentes intercelulares que se encuentran principalmente en tumores anaplásicos (Moulton 1978).

2.3.3 Tumor mixto benigno

El tumor mixto benigno es la neoplasia más común dentro de los tumores de glándula mamaria en perros. De acuerdo con Aburto y col. (1997), representa del 50% al 66% de las neoplasias mamarias caninas. Estos tumores generalmente aparecen en animales de 6 a 10 años de edad teniendo una media de edad de 8 años, con mayor frecuencia en las hembras, aunque también pueden afectar los machos. No existe predisposición por raza, sin embargo, existe una alta incidencia en las razas de Cocker Spaniel, Fox Terrier y Boston Terrier (Salas *et al.*, 2016). Con mayor frecuencia afectan a las glándulas caudales y ocasionalmente craneales (Dantas *et al.*, 2012).

La presentación clínica es muy variable; pueden ser nódulos únicos (42%) o múltiples (58%). Aproximadamente dos tercios de los tumores mamarios ocurren en el cuarto y quinto par, probablemente debido al mayor volumen de tejido mamario presente en las mismas. En más del 50 % de los casos se afectan múltiples glándulas (Moulton, 1978). Pueden estar fijados a la piel, pero por lo general no se adhieren a la pared corporal subyacente. Los malignos (más que los benignos) tienen mayor probabilidad de fijarse a la pared corporal y estar cubiertos por piel ulcerada. El tamaño de este tumor es muy variable, desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros. Se presentan como nódulos aislados o múltiples dentro de la glándula mamaria y pueden o no asociarse con el pezón (Vail y Withrow, 2007; Salas *et al.*, 2016).

Estos tumores exhiben un patrón histológico complejo debido a que presentan componentes tanto epiteliales como mesenquimales y cartílago y formación ósea eventualmente combinadas con tejido fibroso mixoide teniendo la capacidad de transformarse en tumores malignos. Estudios recientes reportan carcinomas en un porcentaje de 20 a 32% en los tumores mixtos (Cassali *et al.*, 2009).

En relación a los componentes histológicos, las células mioepiteliales en proliferación pueden exhibir una apariencia fusiforme o estrellada, y a menudo están envueltas dentro de una matriz extracelular abundante (matriz mixoide). El cartílago se caracteriza por nódulos o placas de diferentes tamaños, con

condrocitos y condroblastos que rara vez presentan alteraciones morfológicas celulares (Cassali *et al.*, 2009). En cuanto al tejido óseo, los osteoclastos forman matriz osteoide y hueso mineralizado. En general, se encuentra un cierto grado de pleomorfismo y atipia en estos tumores; por lo tanto, el diagnóstico diferencial a menudo es difícil, especialmente con respecto a los carcinomas en tumores mixtos benignos. De acuerdo con el sistema en desarrollo de clasificación de carcinomas en tumores mixtos, estos carcinomas se caracterizan por un desarrollo focal o nodular de malignidad dentro de un tumor mixto principalmente benigno (Dantas *et al.*, 2012).

Los carcinomas en tumores mixtos se asocian con un tiempo de supervivencia promedio que es de 2 a 3 veces mayor que el de otros carcinomas mamarios caninos. Por lo tanto, los animales que presentan este tipo histológico exhiben un pronóstico favorable en comparación con los animales que presentan otros tipos de carcinomas. Una explicación del mejor pronóstico asociado con los tumores mixtos está relacionada con el patrón de crecimiento expansivo de estos tumores, que muestra poca invasión linfática y un bajo índice metastásico (Dantas *et al.*, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2006).

Los factores que determinan la transformación maligna de los tumores mixtos benignos aún siguen en estudio. Sin embargo, Genelhu *et al.* (2007) y Bertagnolli *et al.* (2009) observaron alteraciones moleculares que podrían contribuir a la transformación maligna de tumores mixtos benignos, como la pérdida de expresión de p63, Tp63 y E-cadherina y β -caderina.

El tratamiento de elección para este tumor, así como en otros es quirúrgico y dependiendo del estadio en el que se encuentre se anexan quimioterapéuticos como doxirrubicina, ciclofosfamida, vincristina, metotrexato, en unión con inhibidores hormonales (Dantas *et al.*, 2012; Cavalcanti *et al.*, 2006).

2.3.4 Tumor Venéreo Transmisible canino (TVTC)

El tumor venéreo transmisible canino (TVTC) es una neoplasia que se transmite naturalmente por trasplante en perros por vía sexual (Das y Das, 2000). Se caracteriza por presentar un cariotipo diferente al del hospedador. Mientras que los perros presentan 78 cromosomas, el cariotipo del TVTC se reporta a nivel mundial con 59 cromosomas (57-64), de estos de 13 a 17 son metacéntricos y de 42 a 46 son acrocéntricos (Whitrow 2010).

Macroscópicamente el tumor se caracteriza por presentar forma de coliflor, de consistencia firme, nodular, multilobulado y altamente vascularizada (Ganguly *et al.*, 2010). Un signo característico del tumor es la ulceración que presenta teniendo descargas hemorrágicas o sero sanguinolentas (Whitrow *et al.* 2010). El tamaño del tumor varía desde un nódulo pequeño de 5 mm de diámetro hasta una masa de 15 cm (Moulton 1978). El tumor puede ser solitario o múltiple y en la mayoría de los casos se encuentra en los genitales externos, aunque también se ha encontrado en piel, adyacente a la boca, conjuntiva y cavidad nasal (Rezaei *et al.*, 2016) (Ganguly *et al.*, 2010). En las hembras la neoplasia se localiza en el vestíbulo y raramente en la vagina (Moulton 1978). En los machos la ubicación tiende a ser en la parte posterior del pene, en el glande y en ocasiones en el prepucio (Das y Das, 2000). Cuando el tumor se localiza dentro del prepucio o la vagina el diagnóstico suele ser más complicado debido a que el sangrado se puede confundir con el estro, uretritis, o cistitis. (Das y Das, 2000). En casos extragenitales sucede lo mismo, debido a que los signos varían de acuerdo a la localización del tumor (epifora, epistaxis, exoftalmos, deformación facial entre otros) (Papazoglou *et al.*, 2001).

El porcentaje de metástasis se reporta entre el 5 y 7% (Moulton 1978) (Scott *et al.*, 2002). Por lo regular los sitios más frecuentes para metástasis son los linfonodos, no obstante, otros sitios donde se ha observado es en piel, ojo, cerebro, bazo, hígado, testículo y músculo (Ganguly *et al.*, 2010).

Experimentalmente el TVTC presenta tres fases clínicas que permiten su diferenciación. La fase más temprana llamada progresión que se caracteriza

por un crecimiento rápido del tumor que puede durar hasta 6 meses (Liao *et al.*, 2003), presenta una coloración sanguinolenta, seguida por protrusión de lesiones neoplásicas y deformación de los genitales externos. Debido a infecciones bacterianas secundarias presenta un olor fétido notándose una lamida excesiva en los genitales (Batamuzi y Bittegeko, 1990), los síntomas menos comunes incluyen disuria, debilidad, parafimosis y rechazo al apareamiento (Ganguly *et al.*, 2013).

La siguiente fase (estable) ocurre después de los 6 meses. En esta, el tumor crece lentamente manteniendo su tamaño alcanzado en la fase de progresión (Moulton, 1978). Por último, la fase de regresión puede o no presentarse dependiendo del estado inmune del paciente (Whitrow, 2010; Liao *et al* 2003). Tiende a durar de entre 2 a 12 semanas, tiempo durante el cual el tumor puede desaparecer por completo. En esta fase un pequeño porcentaje de estos tumores (1-20%) puede tener una segunda fase de crecimiento que puede progresar a metástasis (Ganguly *et al.*, 2010).

A lo largo de los años se han empleado diferentes tratamientos con el objetivo de erradicar este tumor. Entre los métodos más empleados se encuentran la cirugía excisionales, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o la combinación de varios (Ganguly, 2010; Boscos *et al.*, 2004).

2.4 Factores de riesgo para tumores en perros

2.4.1 Factores genéticos

Los tumores surgen de la acumulación de mutaciones que eliminan la restricción y proliferación normal de las células somáticas. Entre muchas causas, estas mutaciones se originan de la exposición de carcinógenos medio ambientales como la radiación ultravioleta, el humo del cigarro entre otras. La carcinogénesis presenta tres fases: iniciación, promoción y progresión (Jubbs, 2007).

La iniciación es causada por cambios genéticos irreversibles que predisponen a las células normales susceptibles a la evolución maligna y la inmortalidad. La célula iniciada no es una célula neoplásica, pero ha dado su primer paso hacia este estado, después de sucesivos genotípicos y se han producido cambios fenotípicos (Trosko 2003). El daño en el ADN ha sido bien establecido como el evento que inicia la carcinogénesis. El daño del ADN puede ser reparado por mecanismos enzimas, no obstante, las células que proliferan tienen menos tiempo para reparar el ADN dañado (Oliveira, *et al.*, 2011). En esta etapa, las células iniciadas pueden permanecer latentes durante semanas, meses o años, o pueden crecer de forma autónoma y clonal. En esta fase se asegura que la división celular permanezca simétrica creando dos nuevas células iniciadas (Trosko 2003). La expansión clonal de las células iniciadas es el resultado de un proceso mitogénico causado por un aumento en el número de nuevas células y la inhibición de la apoptosis, que impide que las células iniciadas mueran (Trosko 2001). La proliferación celular es esencial para esta etapa, si la división celular ocurre antes de que los sistemas de reparación de ADN puedan actuar entonces la lesión se vuelve permanente e irreversible. Esta etapa puede comenzar con mutaciones espontáneas, respaldadas por eventos normales como depurinación de ADN y desaminación. Los errores en la replicación del ADN también están asociados con iniciación (Williams, 2001).

En la etapa de promoción, los compuestos promotores no interactúan directamente con el ADN y desencadenan los efectos biológicos sin estar activados metabólicamente). Estos agentes aumentan la proliferación celular en tejidos susceptibles, contribuyen a la fijación de mutaciones, mejoran las alteraciones en la expresión genética y provocan cambios en el control del crecimiento celular. Por otro lado, estos promotores pueden dañar indirectamente el ADN por oxidación (Oliveira *et al.*, 2011). Al principio, estas ocurrencias se asociaron con mecanismos epigenéticos, pero hoy en día se acepta ampliamente que la promoción también implica cambios genéticos. Esta es una etapa reversible, ya que después de la desaparición de un promotor puede producirse una regresión en la proliferación celular, probablemente por apoptosis.

Por último, la etapa de progresión se caracteriza por la irreversibilidad, inestabilidad genética, crecimiento más rápido, invasión, metastización, y cambios en los procesos bioquímicos, metabólicos y morfológicos características de las células. La angiogénesis, como una ocurrencia epigenética, es esencial para la progresión neoplásica. La adquisición de un fenotipo angiogénico precede al desarrollo de características que contribuyen a la malignidad y su inhibición retrasa el desarrollo neoplásico (Williams, 2001).

No obstante, sería incorrecto asumir que el medio ambiente es completamente responsable de la aparición de tumores. Existen también factores intrínsecos que interactúan con los carcinógenos medioambientales para desencadenar la presencia de tumores mejor conocidos como síndromes cancerosos hereditarios, los cuales solo representan del 5 al 10% del todos los cánceres en humanos (Whitrow, 2013). Estos síndromes incluyen varios cánceres en los que la herencia de un único gen mutante autosómico dominante incrementa en gran medida el riesgo a desarrollar un tumor. La mutación hereditaria generalmente es una mutación puntual que se produce un único alelo de un gen supresor tumoral, en las células somáticas se produce el silenciamiento del segundo alelo generalmente como consecuencia de delación o recombinación.

Existen varias características que determinan estos síndromes; en cada uno de ellos los tumores tienden a originarse en localizaciones y tejidos específicos, aunque pueden afectar más de una localización, así mismo, los tumores de este grupo se asocian con un fenotipo marcado específico (Jubbs, 2007).

En humanos el retinoblastoma es el síndrome más conocido (Jubbs, 2007). En perros solo un síndrome de carcinoma renal y dematofibrosis nodular (CRDN) ha sido descrito. El gen heredable en CRDN de este síndrome se sitúa en el cromosoma 5 en esta especie (CFA 5) específicamente en el gen foliculina, que en humano corresponde al factor heredable de la enfermedad Birt-Hogg Dubé que se caracteriza por tumores renales, lesiones cutáneas y quistes pulmonares (López *et al.*, 2012).

2.4.2 Factores del individuo

2.4.2.1 Edad

Los tumores pueden desarrollarse a cualquier edad, sin embargo, la mayoría de los tumores ocurren en animales de edad adulta (Moulton 1978). Existe un pico de edad entre los 6 a 14 años en perros y gatos. En un estudio hecho por el California Animal Neoplasms Registry en el condado de Alameda la edad media para tumores malignos y benignos fue de 9 años.

Existen neoplasias como el mastocitoma, carcinoma de células escamosas adenocarcinomas mamarios que son las más frecuentes en animales de edad avanzada (Reif, J. S. 2007). Por el contrario, existen tumores que se presentan en animales jóvenes como el papiloma, histiocitoma y epuli fibromatoso (Mohamed, 2006)

Existen tres posibles teorías que podrían explicar la relación entre la edad y la presencia de tumores. La primera de ella sostiene que esta asociación es consecuencia de la duración de la carcinogénesis. Durante cada etapa de la carcinogénesis se necesita un tiempo de terminado para completarse por lo que es más probable que el cáncer se manifieste en pacientes mayores. Así mismo se cree que la incidencia de neoplasias se incrementa debido a que las células de los perros viejos han pasado más ciclos celulares y han estado expuestos a factores carcinógenos por un tiempo más largo que las células de los animales jóvenes (Anisimov, 2003).

La segunda hipótesis propone que los cambios que se producen en el medio interno del organismo de forma progresiva, relacionados con la edad, proporcionan un ambiente favorable para la aparición de nuevos tumores, pero que se encuentran en periodo de latencia (Martínez de Merlo, 2007). Se ha demostrado que, con la edad, existe un aumento de los radicales libres endógenos en el organismo por una mayor producción ó porque los mecanismos para su eliminación son menos eficientes. Estos radicales libres contribuyen a la inducción del cáncer mediante la producción de mutaciones en el ADN. Además, la capacidad de reacción de la inmunidad celular también

disminuye con la edad, lo que conlleva un fallo en el sistema de inmunovigilancia (Anisimov, 2003).

En la tercera hipótesis se postula que los tejidos envejecidos experimentan cambios moleculares. Tanto la carcinogénesis como el envejecimiento se han asociado con alteraciones genómicas, que pueden actuar de forma sinérgica y producir cáncer. En los últimos años se ha propuesto que el acortamiento del telomero y la reactivación de la telomerasa son componentes importantes del envejecimiento y la carcinogénesis. La mayoría de las células suprimen la actividad de la telomerasa tras el nacimiento, pero, por el contrario, muchas células tumorales la reactivan, contribuyendo así a la proliferación de clones malignos. Aunque por sí sola la telomerasa no causa transformación de células normales en cancerosas, su reactivación coopera con mutaciones en oncogenes durante la carcinogénesis (Martínez de Merlo, 2007)

2.4.2.2 Raza

Para entender el concepto de predisposición por raza a ciertas enfermedades es debido explicar cómo fue la evolución del perro hasta nuestros días lo que ha permitido que algunas razas se consideren un factor de riesgo en el cáncer. La domesticación del lobo comenzó aproximadamente hace 30 mil años estableciéndose así diferentes funciones zootécnicas como guardia, cacería, pastoreo entre otras, pero no fue hasta hace 200 años que se empezaron a realizar selección de razas dividiendo la población del perro en al menos 300 razas en todo el mundo (Dobson, 2013). Durante este último periodo esta práctica ha dado lugar a la diversidad genética reducida de razas y una mayor divergencia genética entre las mismas. Se ha estimado que mientras que la domesticación del perro resultó en una pérdida del 5% de la diversidad de nucleótidos, la formación de la raza causó una pérdida del 35% causando a la larga mutaciones en un pequeño número de genes responsables de las características propias de la raza haciendo que al mismo tiempo sean seleccionados genes mutados que predisponen a ciertas enfermedades (Dobson, 2013).

No obstante, sabemos que la raza no será el único factor que desencadenará el cáncer, pero, se considera como un punto de partida para comprender los mecanismos genéticos subyacentes a la susceptibilidad del mismo (Dobson, 2013).

Algunas de las razas más predisponentes se presentan en el cuadro 2. En reino unido las razas más predisponentes a tumores cutáneos son el perro de aguas irlandesas, golden retriever, bernés de la montaña y rottweiler (Dobson 2010).

Tabla 2. Razas de perros con mayor predisposición a tumores

TIPO DE NEOPLASIA	RAZA PREDISPONENTE
Histiocitoma	Boxer, teckel, gran danes, collie, terriers, sharpei, labrador.
Papiloma	Cocker spaniel, terriers.
Tricoepitelioma	Cocker spaniel, springer spaniel, Pastor alemán, Setter irlandes
Fibroma	Boston terrier, Bóxer, doberman, fox terrier, labrador retriever.
CCE	Dálmata, bull terrier, boxer, caniche.
Melanoma	Airedale, cocker spaniel, springer spaniel, scottish terrier.
Lipoma	Cocker, teckel, doberman, labrador retriever, pastor alemán.
Mastocitoma	Boxer, bulldog, labrador retriever, teckel, weimaraner.

CCE: carcinoma de células escamosas

Tomado de (Fraile, 2001).

El histiocitoma es un tumor con alta predisposición en la raza Bérnes de la montaña. En un principio se pensó que esta predisposición era resultado de efectos poligénicos, pero estudios más recientes indican una relación con anomalías asociadas con la región del gen CDKN2A / B, anomalías en la misma región genética en humanos que codifican para p16 se han asociado con varios cánceres, incluido HS (Ruple *et al.*, 2016).

Mohamed (2006) en Alemania indica algunas razas como la bóxer y bull dog con mayor predisposición al mastocitoma (Fonseca *et al.* 2015). Trabajos recientes indican que el factor de células madre (KIT) tiene etiología en este tumor. KIT se expresa normalmente en células hematopoyéticas y mastocitos. Consiste en un dominio de unión extracelular. La activación de la señal de traducción de KIT juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de mastocitos, este es codificado por el gen C-KIT que en mastocitomas se ha encontrado una desregulación en el exón 11 en aproximadamente 30% de los pacientes diagnosticados con este tumor (London *et al.*, 1999).

El pastor alemán por su parte exhibe una dermatofibrosis nodular específica de la raza. En México Fajardo *et al.* (2013) reporta al labrador como la raza más predisponente debido a que es una raza con alto riesgo a presentar tumores seguida por el schnauzer, cocker spaniel, pastor alemán, poodle, rottweiler y bulterrier.

2.4.2.3 Sexo

La mayoría de los tumores no tiene predisposición por sexo, sin embargo, se han encontrado algunos según Mohamed en 2006. Los tumores de glándulas hepatoideas se presentan más frecuentemente en machos que en hembras con casi el 89% y 11% respectivamente. Otro tipo de tumor común es el histiocitoma el cual es ligeramente más frecuente en machos (50-61%) que en hembras (39-50%), similar a estos, los melanomas son más frecuentes en machos (50-61%) que en hembras (39-50%). En contraste los leiomiomas y leiomiomasarcomas son más comunes en hembras (39-50%) que en machos (24%), así como los lipomas y fibromas.

Los tumores de glándula mamaria se encuentran casi exclusivamente en las hembras, presentándose en forma muy ocasional en machos esto atribuido a que la glándula mamaria en el macho tiene una estructura y función menos importante que en la hembra, además de su diferente comportamiento hormonal, lo que la hace menos susceptible pudiendo alcanzar hasta el 2,7% del total de este tipo de neoplasias (Moulton, 1978). Según estadísticas estos tumores en perras tienen una frecuencia de presentación de entre 198 a 260 casos por cada 100000 animales, representando el 25-50% de todas las neoplasias en hembras (Ziller, 2004).

Otro tumor mesenquimal que se tiende a presentar mayormente en hembras es el tumor venéreo transmisible las hembras se infectan con más frecuencia que los machos (64.5 y 35.5%, respectivamente) debido a que un macho infectado a menudo se aparea con numerosas hembras, en casa, grupos callejeros, así como en perreras (Ganguly, 2010).

Por el contrario, los machos tienen más riesgo a presentar hemangiomas y hemangiosarcomas y tumores de células escamosas que las hembras (Grutzing *et al.*, 2016). Así mismo en otro estudio realizado en Korea se reportó mayor riesgo de los machos por tumores en cavidad oral, sistema digestivo y sistema respiratorio (Choi *et al.*, 2016).

2.4.3 FACTORES MEDIOAMBIENTALES

2.4.3.1 Agentes virales

Se sabe que tanto los virus ADN como ARN son factores de riesgo para cáncer. Se ha encontrado que los virus ADN desarrollan frecuentemente tumores benignos como fibromas y papilomas, en cambio los virus ARN tienden a inducir tumores malignos (Todorova, 2006).

El primer paso para la transformación maligna de las células sanas es la integración parcial o completa del ADN viral (o copia del ADN ó ARN retroviral) dentro del genoma de la células hospedera. En algunos virus existen genes específicos (oncogenes) que han sido identificados como los iniciadores de la transformación maligna cuando son expresadas en células normales. Otros virus a través del proceso de integración activan la expresión de genes normales en la célula dirigiendo la sobreexpresión o inactivación de los genes (Whitrow, 2013). Esto da por resultado una proteína codificada por la acción de los protooncogenes la cual también esta alterada estructuralmente y funcionalmente conduciendo a la transformación de una célula normal en una célula cancerosa (Todorova, 2006).

El mecanismo por el cual una célula sufre alteraciones en su genoma se explica cuando el virus, por ejemplo, papiloma, lleva a la activación de la expresión de una cascada de genes virales. Entre las principales proteínas virales expresadas se encuentran los factores de replicación E1, E2, E6 y E7 (Álvarez *et al.* 2011).

Cuando las células infectadas migran hacia las capas suprabasales, se mantienen activas en el ciclo celular debido a la acción de la proteína E7 que actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia RB, que a su vez interactúan con factores de transcripción E2F promoviendo el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular corroborando su papel transformante en las células infectadas (Álvarez *et al.* 2011). Tanto la proteína E7 como la E6 actúan en el mantenimiento extracromosomal del virus.

Estas interacciones inducen múltiples respuestas celulares, incluyendo la disminución de p53 por la proteína E6 que bloquea su respuesta células. Con la división de las células basales infectadas, los genomas virales son distribuidos en las células hijas, estas células se separan de la capa basal, migran hacia el estrato granuloso y sufren diferenciación (Álvarez *et al.* 2011).

Otros agentes virales que se han estudiado en diferentes especies son el virus de la leucemia felina, que afecta gatos en todo el mundo. Se considera una de las enfermedades virales más frecuentes en gatos de países donde no existen adecuadas normas de manejo (Whitrow, 2010). El virus de la leucemia felina pertenece al género retrovirus mamífero tipo C, es un virus ARN que posee en su núcleo a la enzima transcriptasa reversa, que le permite pasar el material genético a ADN y formar un provirus, el cual penetra en el núcleo y se integra en el material genético de la célula huésped, lo que le asegura perpetuidad. En ausencia de estímulos o con un nivel inmunológico adecuado, los genes virales se mantienen latentes en la célula huésped por períodos indefinidos. Este virus posee una estructura simple dividida en tres partes. La más interna es la nucleocapside que protege el material genético, la intermedia con diferentes antígenos y la más externa que juega un papel esencial en los mecanismos de reconocimiento molecular y es la que permite la infección de células blanco específicas. Algunas de las proteínas virales, como la p27, se producen en exceso al multiplicarse el virus. Se identifican tres grupos de VILEF: el subgrupo A, que es aislado en el 100% de los casos y es el precursor de los otros dos subgrupos (B y C), y los subgrupos B y C que se originan de la recombinación del genoma viral del subgrupo A con la secuencia endógena celular (Olsen *et al.*, 1986).

Por otro lado, al menos cuatro herpesvirus han sido aislados del Viejo y Nuevo Mundo en monos, gorilas y chimpancés. siendo, solo los virus Herpesvirus saimiri y Herpesvirus (ambos de los monos del Nuevo Mundo) oncogénicos y solo en hospedadores heterólogos. El virus, a diferencia de otros herpesvirus oncogénicos, es linfotrópico para los linfocitos Th (Olsen *et al.*, 1986).

2.4.3.2 Factores físicos (Radiación)

Los rayos ultravioleta juegan un rol crucial en el desarrollo de tumores cutáneos tal que en humanos está ampliamente estudiado en el desarrollo de carcinoma de células escamosas siendo similar el comportamiento en animales de compañía. Dicho trastorno se caracteriza por una exposición crónica al sol y una pigmentación clara de la piel presentándose principalmente en cara y plano nasal (Vail y Withrow, 2007).

Debido a las deleciones que provoca en el ADN, la radiación ultravioleta (UV), ha sido ampliamente estudiada dividiéndola en tres tipos o bandas: UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320), y la UVC (200 a 280 nm) de las cuales la UVA es la que más penetra la capa de ozono, sin embargo, UVB es más responsable que la UVA de producir daño biológico, ya que contribuye con cerca del 80% de los efectos dañinos que se asocian a la exposición solar (Cabrera y López, 2006).

La radiación UVA actúa de forma indirecta al interaccionar con sustancias cromóforas y generar radicales libres y especies reactivas de oxígeno que dañan el material genético, en cambio la radiación UVB puede actuar de forma directa dañando el ADN por sí misma (Echeverría GB y Botella EF, 2009). El 70% de la radiación UVB es absorbida por el estrato córneo de la epidermis, a diferencia de la radiación UVA que es absorbida entre el 70-80% por células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal (Cabrera y López, 2006).

Es así como exposiciones crónicas a UVB puede inducir tumores cutáneos generando mutaciones en el gen p53 e indirectamente perjudicando la respuesta inmune a antígenos tumorales (Vail y Withrow, 2007). Según Cabrera y López (2006) para que se desarrolle una neoplasia se atraviesa por tres estadios: inicio, promoción y progresión. Durante la fase inicial los fotoproductos no-reparados originados por efecto de la radiación UV pueden ocasionar mutaciones en regiones codificantes de oncogenes y genes supresores de tumor. La exposición UV crónica da lugar a la aparición de un tumor benigno formado a partir de la expansión clonal de células epidérmicas portadoras de modificaciones y por último la progresión se lleva a cabo

mediante la continua exposición a los rayos ultravioleta y la selección de clones de células resistentes a la apoptosis.

A nivel del genoma la radiación ultravioleta induce la formación de dos fotoproductos los dímeros de pirimidina tipo cilobutano (CPDs), y los fotoproductos de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs). Ambas lesiones se forman exclusivamente en dímeros de pirimidinas, constituyendo los “*hot spots*” inducidos por radiación UV. Ambas lesiones son reparadas por el sistema NER (Sistema de reparación de escisión de nucleótidos), siendo los productos 6-4 PP's más fácil de reparar (cinco veces más rápido) debido a que causan una mayor alteración en el ADN y por lo tanto son más evidentes para su reparación en comparación de los CPD's que no son tan evidentes, pero tienden a ser más abundantes en número (Cabrera y López, 2006).

La radiación ultravioleta induce predominantemente transiciones C-T y CC-TT en las secuencias de dímeros de pirimidina, constituyendo la característica más destacada de la mutagénesis por radiación UV. Ambas mutaciones se originan durante la replicación, cuando la DNA polimerasa llega a una lesión de dímero de pirimidina interpreta de manera incorrecta las bases introduciendo una adenina. Por lo tanto, los dímeros C-C pueden originar mutaciones del tipo C-T o bien CC-TT, ya que la DNA polimerasa inserta una A enfrente de una C de la hebra complementaria. Posteriormente se insertan residuos de T en la hebra recién sintetizada dando lugar a la aparición de la mutación.

2.4.3.3 Agentes químicos

En comparación con los agentes virales que solo están relacionados a tumores específicos, los carcinógenos químicos participan en el desarrollo de varios tipos de cáncer (Todorova, 2006). Hay dos grupos de carcinógenos químicos: directos e indirectos (procarcinógenos). Los carcinógenos de acción indirecta, requieren una activación metabólica por enzimas normalmente presentes en el cuerpo, para convertirse en cancerígenos. La activación indirecta generalmente

ocurre durante procesos fisiológicos normales, cuando el cuerpo elimina sustancias tóxicas en el torrente sanguíneo.

Dependiendo del tipo de carcinógeno, estos pueden ser absorbidos de varias maneras (oral, inhalador, cutáneo e inyectable) y distribuidos en varios tejidos. La absorción depende de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia y puede tener lugar mediante transporte pasivo o activo. Las sustancias absorbidas pasan oralmente a través del hígado y solo entonces se distribuyen en el cuerpo (carcinógenos directos), aunque, la mayoría requieren conversión enzimática (carcinógenos indirectos o procarcinógenos). La activación metabólica está controlada por reacciones de fase I, mientras que las reacciones de fase II protegen el cuerpo a través de la transformación de compuestos activados en productos inertes que se eliminan fácilmente del cuerpo (Whitrow *et al* 2010).

Las enzimas en fase I participan en las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, y se clasifican como oxidorreductasas (monooxigenasas dependientes del citocromo P450, flavina monooxigenasas, ciclooxigenasas y alcohol deshidrogenasa) e hidrolasas (epóxido hidrolasas). Las enzimas de fase II participan en conjugación e inactivación de carcinógenos químicos e incluyen transferasas (glutación S-transferasas, Nacetiltransferasas, UDP-glucuronosiltransferasas, sulpotransferasas) (Oliveira *et al.*, 2007).

Las peroxidación también ocurren paralelamente a las reacciones metabólicas con la producción continua de especies reactivas de oxígeno (EROS). Las EROS dañan el ADN, el ARN y las proteínas por reacciones químicas como la oxidación, la nitración / nitrosación y la halogenación. Esto conduce a un aumento en las mutaciones y alteraciones en las funciones de enzimas y proteínas importantes. Varios experimentos han demostrado que los compuestos químicos, que crean ROS en exceso, fomenta la iniciación, la promoción y progresión neoplásica a través de la genotoxicidad (Oliveira *et al.*, 2007).

Algunos químicos asociados en la carcinogénesis como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) han sido estudiados en el desarrollo de linfoma. Esta investigación desarrollada en Estados Unidos fue uno de los primeros casos-control en los que se correlaciona la presencia de linfoma con 2,4 D. Los dueños de los perros con linfoma indicaron que utilizaban este herbicida en sus tierras con mayor frecuencia que los dueños con perros clínicamente sanos (Hayes *et al.*, 1991).

En otros estudios, el carcinoma de células transicionales se correlacionó con el uso de insecticidas tópicos contra el tratamiento de garrapatas y pulgas. Algunos de los ingredientes activos de estos insecticidas incluyen los organofosfatos inhibidores de la colinesterasa, carbamatos, piretrinas e insecticidas a base de piretroides. Así mismo estas formulaciones contienen sinergistas como el butóxido de piperonilo, MGK-264 que potencian su actividad insecticida. Además de contener hasta un 96% de ingredientes inertes, incluidos destilados de petróleo, solventes de petróleo aromáticos, poliéteres y xileno.

La concentración relativamente alta de destilados de petróleo en inmersiones puede ser importante dado que la industria del petróleo ha sido identificada como un factor de riesgo relacionado con el trabajo para el cáncer de vejiga humano (Claude *et al.*, 1988).

3.JUSTIFICACIÓN

En México, los estudios epidemiológicos sobre oncología son limitados a un número escaso de publicaciones en revistas de carácter científico, reteniendo la información en revistas de divulgación y congresos nacionales, lo que conlleva al desconocimiento de datos certeros sobre la frecuencia y características de los tumores en perros en nuestro país, así como los factores de riesgo que desencadenan la enfermedad, ya sea aquellos que involucran al individuo así como factores medio ambientales relacionados a la presencia de los tumores (radiación, agentes químicos, virus). Aunado a esto, otra herramienta fundamental que nos ayuda a entender estos factores de riesgo, es la epidemiología de población, que nos permite obtener un panorama sobre las características biológicas de una población determinadas (raza, edad y sexo) para poder asociarlas a factores de riesgo involucrados en la tumorigénesis. Por lo cual, el objetivo de este trabajo es identificar la frecuencia de tumores en perros diagnosticados por histopatología en el CIESA, evaluando las características del individuo (raza, edad y sexo) junto con las características de la población canina actual del municipio de Toluca.

4. HIPÓTESIS

Los tumores en perros diagnosticados por histopatología en el CIESA tienen una frecuencia similar a la de otros países. Y las características (raza, edad y sexo) de los individuos con tumores diagnosticados en el CIESA son similares a las características de la población canina actual del municipio de Toluca.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar la frecuencia de tumores en perros diagnosticados por histopatología en el CIESA, evaluando las características del individuo (raza, edad y sexo) junto con las características de la población canina actual del municipio de Toluca.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener la frecuencia de tumores en perros diagnosticados en el CIESA del año 2002 al 2016.
2. Obtener características de la población canina actual del municipio de Toluca.
3. Identificar los posibles factores de riesgo (raza, edad, sexo) que comparten los perros diagnosticados con tumores y la población canina del municipio de Toluca.
4. Realizar estudio de comportamiento biológico por medio de histopatología y marcadores tumorales del tumor más frecuente diagnosticado en el CIESA.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Estudio retrospectivo de tumores diagnosticados en CIESA

Se realizó un estudio epidemiológico retrospectivo y transversal de tumores en perros diagnosticados por histopatología en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA-FMVZ-UAEM) a través de una base de datos compilada en el período 2002-2016. Todas las muestras recibidas durante el período se procesaron mediante métodos de histoquímica convencionales y para el diagnóstico de tumores específicos, se realizaron tinciones especiales tales como Fontana, Giemsa y tinción con ácido peryódico (PAS). El diagnóstico se realizó de acuerdo con la Clasificación Histológica Internacional de Tumores de los Animales Domésticos de la Organización Mundial de la Salud y del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas con la cooperación del Registro Americano de Patología (AFIP / OMS, 2001).

6.2 Encuesta aplicada a los habitantes del municipio de Toluca

Para conocer algunas de las características de la población canina y los posibles factores de riesgo relacionados con la tumorigénesis en perros del municipio de Toluca, se realizó una encuesta personal a la población de esta ciudad. El número total de personas encuestadas se calculó utilizando la fórmula de tamaño de muestra de población finita (Jaramillo *et al.*, 2009). Algunos de los criterios de selección para las personas encuestadas fue ser residentes de Toluca, independientemente de la edad o el sexo, y así mismo, la encuesta se aplicó a personas sin perros para conocer el número de personas que no tienen perros en casa. Los lugares donde se llevaron a cabo las encuestas fueron en parques, escuelas y hogares privados. Se llevaron a cabo cincuenta encuestas piloto en un período de 15 días para posteriormente aplicar las encuestas finales. La encuesta consistió en tres secciones con preguntas cerradas y respuesta múltiple o dicotómica dependiendo de la naturaleza de la pregunta (Jaramillo *et al.*, 2009). La primera sección de la encuesta recopiló información sobre las características del individuo como raza, edad y sexo; la segunda sección se centró en el tipo de alimentación que tienen perros; el tercero, en el tipo de hábitat donde viven y si asistieron a consultas médicas periódicas con el médico veterinario.

6.3 Evaluación de características histopatológicas del tumor más frecuente

Posterior a realizar el análisis retrospectivo de los tumores diagnosticados en CIESA, se procedió a recolectar los tumores que tuvieron más frecuencia en el estudio, para posteriormente por medio de histopatología evaluar su comportamiento biológico.

Todos los tumores del archivo se recolectaron ya incluidos en cubos de parafina para posteriormente realizar cortes de 3 micras y ser evaluados por medios de tinción H&E buscando características de histológicas de malignidad y benignidad. Las características de benignidad que se evaluaron fueron las siguientes: buena diferenciación celular, número de mitosis bajo (<2), presencia de cápsula, epitelio sin ulceración e infiltrado linfocitario severo. Las características de malignidad incluyeron: anaplasia (en base a la anasocitosis y megacariosis), compresión vascular, invasión vascular, ausencia de cápsula, ulceración, invasión local, número de mitosis alto (>6), mitosis aberrante y presencia de metástasis. Así mismo en ambos apartados se evaluó el estado de crecimiento en el que se encontraba el tumor y el color del citoplasma.

El número de mitosis se determinó en un campo a 400X, obteniéndose el promedio de 10 campos aleatorios a 400X. Los rangos para la tasa mitótica se consideraron bajos para 0-2, medio para 3-5 y alto cuando se contaron ≥ 6 núcleos mitóticos (Fournel-Fleury, *et al.*, 2002).

6.4 Inmunohistoquímica del tumor más frecuente.

Con la finalidad de evaluar el comportamiento biológico molecular de los tumores analizados anteriormente por histopatología se utilizaron dos marcadores moleculares de malignidad (HIF-1 α y GLUT-1) por medio de la técnica de inmunohistoquímica con microarreglo de tejidos (MAT). Previo a realizar la inmunohistoquímica se efectuó la prueba de persistencia de epítopes antigénicos en los tejidos con parafina utilizando el biomarcador Vimentina para verificar exceso de marcaje de fondo. Se utilizó el sistema biotina-estreptavidin-

peroxidasa. Se realizaron varios cortes de 2 micras del MAT y se montaron en laminillas electrocargadas. Los cortes se desparafinaron a 59 grados y posteriormente se hidrataron en un baño de xiloles. Para el desenmascaramiento antigénico se utilizó una olla de presión dejando las laminillas inmersas en ácido etilendiaminotetracético (EDTA) por 5 minutos. Se realizó lavado de las laminillas y después se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (0.9%) por 5 minutos. Seguido de esto incubó el primer anticuerpo a temperatura ambiente toda la noche. Los anticuerpos que se utilizaron fueron GLUT-1 (Genova AP10096 policlonal conejo 1/100) y HIF1 α (Sigma-Aldrich H6536 monoclonal ratón 1/100). Posterior a la incubación se realizó lavado con PBS y se incubó el anticuerpo secundario por 30 minutos. Se lavó nuevamente y se aplicó estreptavidina HRP por 30 minutos. Se efectuó otro lavado y se reveló con diaminobencidina (DAB). La contra tinción se realizó con Hematoxilina de Gill. El control para GLUT1 fueron eritrocitos de bazo de perro y para HIF1 α un tumor de células cebadas (mastocitoma). Finalmente, las laminillas se visualizaron en un microscopio óptico marca olympus.

6.5 Sistema de puntuación de inmunoreactividad para inmunohistoquímica.

El porcentaje de inmunoreactividad fue en base a la modificación de (Petty *et al.*, 2008) en el cual el porcentaje de células teñidas se calcula de 0 a 2; 0= <1% de células positivas, 1= 1 al 50% de células positivas, 2= >50% de células positivas. La intensidad de la tinción en las células tumorales se midió de 1 a 2; 1= débil tinción y 2= intensa tinción. La suma de estas dos puntuaciones se utilizó para obtener el puntaje final de inmunoreactividad. Si la suma fue de 1 a 2 el puntaje final fue 1, cuando la suma era de 3 a 4 el puntaje final fue 2.

6.6 Análisis estadístico

Para la evaluación del estudio retrospectivo los datos sobre edad, raza, sexo y diagnóstico final (histogénesis, comportamiento biológico y tipo de tumor), así como las encuestas, se analizaron por medio de estadística descriptiva utilizando el programa STATA 7.0. de igual modo, para la evaluación de las características histopatológicas de los tumores más frecuentes se utilizó estadística descriptiva utilizando el programa Excel 2010, y para encontrar diferencias entre los marcadores GLUT1 y HIF1 se utilizó la prueba Mann Whitney <0.05 .

7. RESULTADOS

7.1 Epidemiología descriptiva de los tumores

Un total de 393 tumores diagnosticados por histopatología fueron remitidos al Centro de Investigación y Estudios avanzados en Salud Animal (CIESA) durante el período de estudio. Los tumores cutáneos fueron los más frecuentes (59.0%), seguidos por el tracto reproductor (16.3%), glándula mamaria (12.5%) aparato digestivo (4.6%), linfático (3.6%), músculo esquelético (2.5%), respiratorio (1.3 %) y endocrino (0.2) (Figura 2).

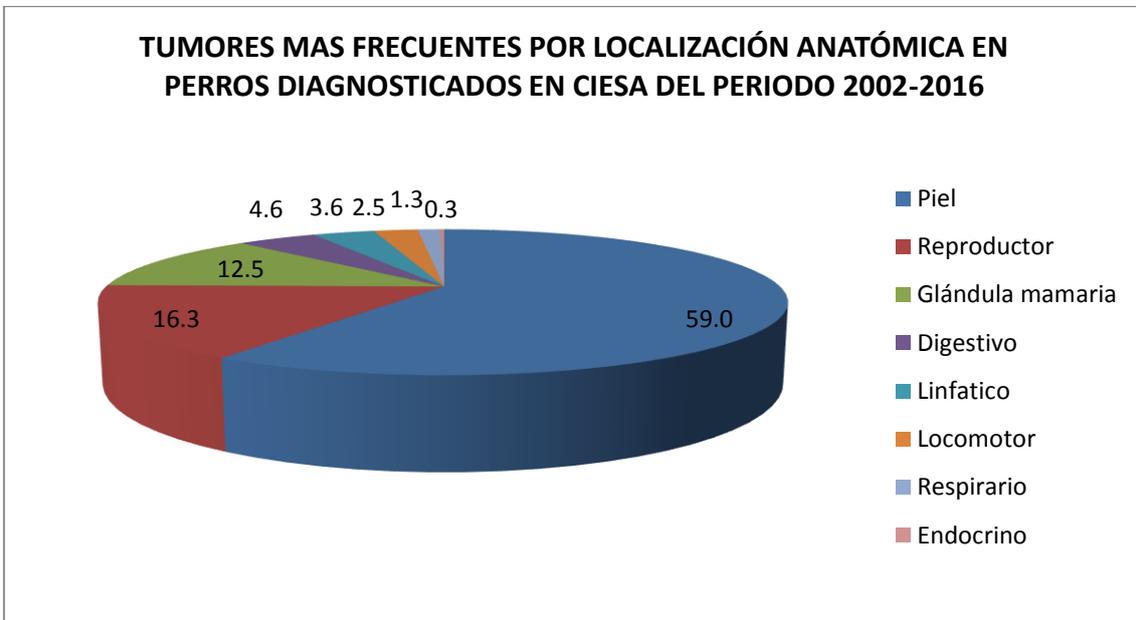


Figura 2. Tumores más frecuentes por localización anatómica en perros diagnosticados en CIESA en el periodo 2002-2016.

Individualmente, los tumores más frecuentes fueron el tumor venéreo transmisible (13.7), que se presentó principalmente en tracto reproductor y piel, seguido de tumores cutáneo: Fibroma (9.1%), mastocitoma (7.8%) e histiocitoma (6.5%) seguidos por los tumores que se asocian a la exposición solar: carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma maligno (Fig. 3).

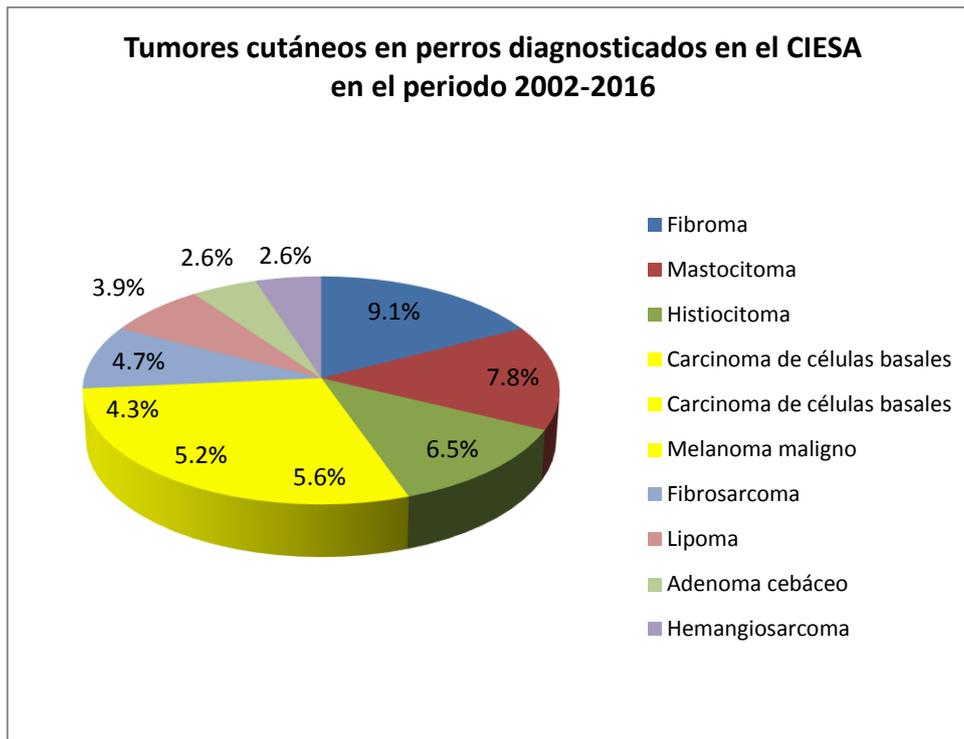


Figura 3. Frecuencia de los diez tumores de piel más frecuentes diagnosticados en el CIESA. Los tumores asociados con la exposición a la radiación ultravioleta se muestran en amarillo.

En relación a las características del individuo, se evaluó edad, raza y sexo (Cuadro 3). En cuanto a la edad que más se presentó, fue en el grupo de perros mayores de 7 años (54.7%) seguidos por el grupo de 1 a 7 años (34.6%) y finalmente un pequeño porcentaje (6.1%) fue en cachorros (<1 año). En relación al sexo, la frecuencia de los tumores fue mayor en las hembras (52,9%) que en machos (47,1%). Las razas puras 82.5% fueron más frecuentes que las razas mixtas 17.5%. La raza pura más común fue Labrador (11.4%) seguido de Poodle (7.8%), Schnauzer (6.1%), cocker spaniel (5.6%) y pastor alemán (5.3%).

Sobre las características de los tumores, se evaluó comportamiento biológico e histogénesis (Cuadro 3). De acuerdo al comportamiento biológico el 60.3% de los tumores fueron benignos y un 39.7% fueron malignos. Los tumores benignos se encontraron mayoritariamente en las hembras y así mismo, las razas mixtas tuvieron la frecuencia más alta del este tipo de tumores 23%

(52/224). En cuanto a la histogénesis, hubo más tumores de origen mesenquimatoso que epitelial (Cuadro 3). De los tumores mesenquimales, la mayoría fueron benignos (148/212) y se presentaron más en hembras que en machos (106 vs 102). Los perros de raza mixta fueron los que más presentaron tumores mesenquimales (24%). De los tumores de origen epitelial, el 54.1% fueron benignos, y se presentaron más en hembras que en machos (102/181). La raza más afectada fue el Poddle (13.2%).

Tabla 3. Características biológicas de los tumores y de los individuos diagnosticados en CIESA en el periodo 2002-2016.

VARIABLES	NO CASO	PORCENTAJE
TUMORES TOTALES	393	100%
COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO		
Maligno	156	39.7
Benigno	273	60.3
TEJIDO DE ORIGEN		
Mesenquimal	212	54
Epitelial	181	46
SEXO		
Hembras	208	52.9
Machos	179	45.5
N/D	6	1.6
RANGO DE EDAD		
<1 año	24	6.1
1 a 7 años	136	34.6
>7 años	215	54.7
N/D	18	4.6
RAZA		
Razas Puras	324	82.5
Razas Mixtas	69	17.5

7.2 Encuesta a los habitantes del municipio de Toluca

Las 1500 encuestas aplicadas a los habitantes del municipio de Toluca revelaron que el 67.5% de las personas entrevistadas (1,012) tienen uno o más perros en casa, mientras que un 32.5% (488) informaron que no tenían perro en casa.

Sobre las características de los individuos, se observó que los machos eran más numerosos que las hembras (Cuadro 4). El mayor porcentaje de perros se encontraba en una edad adulta (1 a 7 años), mientras que otro porcentaje se distribuyó en perros mayores de 7 años y menores de 1 año (Cuadro 4). La mayoría de los perros eran de raza pura (62.7%), pero un porcentaje importante era de raza mixta (37.3%). La raza Chihuahua fue la más frecuente (6.7%) seguida por la Schnauzer (6.6%), Poddle (4.8%) y pastor alemán (4.3%). En relación a las características de vivienda de los perros del municipio de Toluca, la mayoría de las personas (54.2%) comentaron que sus mascotas vivían fuera del hogar provistos de algún tipo de sombra, pero exponiéndose a cierta radiación solar al día, a pesar de tener algún tipo de techo provisto por los propietarios. Un porcentaje importante mencionó que sus perros vivían fuera sin ningún tipo de sombra (5.6%) y el resto mencionó que vivían dentro de casa o ambas (fuera y dentro) (Cuadro 4).

La mayoría de los perros comen dietas comerciales que incluyen croquetas y alimento enlatado (50.6%). Otro porcentaje consume alimento hecho en casa para la familia (11.7%), y el resto come tanto alimento de casa como alimento industrial (37.7%). Solo el 47.4% de las personas encuestadas mencionó llevar a sus perros a visitas médicas veterinarias dos veces al año. El 44.6% comentó que lo llevan cada año y el resto solo lo lleva cuando el animal se enferma (tabla 2). Así mismo, cuando se mencionó el tema de la esterilización solo el 32.3% de las personas respondieron positivamente a tener a sus perros esterilizados mientras el resto dijo que no (Cuadro 4).

Tabla 4. Características de la población canina del municipio de Toluca obtenidas a través de una encuesta.

VARIABLE	SEXO (%)		TOTAL DE ENCUESTAS (%)
	MACHOS	HEMBRAS	
	53,4	46,6	100,0
EDAD			
< 1 año	11,4	7,7	19,1
1 a 7 años	32,7	29,4	62,1
> 7 años	9,3	9,4	18,7
S/D	0	0,1	0,1
RAZA			
Puras	66.4	59.3	
Mixtas	33.6	40.7	
ALIMENTO			
Industrial	25,6	25,0	50,6
Casa	7,1	4,6	11,7
Mixto	20,7	17,0	37,7
S/D	0	0,1	0,1
VIVIENDA			
Dentro de casa	19,7	18,4	38,1
Fuera con sombra	30,1	24,1	54,2
Fuera sin sombra	2,6	3,0	5,6
Dentro y fuera	0,9	1,1	2,0
S/D	0,1	0.0	0,1
VISITAS MVZ			
Cada 6 meses	24,4	23,0	47,4
1 año o mas	24,8	19,8	44,6
Enfermedad	4,2	3,8	8,0
ESTERILIZACIÓN			
Si	15,4	16,9	32,3
No	37,9	29,7	67,6
S/D	0	0,1	0,1

7.3 Análisis del tumor más frecuente diagnosticados en CIESA

De todos los tumores diagnosticados en CIESA, el tumor venéreo transmisible canino (TVTC) fue el más frecuente, por lo que se procedió a realizar un análisis histopatológico y molecular. En total, se obtuvieron 33 TVT's de los cuales, 10 fueron eliminados del estudio debido a que el tejido presentaba daño.

Todos los tumores estaban compuestos de células redondas de tipo histiocítico con cromatina condensada. De los 23 tumores analizados 8 (34.8%) se encontraban en fase de progresión, 6 (26.1%) en fase estable y 9 (39.1%) en fase de regresión. El color de citoplasma por lo general fue eosinofílico, no obstante, el 30.4% (7/23) de las muestras presentaban un color más claro (Figura 4).

Se realizó una evaluación de las características histológicas de malignidad y benignidad en todos los tumores (Cuadro 5). Las características de malignidad incluyeron: conteos mitóticos altos, mitosis aberrantes, grado de diferenciación bajo (anaplasia), ausencia de capsula, ulceración, compresión e invasión vascular, metástasis e invasión. En cuanto a benignidad se evaluó: conteos mitóticos bajos, mitosis normales, buena diferenciación, presencia de cápsula, epitelio intacto, no evidencia de metástasis e infiltraciones linfocitarias severas.

En relación al conteo mitótico, más del 50% de las muestras presentaron un conteo medio, no obstante, el 90.1% de las muestras presentaron algún tipo de mitosis aberrante principalmente tripolares y tetrapolares. En cuanto al grado de diferenciación, casi todos los tumores estaban bien diferenciados (Cuadro 5), no obstante, un número importante presentó células poco diferenciadas (34.8%). Ningún tumor presentó cápsula, aunque en algunos se observaron zonas donde se presentaba una pseudo cápsula.

Tabla 5. Características histopatológicas de malignidad y benignidad del tumor venéreo transmisible.

MALIGNIDAD	NO	%	BENIGNIDAD	NO	%	TOTAL (%)
Conteo mitótico			Conteo mitótico			
Medio	13	56.5	Bajo	6	26.1	100
Alto	4	17.4	Mitosis normales	3	8.7	100
Mitosis aberrantes	20	91.3	Buena diferenciación	15	65.2	100
Anaplasia	8	34.8	Presencia de cápsula	0	0	100
Ausencia de cápsula	23	100	Epitelio intacto	3	8.7	100
Ulceración	20	91.3	Vasos sin compresión	1	4.3	100
Compresión vascular	22	95.7	Vasos sin invasión	17	73.9	100
Invasión vascular	6	26.1	SEM	22	96	100
Metástasis	1	4	Infiltración linf. severa	9	24	100
Invasividad	23	100				100
						24

SEM: sin evidencia de metástasis

En negritas se observan los datos más significativos

Todos los tumores analizados invadieron la lámina propia de la mucosa generando compresión en el epitelio y ulcerando alguna sección del tumor (91.3%), así mismo se observó compresión vascular en casi todos los tumores 22/23 (95.7%) y en algunos casos células que invadieron los vasos linfáticos y sanguíneos (26.1%). Nueve tumores (24%) mostraron infiltración linfocitaria severa que se asoció a la fase de regresión del tumor.

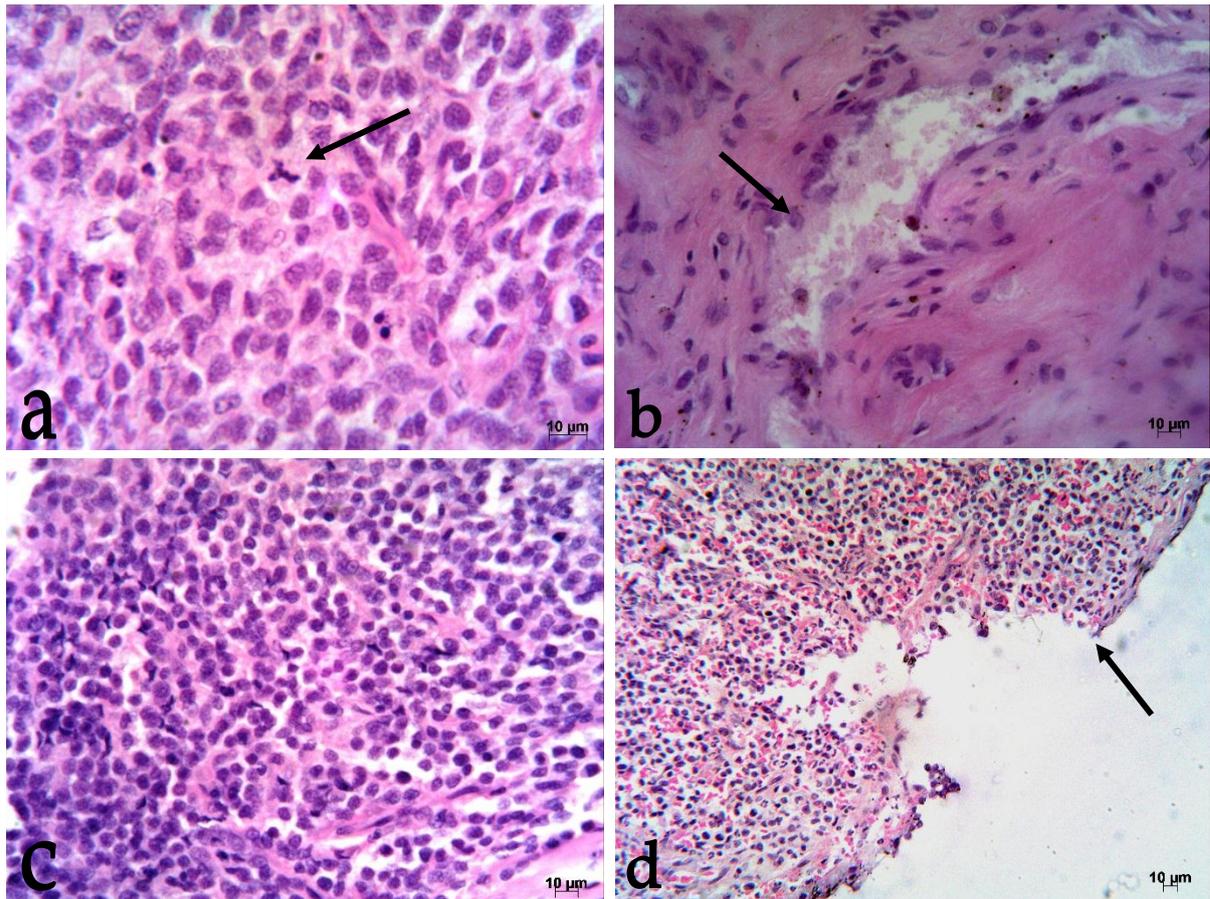


Figura 4. Cortes histológicos de tumor venéreo transmisible canino (TVTC). A) Mitosis aberrantes tetrapolares. B) Destrucción de endotelio vascular con invasión de células neoplásicas. C) Alto índice mitótico. D) Ulceración de epitelio con infiltrado de células inflamatorias (flecha negra). Tinción H&E.

Posterior a la evaluación histológica del TVT, se tomaron 3 características constantes en el tumor creando tres grupos: 1. Tumor de células claras (TCC) 2. Tumor de células bien diferenciadas (TCBD) y 3. Tumor de células anaplásicas (TCA).

Como se observa en el cuadro 6, los tres grupos presentan cualquier estadio de crecimiento. El grupo TCC presentó un número mitótico más alto con respecto a los otros (M=6). Así mismo las mitosis aberrantes se observaron más en el grupo TCBD (100%).

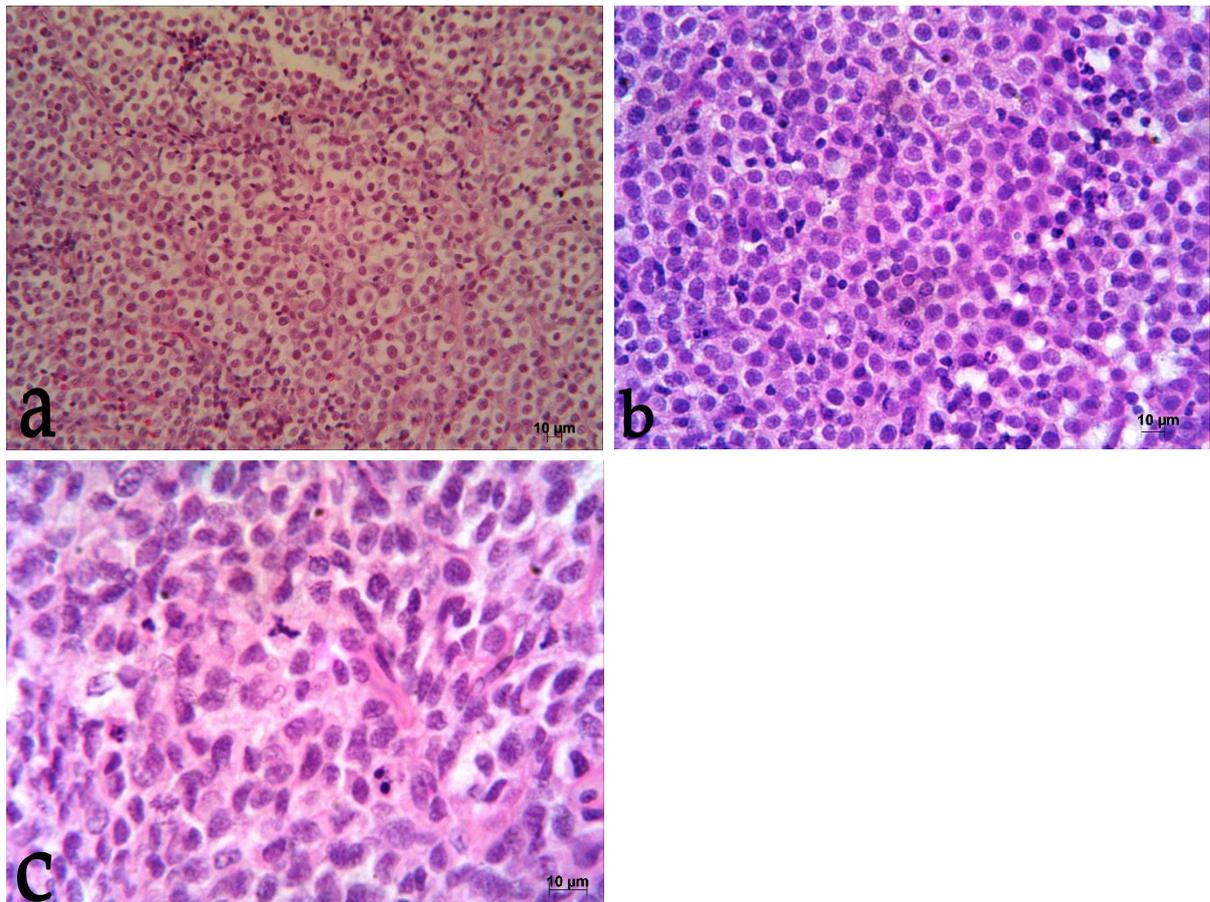


Figura 5. Tres grupos de Tumor Venéreo Transmisible. a) tumor de células claras (250X) b) Tumor de células bien diferenciadas (TCBD) (400x) c) Tumor de células anaplásicas (TCA)(400x). Tinción H&E.

Todos los grupos presentaban algún grado de ulceración, no obstante, todos los TCA (100%) tuvieron ulceraciones severas. En cuanto a la compresión vascular, el 100% de los TCC y TCBD mostraban células neoplásicas comprimiendo vasos sanguíneos y linfáticos, pese a esto, los TCA fueron el grupo que más presentó invasión vascular (33.3%) lo cual se relaciona con el único caso que se reportó con metástasis. Por último, los tres grupos presentaron infiltraciones linfocitarias ligeras, a excepción del grupo TCBD que el 50% de los tumores tuvieron infiltraciones linfocitarias severas (5/10).

Tabla 6. Nueva clasificación de TVTC de acuerdo las características histopatológicas más representativas.

	TCC (7)	%	TCBD (10)	%	TCA (6)	%
Fase de crecimiento						
Progresión	3	42.9	3	30	2	33.3
Estable	3	42.9	1	10	2	33.3
Regresión	1	14.3	6	60	2	33.3
Conteo mitótico	Media	6	Media	4	Media	3
Alto	2	28.6	2	20	0	0.0
Medio	5	71.4	4	40	4	66.7
Bajo	0	0.0	4	40	2	33.3
Mitosis aberrantes	6	85.7	10	100	5	83.3
Ausencia de cápsula	7	100	10	100	6	100
Ulceración	6	85.7	9	90.0	6	100
Compresión vascular	7	100	10	100	5	83.3
Invasión vascular	2	28.6	2	20.0	2	33.3
Metástasis	0	0.0	0	0	1	16.7
Infiltración linfocitaria						
Ligera	5	71.4	4	40	3	50
Moderado	0	0	1	10	1	16.7
Severa	2	28.6	5	50	2	33.3

TCC: tumor células claras

TCBD: tumor células bien diferenciadas

TCA: tumor células anaplásicas

7.4 Marcadores de malignidad HIF-1 α Y GLUT-1

Los resultados de la inmunohistoquímica con HIF1- α y GLUT-1 se analizaron de acuerdo a los grupos creados en este trabajo (TCBD, TCC, TCA) por medio de micro arreglos de tejidos. El marcaje de GLUT-1 fue negativo en todos los casos, aun cuando el control interno del mismo tumor (eritrocitos) fue positivo.

En cuanto al marcaje HIF-1 α los resultados se resumen en el cuadro 5. Todos los marcajes se obtuvieron en citoplasma. El 17.3% de las muestras de todos los grupos fue negativo y el 82.6% fue positivo. Todos los grupos presentaron un comportamiento homogéneo teniendo menos el 20% de sus muestras sin

ningún marcaje y el resto (80%) presenta algún grado de inmunotinción, principalmente grado 2. Los tumores de células claras presentaron un marcaje más intenso comparado con los otros grupos (tabla 7). La prueba de Man Whitney no indicó diferencias significativas entre el marcaje de todos los grupos.

Tabla 7. Frecuencia y porcentaje de inmunoreactividad de HIF-1 α en tres grupos de tumor venéreo transmisible canino (TVTC).

Grupos	Grado de inmunotinción N (%)			Valor p
	0	1	2	
Tumor de células claras (n=7)	1 (14.2)	0 (0)	6 (85.8)	0.8186
Tumor de células bien diferenciadas (n=10)	2 (20)	0 (0)	8 (80)	0.4665
Tumor de células anaplásicas (n=6)	1 (16.6)	2 (33.3)	3 (50)	0.4670

Prueba Man Whitney p <0.05

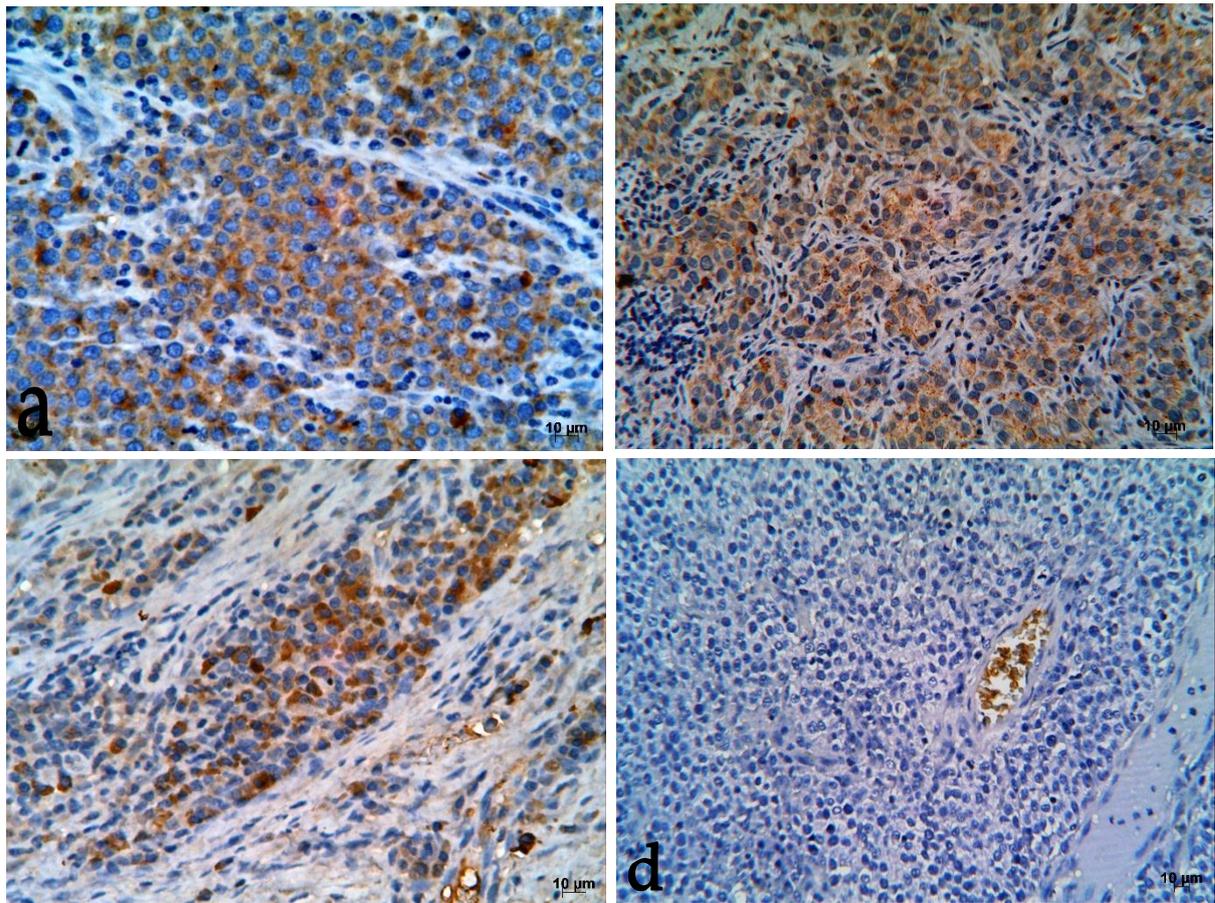


Figura 6 Cortes histológicos con marcaje positivo a HIF-1 α (a, b, c). A) Células bien diferenciadas B) células anaplásicas. C) células claras. D) Marcaje negativo con GLUT-1 en células bien diferenciadas de TVTC. Se muestran eritrocitos marcados como control positivo. Contra tinción H&E

7.5 Artículo enviado

EPIDEMIOLOGY OF TUMORS IN DOGS IN THE CAPITAL OF THE STATE OF MEXICO DURING THE PERIOD 2002-2016

EPIDEMIOLOGIA DE TUMORES EM CÃES DO CAPITAL DO ESTADO DO MÉXICO DURANTE O PERÍODO 2002-2016

Elva García¹, Aide Alpízar², Raúl Fajardo^{2*}, Dionicio Córdova³, Luis Pérez²,
Simón Martínez²

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15,5. CP. 50200. Toluca, México.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15,5. CP. 50200. Toluca, México.

³Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Microbiología (CENID Microbiología), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera federal México-Toluca km 15,5, Cuajimalpa, Cd. de México. C.P. 05110.

Corresponding author: Raúl Fajardo. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Carretera Toluca-Atlacomulco Km. 15,5. CP. 50200. Toluca, México. Telephone: +5217221680892. Fax: +527222965555. E-mail: raul_fajard@hotmail.com

ABSTRACT

A retrospective and cross-sectional study of canine tumors was performed in the capital of State of Mexico during the period of 2002-2016. Since this period 393 tumors were remitted. Descriptive epidemiology was made from all data: breed, age, sex, and tumor features. Then the risk association between cutaneous and non-cutaneous tumors with variables as sex, breed, and age were analyzed through an exact Fisher test and Odds ratio. In addition, some characteristics of the canine population were studied under a survey. Of all tumors, skin tumors were the most frequent (59.0%). The group of tumors related to ultraviolet radiation was the most common (15.1%). The frequency of tumors in females was 53%, nevertheless, males had more risk to develop cutaneous tumors (OR=1.88, 1.24-2.84) (0.003). The Pure breeds were the most common (82.5%) and the most frequent age range was > 7 years (54.7%). The survey showed that males (53%) and the age range 1-7 years (62.1%) were the most frequent. Conclusions, age, breed, and sex were identified as the major risk factors for tumorigenesis. Likewise, skin tumors were associated with exposure to ultraviolet radiation, probably to the height of the locality (2667 mamsl).

Keywords: tumors, dogs, epidemiology, skin tumors, ultraviolet radiation.

RESUMO

Um estudo retrospectivo e transversal dos tumores caninos foi realizado na capital do Estado do México durante o período de 2002-2016. Desde este período 393 tumores foram remetidos. Epidemiologia descritiva foi feita a partir de todos os dados: raça, idade, sexo e características do tumor. Em seguida, a associação de risco entre tumores cutâneos e não-cutâneos com variáveis como sexo, raça e idade foi analisada por meio do teste exato de Fisher e Odds ratio. Além disso, algumas características da população canina foram estudadas em uma pesquisa. De todos os tumores, os tumores de pele foram os mais frequentes (59,0%). O grupo de tumores relacionados à radiação ultravioleta foi o mais comum (15,1%). A frequência de tumores no sexo feminino foi de 53%, no entanto, os machos apresentaram maior risco de

desenvolver tumores cutâneos (OR = 1,88; 1,24-2,84) (0,003). As raças Puras foram as mais comuns (82,5%) e a faixa etária mais frequente foi > 7 anos (54,7%). A pesquisa mostrou que os machos (53%) e a faixa etária de 1 a 7 anos (62,1%) foram os mais frequentes. Conclusões, idade, raça e sexo foram identificados como os principais fatores de risco para a tumorigênese. Da mesma forma, os tumores cutâneos foram associados à exposição à radiação ultravioleta, provavelmente até a altura da localidade (2667m ANM).

Palavras-chave: tumores, cão, epidemiologia, tumores cutâneos, radiação ultravioleta.

INTRODUCTION

Currently, tumors are one of the main causes of death in the veterinary practice of small species, this is because the survival time has increased in these species as in humans (Fleming *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2016). Epidemiological studies have shown that the most frequent neoplasms in these species are those of the skin, followed by mammary gland, hematopoietic system and soft tissues (Brønden *et al.*, 2010; Grüntzig *et al.*, 2016). Another important aspect that has generated epidemiology is the knowledge of risk factors that affect the individual, both, genetically and environmentally (Fleming *et al.*, 2011). It is known that animal characteristics such as age, breed, and sex play an essential role in triggering the growth of a neoplasm in the individual. Certain breeds such as Labrador, Boxer, Golden Retriever, Rottweiler, among and others, have a genetic predisposition to cancer (Dobson, 2013). It is also considered that at any age, the individual is susceptible to develop tumors, however, there is a marked predisposition in long-lived animals and this is associated with a progressive accumulation of genetic mutations that lead to cancer (Reif, 2007). About the environmental factors involved in the development of neoplasms, chemical contaminants present in the environment as pyrethroids have been associated with the presence of mammary gland carcinomas (Reif, 2007). Ultraviolet light rays mainly UVBs have also been studied as a cause of squamous cell carcinoma (SCC) in animals with poor skin pigmentation (Reif,

2007). However, in spite of having this information that allows us to have an overview of some risk factors and distribution of the disease, in Mexico the epidemiological information in this species is very limited restricted, being limited to conferences and databases of private veterinary hospitals and universities. A second issue is the lack of knowledge on the essential characteristics of the canine population, for instance, gender, age and breed, as well as aspects that involve pet holding (housing, feeding and health) that can guide us to understand the causes to develop cancer. In Mexico, there are few studies on the canine population characteristics; however, they are guided to the investigation of local zoonotic diseases (Ortega *et al.*, 2007; Kisiel *et al.*, 2016). In Mexico, there are few epidemiological analyses on veterinary oncology published in scientific journals (Fajardo *et al.*, 2013; Salas *et al.*, 2015). In a first article, we published the prevalence of tumors in the dogs of the municipality of Toluca. In this second work, the following eight years were collected to increase the sample size and a survey was carried out to explore some characteristics of the canine population and the possible risk factors involved with tumorigenesis in dogs, all this to be able to enlarge the perspective of oncological behavior in veterinary medicine.

MATERIAL AND METHODS

A retrospective and cross-sectional epidemiological study of tumors in dogs diagnosed by histopathology was performed in the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA-FMVZ-UAEM) through the database compiled in the period 2002-2016. Data on age, breed, sex and final diagnosis (histogenesis, biological behavior, and tumor type) were analyzed with descriptive statistics using the STATA 7.0 program. Likewise, in order to associate the characteristics of the individual (race, age, and sex) with the localization of the tumors (cutaneous and non-cutaneous), an exact Fisher test was carried out, and to determine the risk of development with these variables, an odds ratio test was used by means of the STATA 7.0 program. Data without identification were discriminated for the tests. All samples received during the period were processed by conventional histochemistry methods and for the

diagnosis of specific tumors, special stains such as Fontana, Giemsa, and Periodic Acid Stain (PAS) were made. The diagnosis was made according to the International Histological Classification of Tumors of the Domestic Animals of the World Health Organization and of the Institute of Pathology of the Armed Forces with the cooperation of the American Registry of Pathology (AFIP/WHO, 2001).

In order to know, some of the characteristics of the canine population and the possible risk factors involved with tumorigenesis in dogs, a personal interview survey was conducted to the population from Toluca city. The total number of people to be surveyed was calculated using the finite population sample size formula (Jaramillo *et al.*, 2009). The selection criterion for the people surveyed was being meant for residents of Toluca, regardless the age or gender, and the survey was applied to people without dogs in order to know the number of people who do not have dogs at home. The places where the surveys were carried out were in parks, schools and private homes. Fifty pilot surveys were applied carried out in a period of 15 days to carry out the final surveys. The survey consisted of three sections with closed questions and multiple choice or dichotomous response depending on the nature of the question (Jaramillo *et al.*, 2009). The first section of the survey collected information regarding the characteristics of the individual as race breed, age, and sex; the second section was focused on the type of the dogs feeding dogs have; the third, in the type of habitat where they live and if they attended to periodic medical consultations with the veterinary doctor.

RESULTS

Descriptive epidemiology of tumors

A total of 393 tumors diagnosed by histopathology were referred to the laboratory during the study period. Skin tumors were the most frequent (59.0%), followed by reproductive tract (16.3%), mammary gland (12.5%) digestive tract (4.6%), lymphatic (3.6%), skeletal-muscle (2.5%), respiratory (1.3%) and endocrine (0.2). Fibroma, mast cell tumor and histiocytoma where the most

frequent skin tumors followed by tumors that were associated with exposure to solar radiation: basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and malign melanoma (Fig. 1).

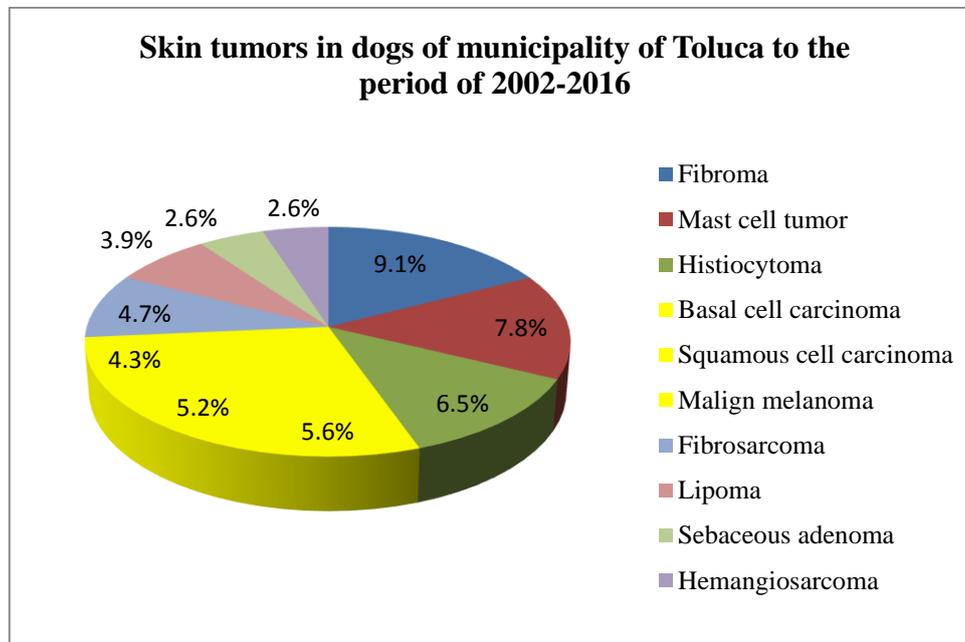


Figure 1. Frequency of the ten most frequent skin tumors of dogs from the municipality of Toluca. The tumors associated with exposure to ultraviolet radiation are shown in yellow.

The results of tumor frequencies by age considering the individual's biological characteristics and histopathological characteristics of the neoplasms are summarized in Tab 1. The group of age that had the highest frequency of tumors was: dogs older than 7 years (54.7%) followed by the group from 1 to 7 years (34.6%). In relation to sex, the frequency of tumors was higher in females (52.9%) than males (47.1%). Pure breeds 82.5% were more frequent than mixed breeds 17.5%. The most common pure breed was Labrador (11.4%) followed by Poodle (7.8%) and Schnauzer (6.1%).

The benign neoplasms were more frequent than malignant and were mostly found in females (Tab 1), the mixed breeds had the higher frequency 23% (52/224).

1 **Table 1. Frequency of tumors by age considering the biological characteristics of the individual, histopathological**
 2 **and tumor location in dogs from the municipality of Toluca.**

		AGE n (%)				TOTAL CASES n (%)
		< 1 year	1 to 7 years	> 7 years	N/D	
		24 (6,1)	136 (34,6)	215 (54,7)	18 (4,6)	393 (100)
BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE INDIVIDUAL						
SEX	Male	13 (3,3)	73 (18,6)	88 (22,4)	5 (1,3)	179 (45,5)
	Female	11 (2,8)	63 (16)	125 (31,8)	9 (2,3)	208 (52,9)
	N/D			2 (0,5)	4 (1)	6 (1,6)
MOST COMMON BREED		Schnauzer	Mixed breed	Labrador	Mixed breed	
		3 (0,7)	35 (8,9)	30 (7,6)	6 (1,5)	
ANATOMOPATHOLOGICAL TUMORAL CHARACTERISTICS						
BIOLOGICAL BEHAVIOR	Malign	4 (1)	53 (13,5)	91 (23,2)	8 (2)	156 (39,7)
	Benign	20 (5,1)	83 (21,1)	124 (31,6)	10 (2,5)	237 (60,3)
HISTOGENESIS	Epithelial	12 (3,1)	47 (12)	115 (29,3)	7 (1,8)	181 (46)
	Mesenchymal	12 (3,1)	89 (22,6)	100 (25,4)	11 (2,8)	212 (54)
COMMON LOCALIZATION BY TUMOR SITE		Skin	Skin	Skin	Skin	Skin
		22 (5,6)	80 (20,4)	115 (29,2)	15 (3,8)	232 (59)

3 **N: number of cases**

4 **N/D: no data**

Regarding to histogenesis, there were more tumors of mesenchymal than epithelial origin (Tab 1). Of the mesenchymal tumors, the majority was benign (148/212) and was more presented in females than in males (106 vs 102). The mixed breed dogs were the ones that presented the most type of tumor (24%). Of the tumors of epithelial origin, 54.1% were benign, presented more in females (102/181) (56.3%) and the most affected breed was Poodle (13.2%).

Risk of developing cutaneous tumors estimated by Exact Fisher and Odds Ratio tests

The results demonstrated that pure breeds had more risk of development cutaneous than another organ tumors (OR=3.7, 2.13 – 6.43). In contrast, the mixed breed dogs presented more risk of developing tumors in another organ mainly in the reproductive system (56.2%) and mammary gland (4.3 %) (Tab. 2).

Significant differences were found (p 0.002) among the age groups; the group less than 1-year-old vs the groups of 1 to 7 years and > 7 years, where more than 64% of the tumors were cutaneous. In puppies, histiocytomas (16.6%), pilomatricomas (16.6%), fibromas (12.5%) and squamous cell carcinomas (4.1%) were the most frequent cutaneous tumors.

As in race and age, the sex variable also revealed significant differences (p 0.003). In females, homogeneous numbers of tumors were observed. However, males showed more risk to develop cutaneous tumors compared to non-cutaneous tumors (OR=1.88, 1.24 – 2.84).

Table 2. Risk of development cutaneous tumors in relation to the breed, age and sex of dogs in the municipality of Toluca

VARIABLE	CUTANEOUS (%)	NON-CUTANEOUS (%)	OR	IC
BREED				
Pure breed	204 (64.96)	110 (35.04)	3.7*	(2.13 – 6.43)
Mixed breed	23 (33.3)	46 (66.7)	1.0	
AGE				
< 1 year	22 (91.67)	2 (8.33)	7.7*	(1.71 – 34.07)
1 – 7 years	80 (58.82)	56 (41.18)	1.0	
> 7 years	115 (53.49)	100 (46.51)	0.80	(0.80 - 1.91)
SEX				
Females	108 (51.92)	100 (48.08)	1.88*	(1.24 – 2.84)
Males	120 (67.04)	59 (32.96)	1.0	

OD: odds ratio

CI: confidence interval

*Asociation risk

Canine population survey from the municipality of Toluca

The 1500 surveys applied to inhabitants from the municipality of Toluca revealed that: 1,012 (67.5%) people responded positively to having one or more dogs at home, while 488 (32.5%) reported having no dog at home. The male dogs were more numerous than females (Tab 3). Most people had adult dogs of 1 to 7 years (62.1%). The majority of dogs were pure breed (62.7%), but a large percentage was mixed breed (37.3%). Chihuahua was the most frequent pure breed (6.7%) followed by Schnauzer (6.6%), Poodle (4.8%) and German shepherd (4.3%). More than 50% of dogs were fed with commercial diets (Tab 3) and lived outside the home, exposing them to certain solar radiation a day, despite having some type of roof provided by the owners (Tab 3). Only 47.4% of people took their dogs to veterinary medical visits twice a year and 32.3% to surgical neutering.

Table 3. Percentage of characteristics of the canine population according to the sex of the municipality of Toluca obtained through the survey.

	SEX (%)		TOTAL OF SURVEY
	MALE	FEMALE	(%)
	53,4	46,6	100,0
AGE			
< 1 year	11,4	7,7	19,1
1 to 7 years	32,7	29,4	62,1
> 7 years	9,3	9,4	18,7
N/D	0	0,1	0,1
Breed	Mixed Breed	Mixed Breed	
	18,2	19,1	
FEEDING			
Commercial dog food	25,6	25,0	50,6
Homemade food	7,1	4,6	11,7
Combination feeding	20,7	17,0	37,7
N/D	0	0,1	0,1
HABITAT			
Inside home	19,7	18,4	38,1
Outside home with shade	30,1	24,1	54,2
Outside home without shade	2,6	3,0	5,6
Inside and outside	0,9	1,1	2,0
N/D	0,1	0,0	0,1
MEDICAL VISITS			
Two per year	24,4	23,0	47,4
Once per year	24,8	19,8	44,6
Per disease	4,2	3,8	8,0
NEUTERING			
Yes	15,4	16,9	32,3
No	37,9	29,7	67,6
N/D	0	0,1	0,1

N/D: no data

DISCUSION

The cutaneous tumors were the most frequent in this article. The high frequency could be explained because cutaneous tumors are more visible and clinically explorable, this agrees with other reports (Santos *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2016; Grüntzig *et al.*, 2016). Into the group of the cutaneous tumor; the tumors associated with exposure to solar radiation were the most frequent. This may be due to the housing conditions of the dogs from this locality since more than 50% of the dogs live outside the home, exposing them to certain solar radiation a day despite having some type of roof provided by the owners. In human medicine, the main risk factor for these tumors is the exposure to B ultraviolet rays. Some studies in dogs support a possible association between these risk factors and these tumors (Reif, 2007; Dos Santos *et al.*, 2012; Tomoko *et al.*, 2016).

According to the Atmospheric Monitoring System in Toluca, at certain hours of the day, it can reach 11 points of UV index, this is largely associated with being the highest capital of Mexico and North America with an altitude of 2667 meters above sea level (mamsl). A long exposure (10-25 minutes) could trigger skin cancer associated with the altitude which put these animals to a higher risk to develop cutaneous tumors associated to the direct and high exposure of UV-ray.

The highest frequencies of tumors observed in dogs older than 7 years are comparable to those published in Mexico and other countries (Fajardo *et al.*, 2013; Brønden *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013), which have been associated with more prolonged exposure to risk factors and thus to mutations accumulated in cell cycle regulatory genes and other cell genes (Reif, 2007). Further, the survey showed most people had adult dogs. This reflects the exponential increase of tumors in adult dogs from this municipality.

By the other hand, puppies were more at risk to developing benign cutaneous tumors of young dogs as histiocytomas (16.6%) and pilomatricomas (16.6%) (AFIP/OMS, 2001). Other tumors observed in puppies were fibromas (12.5%) and squamous cell carcinomas (4.1%) that increase with age (Grüntzig *et al.*, 2016).

However, in this study, the SCC could be associated with the sun exposure that the dogs from this municipality have and by chronic inflammations in the case of fibroma.

The frequency of tumors was higher in females (52.9%), these results were influenced by the presence of mammary gland tumors, which were third most frequent tumors and were not occur in males. It is worth noting that mammary gland tumors were more frequent in Poodle (24.4%), followed by Cocker (12.2%). Similar results had shown an association between Poodles and breast tumors (Salas *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016).

Males had more risk to develop cutaneous compared to non-cutaneous tumors (OR=1.88, 1.24 – 2.84) contrary to that found by Grüntzig *et al.* (2016) and Brønden *et al.* (2010). Our data may be influenced by the higher frequency of males in Toluca in agreement with another study conducted in another locality of the country (Kisiel *et al.*, 2016). In general, there was not a real sex predisposition for cutaneous tumors. However, Mohamed (2006) reported a greater frequency of histiocytomas and melanomas in males, equivalent to our results (8/15 histiocytomas, 6/11 melanomas).

The most popular dogs in the retrospective study were pure breeds (82.5%) analogous to reported in other articles (Fajardo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Nevertheless, in the survey mixed breeds were the most popular breeds, however, there is no information about predisposition of dogs with a lot of genetic variability to a specific tumor; therefore, further research should be done. In the same way, the pure breeds had more risk of development cutaneous tumors than in other organs (OR=3.7, 2.13 – 6.43). These results agree with studies reporting a higher predisposition of pure breeds, such as Labrador, being the most affected in this study (8.7%). This race has a predisposition for fibrosarcomas and mastocytomas (Dobson, 2013). In contrast, the mixed breed dogs presented more risk of development tumors of another organ mainly in the reproductive system (56.2%) and mammary gland (4.3 %) (0.000). In relation to non-cutaneous tumors, TVT

was the most frequent tumor (13.74%), and similarly, the most frequent mesenchymal tumor (26%) occurring in the majority of cases in the reproductive system (85.1%). Due to the transmissible characteristics of TVT, this tumor occurs mainly in dogs without reproductive control such as mixed breed dogs that generally have a wandering behavior that causes its spread (Ganguly *et al.*, 2013). In this municipality, the majority of owner commented had non-neutering dogs (67.6%) that reflect the lack of information and responsibility of owners to have a pet. Therefore, the high prevalence of non-neutering dogs in this municipality can be reflected in the high presence of TVT in both street dogs and owned dogs, in addition to the high frequency the mammary gland tumors favored by the presence of hormones (estrogens) (Reif, 2007; Rivera *et al.*, 2009).

As reported in the same locality, benign neoplasms were more frequent than malignant and may be associated with the age population of dogs (Fajardo *et al.*, 2013). Regarding histogenesis, mesenchymal tumors were more numerous than epithelial tumors; these results differ from others countries (Grüntzig *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2016), who described a greater number of epithelial tumors. In our case, the increase of mesenchymal origin tumors was due to the high frequency of CTVT.

Finally, about to eating habits, here most people responded to feed their dogs with commercial croquettes diets. In another Mexican city, they (77%) also reported a high frequency of diets based on dry food (Ortega *et al.*, 2007). This could be one of the risk or trigger factor associated with increased cancer in pets, due to the growing use of commercial foods as the single base of their nutrition. Commercial dog food contains several carcinogens, mainly free radicals, heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) formed during any stage of the food manufacturing and have been related to the development of colon-rectal cancer, lymphoma and mammary gland in rodents (Dan *et al.*, 2012).

CONCLUSIONS

The most of our results on the frequencies of tumors are comparable to those reported in other countries; however, the population characteristics vary from place to place. Therefore, performing endemic studies allows a deeper understanding of the factors involved in tumorigenesis. Proof of this was the close association found in the breed, age and sex of the canine population and the diagnosed tumor variants in dogs.

The close association of these studied variables in the presentation of skin tumors was confirmed by the found high incidence of tumors associated with this risk factor, and the housing conditions that dogs in this zone suffer. Our results provide an overview of the possible risk factors for tumorigenesis in this city and the effect they are causing in companion animals. This work generated invaluable data that opens a gap for future research; in particular, on the effects of ultraviolet rays emitted in this municipality.

Acknowledgements

The authors of this work acknowledge funding of SIEA project 3705/2014/CID: “Establecimiento del registro oncológico en perros con dueño como modelo de cáncer en humanos en el municipio de Toluca, Estado de México”, else to CONACyT for partial funding.

REFERENCES

ARMED FORCES INSTITUTE OF PATHOLOGY IN COOPERATION WITH THE AMERICAN REGISTRY OF PATHOLOGY AND THE WORLD HEALTH ORGANIZATION COLLABORATING CENTER FOR COMPARATIVE ONCOLOGY. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second edition. Washington DC. 2001. Series.

BRØNDEN, L.B.; NIELSEN, S.S.; TOFT, N., *et al.* Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet. Rec.*, v. 166, p. 586-590, 2010.

CHOI, J.W.; YOON, H.Y.; JEONG, S.W. Clinical Outcomes of Surgically Managed Spontaneous Tumors in 114 Client-owned Dogs. *Immune Netw.*, v. 16, p. 116-125, 2016.

DAN, G.; ZACHARY, L.N.; JAIME, F.M., *et al.* Biomonitoring the Cooked Meat Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6- phenylimidazol [4, 5-b] pyridine in Canine Fur. *Agric. Food. Chem.*, v. 76, p. 211-220, 2012.

DOBSON, J.M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet. Sci.* p. 23, 2013.

DOS SANTOS, C.P.S; HATAYDE, M.R; LAUFER-AMORIM, R. Expression of Cyclooxygenase-2 and Ki-67 in Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Dogs. *Open J Vet Med.*, v. 2, p. 41-47, 2012.

FAJARDO, R.; ALPÍZAR, A.; PÉREZ, L., *et al.* Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, México, from 2002 to 2008. *Arch. Med. Vet.*, v. 45, p. 305-309, 2013.

FLEMING, J.M.; CREEVY, K.E.; PROMISLOW, D.L.E. Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age, Size, and Breed-Related Causes of Death. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 25, p.187–198, 2011.

GANGULY, B.; DAS, U.; DAS, A.K. Canine transmissible venereal tumour: A review. *Vet. Comp. Oncol.*, v.14, p. 1-12, 2013.

GRÜNTZIG, K.; GRAF, R.; BOO, G., *et al.* Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J. Comp. Pathol.*, p. 1-15, 2016.

JARAMILLO, A.J.; MARTÍNEZ, M.J. Epidemiología veterinaria. Búsqueda de información en la investigación epidemiológica. Primera edición. Distrito Federal, México. El manual moderno S.A. de C.V. 2009. p. 198.

KISIEL, L.M.; JONES, A.; SARGEANT, J.M., *et al.* Owned Dog Ecology and Demography in Villa de Tezontepec, Hidalgo, Mexico. *Prev. Vet. Med.*, v. 135, p. 37-46, 2016.

MOHAMED, S. M. A. Epidemiology of skin tumor entities according to the new who classification in dogs and cats. First edition. Germany. VVB laufersweiler verlag. 2006. p. 6.

ORTEGA, A.; RODRIGUEZ, J.C.; BOLIO, M.E., *et al.* A survey of dog populations in urban and rural areas of Yucatan, Mexico. *Anthrozoos.*, v. 20, p. 261-274, 2007.

REIF J. S (2007). The epidemiology and incidence of cancer in Small animal clinical oncology. In: Withrow, SJ and MacEwen, EG. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Fourth edition. Philadelphia, USA. Saunders Company, pp. 68-76.

RIVERA P.J., MELIN M., BIAGI T (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.* V 69, pp. 8770-8774.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D., *et al.* Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One.*, v. 10, p. 1-15, 2015.

SANTOS, I.F.; CARDOSO, J.M.; OLIVEIRA, K.C., *et al.* Prevalência de neoplasias diagnosticadas em cães no Hospital Veterinário da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zotec.*, v. 65, p.773-782, 2013.

TOMOKO N.A; OLIVEIRA M.C; RONCA F. C., *et al.* Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.*, v. 3, p. 1-22, 2016.

7.6 Carta de aceptación artículo

Decision Letter (ABMVZ-2018-10534.R1)

From: ampinho.editor@gmail.com

To: raul_fajard@hotmail.com

CC:

Subject: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia - Decision on Manuscript ID ABMVZ-2018-10534.R1

Body: 12-Jun-2018

Dear Dr. Fajardo:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EPIDEMIOLOGY OF TUMORS IN DOGS IN THE CAPITAL OF THE STATE OF MEXICO DURING THE PERIOD 2002-2016" in its current form for publication in the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Antonio de Pinho Marques Jr
Editor-in-Chief, Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
ampinho.editor@gmail.com

Associate Editor
Comments to the Author:
(There are no comments.)

8. DISCUSIÓN

Los tumores cutáneos fueron los más frecuentes en este estudio, esta alta frecuencia podría explicarse porque los tumores cutáneos son más visibles y clínicamente explorables, lo que concuerda con otros trabajos de diferentes países (Santos *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2016; Grüntzig *et al.*, 2016). Dentro del grupo de tumores cutáneos, los tumores asociados con la exposición a la radiación solar fueron los más frecuentes. Esto puede deberse a las condiciones de alojamiento de los perros de esta localidad, ya que más del 50% de los perros viven fuera del hogar, lo que los expone a cierta radiación solar al día a pesar de tener algún tipo de techo provisto por los propietarios.

En medicina humana, el principal factor de riesgo para estos tumores es la exposición a los rayos ultravioleta B. Algunos estudios en perros respaldan una posible asociación entre estos factores de riesgo y estos tumores (Reif, 2007; Dos Santos *et al.*, 2012; Tomoko *et al.*, 2016).

Según el Sistema de Monitoreo Atmosférico de Toluca, en ciertas horas del día, puede alcanzar los 11 puntos del índice UV, esto está asociado en gran medida con ser la capital más alta de México y América del Norte con una altitud de 2667 metros sobre el nivel del mar (msnm) Una exposición prolongada (10-25 minutos) podría desencadenar cáncer de piel asociado con la altitud que pone a estos animales en mayor riesgo de desarrollar tumores cutáneos asociados a la exposición directa y alta de rayos UV.

Las frecuencias más altas de tumores observadas en perros mayores de 7 años son comparables a las publicadas en México y otros países (Fajardo *et al.*, 2013; Brønden *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013), que se han asociado con una exposición más prolongada a los factores de riesgo y, por lo tanto, a las mutaciones acumuladas en los genes reguladores del ciclo celular y otros genes celulares (Reif, 2007). Además, la encuesta mostró que la mayoría de las

personas tenían perros adultos. Esto refleja el aumento exponencial de tumores en perros adultos de este municipio.

Por otro lado, los cachorros estaban en mayor riesgo de desarrollar tumores cutáneos benignos de perros jóvenes como histiocitomas (16,6%) y pilomatricomas (16,6%) (AFIP / OMS, 2001). Otros tumores observados en cachorros fueron los fibromas (12.5%) y los carcinomas de células escamosas (4.1%) que aumentan con la edad (Grüntzig *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio, el SCC podría estar asociado con la exposición al sol que tienen los perros de este municipio y con inflamaciones crónicas en el caso del fibroma.

La frecuencia de tumores fue mayor en hembras (52.9%); estos resultados fueron influenciados por la presencia de tumores de glándula mamaria, que fue el tercer tumor más frecuente sin presentarse en machos. Vale la pena señalar que los tumores de la glándula mamaria fueron más frecuentes en los Poodle (24,4%), seguido de Cocker (12,2%). Resultados similares en otra entidad del país (Salas *et al.*, 2015) y en Korea (Choi *et al.*, 2016) mostraron una asociación entre los caniches y los tumores de mama.

A pesar de que las hembras presentaron más tumores, un número importante de machos (45.5%) presentó toda clase de tumores. Estos datos pueden verse influenciados por la mayor frecuencia de machos en Toluca, así como en otro estudio realizado en otra localidad del país (Kisiel *et al.*, 2016). En general, no hubo una predisposición sexual real para los tumores cutáneos. Sin embargo, Mohamed (2006) informó una mayor frecuencia de histiocitomas y melanomas en los machos, equivalente a nuestros resultados (8/15 histiocitomas, 6/11 melanomas).

Los perros más populares en el estudio retrospectivo fueron razas puras (82.5%) análogas a las reportadas en otros artículos (Fajardo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013). Sin embargo, en la encuesta, las razas mestizas fueron las razas más

populares, sin embargo, no hay información sobre la predisposición de los perros con mucha variabilidad genética a un tumor específico; por lo tanto, se debe realizar más investigación.

En cuanto a las razas puras, los resultados aquí obtenidos concuerdan con estudios que informaron una mayor predisposición de razas puras, como Labrador, siendo los más afectados en este estudio (8,7%). Esta raza tiene una predisposición para fibrosarcomas y mastocitomas (Dobson, 2013).

En relación con los tumores no cutáneos, TVT fue el tumor más frecuente (13,74%) y, de manera similar, el tumor mesenquimatoso más frecuente (26%) en la mayoría de los casos en el sistema reproductivo (85,1%). Debido a las características transmisibles de TVT, este tumor se produce principalmente en perros sin control reproductivo, como los perros de raza mixta que generalmente tienen un comportamiento errante que causa su propagación (Ganguly *et al.*, 2013). En este municipio, la mayoría de los propietarios comentaron que tenían perros no esterilizados (67.6%) reflejando la falta de información y la responsabilidad de los dueños de tener una mascota. Por lo tanto, la alta prevalencia de perros no esterilizados en este municipio se puede reflejar en la alta presencia de TVT en perros callejeros y perros con propietario, además de la alta frecuencia de los tumores de glándula mamaria favorecidos por la presencia de hormonas (estrógenos) que siguen produciendo los perros no esterilizados (Reif, 2007; Rivera *et al.*, 2009).

En relación al análisis histopatológico de TVTC; la histología es una herramienta fundamental para conocer el comportamiento biológico de las neoplasias, no obstante, existe algunos tumores como el TVTC que suele causar controversia en su comportamiento por el ciclo de evolución que presenta. En este trabajo se evaluaron parámetros histológicos de malignidad que nos sugiere un comportamiento agresivo del tumor y así mismo se sugirió una nueva clasificación con el fin de hacer más práctica la evaluación histológica, así como obtener un

pronóstico más preciso. Dentro de los parámetros evaluados el índice mitótico tuvo una media de 4 similar a lo encontrado en otros tumores malignos en otros estudios (Spangler y Kass, 2006; Sarli *et al.*, 2002). Ligado a esto, el 91.3% de las muestras mostraron mitosis aberrantes o atípicas que eran de tipo tetrapolar o tripolar que se considera una de las características más importantes para caracterizar morfológicamente a un tumor maligno tal como lo describen en tumores de tipo histiocitario (Moore, 2014) y melanocítico (Spangler y Kass, 2006) que tienden a ser tumores agresivos en esta especie.

En cuanto al grado de diferenciación un número crítico de tumores presentó anaplasia (34.8%), que se asocia a alta malignidad, bajo índice de supervivencia y metástasis (Patnaik *et al.*, 1986; Zachary 2017; Spangler *et al.*, 2006). De estos tumores, el 83.3% (5/6) presentó compresión vascular y el 33.3% (2/6) invasión vascular, no obstante, el porcentaje tanto de compresión como de invasión pudo ser mayor, debido a que en las evaluaciones histológicas solo se observa una mínima parte del tejido tumoral (Sarli *et al.*, 2002) lo que no descarta que hubiese más casos positivos y la posibilidad de migración de células tumorales a otros órganos, ya que estas células pobremente diferenciadas tienen pérdidas de proteínas de unión (E-cadherinas) lo que las hace más competentes a migrar (Markert, 1968; Jubbs, 2007).

Aunado a estos parámetros de malignidad, el marcador tumoral HIF-1 α fue positivo (82.6%) a casi todas las muestras analizadas en este estudio similar a lo encontrado en tumores de glándula mamaria (Madej *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2015) linfoma (Kambayashi *et al.*, 2015) y carcinoma renal (Yhee *et al.*, 2012). Discordante con la expresión nuclear que casi siempre presenta, en este estudio, HIF-1 α sólo se expresó en citoplasma en todos los grupos. En tumores de colon y ovario también se ha encontrado expresión nuclear que se relacionó con mal pronóstico y poco tiempo de sobrevivida (Yoshifumi *et al.*, 2010; Daponte *et al.*, 2008).

Normalmente, la expresión de HIF-1 α es nuclear debido a la translocación que realiza para unirse a su heterodímero HIF-1 β . En condiciones de normoxia la subunidad 1 α del complejo es constitutivamente hidroxilada por dos residuos conservados de prolina (Pro-402 y Pro-564) (Semenza, 2007). Esta hidroxilación, es catalizada por prolil hidroxilasas PHD-HPH, que permiten el reconocimiento de las subunidades α por la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL), un componente de un complejo de ubiquitina ligasa E3 que se dirige a estas subunidades para la degradación de HIF-1 α por la vía de la ubiquitina proteasoma (Chun *et al.*, 2002). Por tal razón, en condiciones de normoxia HIF-1 α no es detectable ni en núcleo ni en citoplasma. No obstante, en TVTC en los tres grupos se detectó la presencia de HIF-1 α en citoplasma lo que indica una estabilización de la proteína aun en condiciones de normoxia.

Bhatia y col. (2013) indican que esta estabilización puede estar dada por la presencia reactivas de oxígeno (EROS) en el ambiente ya que causan nitrosilación de un residuo de cisteína específico en subdominio (380 \pm 417) y C-terminal (556 \pm 572) del dominio dependiente de oxígeno (ODD) de HIF-1 α que se localiza en los residuos de aminoácidos 401 \pm 603. Estos dominios interactúan directamente con el VHL que ubiquitinizan la proteína dejando de este modo estable a HIF-1 en citoplasma. Paralelo a esto, esta estabilización hace que esta isoforma de HIF compita con el HIF-1 α endógeno suprimiendo su actividad y por lo tanto evadiendo la transcripción de genes codificados por este gen. Este fue el caso GLUT-1 que fue negativo en todas las muestras.

No obstante, el hecho de que esta estabilización de HIF-1 en todos los grupos de tumores de este estudio eliminara la posibilidad de la activación de genes relacionados con parámetros de malignidad en este tumor no se descarta el comportamiento maligno observado tanto histológicamente como clínicamente ya que en los últimos años se ha observado resistencia a la quimioterapia resultando en la mayoría de los casos en diseminación del tumor y metástasis. Tal es el caso de la glicoproteína P que funciona como una bomba de flujo de ATP que trasloca

drogas al exterior de las células explicando la resistencia extrínseca a quimioterapéuticos, siendo trabajos en Brasil como el de Jantzen y col. (2009) en donde demuestran la expresión de la proteína en células de tipo plasmocítico.

De igual forma (Flórez *et al.*, 2017) demuestran la expresión del gen MDR-1 que transcribe la glicoproteína G como positiva a varios tumores tratados con vincristina, y a la par buscando otros marcadores como BAX y BCL-2 que son genes implicados en señalizaciones antiapoptóticas. Así mismo, (Moro *et al.*, 2010) y (Vázquez *et al.*, 2008) encontraron mutaciones en el gen supresor de tumores TP53 implicado en la reparación del ADN y arresto del ciclo celular.

Por lo tanto, los hallazgos histopatológicos mas la evidencia de marcadores moleculares nos sugieren un alto grado de malignidad en el TVTC aunado a la resistencia clínica que ha tenido en los últimos años.

9. CONCLUSIONES

La mayoría de nuestros resultados sobre las frecuencias de los tumores son comparables a los informados en otros países; sin embargo, las características de la población varían de un lugar a otro. Por lo tanto, la realización de estudios endémicos permite una comprensión más profunda de los factores implicados en la tumorigénesis. Prueba de esto, fue la estrecha asociación encontrada en la raza, edad y sexo de la población canina de Toluca y las variantes tumorales diagnosticadas en perros. La estrecha asociación de estas variables estudiadas en la presentación de tumores se confirmó en el diagnóstico de los mismos, tal fue el caso de los tumores cutáneos y su posible asociación con el tipo de alojamiento que tienen y la alta incidencia de tumor venéreo transmisible canino y la baja respuesta a la esterilización en la población de Toluca. Así mismo, el estudio de comportamiento del TVTC, sugirió un comportamiento agresivo del tumor, tanto histológica como molecularmente que tendrá que estudiarse más a fondo principalmente por los casos de resistencia que se tienen en los tratamientos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Anisimov, V.N. (2003). The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Critical reviews in oncology hematology*, 45(3), pp 277-304

Armed forces institute of pathology (AFIP) in cooperation with the American registry of pathology and the World Health Organization (WHO) collaborating center for comparative oncology (2001). International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second edition. Washington DC.

Batamuzi, E. K. Bittegeko, S. B. (1990). Canine transmissible tumor in Morongo, Tanzania. *Prev. Vet. J.* 21, pp. 152- 154.

Bertagnolli C. G. *et al.* (2009). "Immunohistochemical expression of p63 and δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression," *Veterinary Pathology*, 46 (3), pp. 407–415.

Bhatia M, Karlenius T C, Di Trapani D. (2013). The Interaction Between Redox and Hypoxic Signalling Pathways in the Dynamic Oxygen Environment of Cancer Cells.

Blackwood L. Dobson J. M., Duncan B. (2014). Manual de oncología en pequeños animales. Tumores de piel y de los tejidos subcutáneos. Tercera edición. Ediciones Lexus. España.

Boscós C. M., Ververidis H. N. (2004). Canine TVT Clinical Findings, Diagnosis and Treatment. Proceedings of the 9th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association. <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2004> [accessed 12 April 2012].

Brønden, L.B., *et al* (2010). Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet. Rec.*, v. 166, p. 586-590, 2010.

Bronson R. T. (1982). Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res.* 43 (11), pp. 2057-9.

Cabrera M. C., López N. M. (2006): Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología.* 29 (7), pp. 291-298.

Cassali G. D., *et al.* (2009). "Mammary gland diagnosis of the laboratory of comparative pathology—UFMG, from 2000 to 2008," in Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association, *Clinica Veterinaria-supplement.* Vol. 14, pp. 173.

Cavalcanti M. F. (2006). Fatores prognosticos na abordagem clinica e histopatologica dos carcinomas mamarios de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Nottingham. Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Choi, J. W., Yoon, H. Y., Jeong, S. W. (2016). Clinical Outcomes of Surgically Managed Spontaneous Tumors in 114 Client-owned Dogs. *Immune Netw.*, v. 16, pp. 116-125.

Chun Y S, CHOI E, KIM T Y., KIM M S, PARK J W. (2002) A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1a gene. *Biochem. J.* 362, pp. 71±79.

Dantas G, *et al.* (2012). Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. Hindawi Publishing Corporation. *Veterinary Medicine International.* ID 274608, 7 pages.

Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, Simos G, Minas M, *et al* (2008). Significance of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha(HIF-1alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *BMC Cancer.* 8:335

Das, U. and Das, A. K. (2000). Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Veterinary Research Communications*. 24 (8), pp. 545-556.

De la Cruz H. N. I. *et al.* (2017). Frecuencia y caracterización de las principales neoplasias presentes en el perro doméstico en Tamaulipas (México). *Rev. Med. Vet.* 35. pp. 53-71.

Dorn C. Richard, D. V. M., Berkeley M.P. H. (1967). The Epidemiology of Cancer in Animals. *California medicine*. 107(6), pp 481–489.

Dos Santos, C. P. S. *et al.* (2012). Expression of Cyclooxygenase-2 and Ki-67 in Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Dogs. *Open J Vet Med.*, 2, pp. 41-47.

Fajardo, R. *et al.* (2013). Prevalence of tumors in dogs from the municipality of Toluca, México, from 2002 to 2008. *Arch. Med. Vet.*, 45, pp. 305-309.

Flores PE (1986). Epidemiología del cáncer en perro y gato. *Monografías de medicina veterinária*, 8 (2).

Flórez M. M, Fêo H, Da Silva B, G. N, Yamatogi R. S., Aguiar, A. J. *et al.* (2016). Cell cycle kinetics, apoptosis rates and gene expressions of *MDR-1*, *TP53*, *BCL-2* and *BAX* in transmissible venereal tumour cells and their association with therapy response. *Veterinary and Comparative Oncology*.

Fonseca A. C. E. (2015). Ki67/KIT double immunohistochemical staining in cutaneous mast cell tumors from Boxer dogs. *Research in Veterinary Science*, 102, pp. 122–126.

Fraile O. C (2001). Neoplasias cutáneas en el perro y gato. Departamento de sanidad Animal HCV. C.V.

Ganguly B., Das U. and Das K. (2013). Canine transmissible venereal tumour: a review. *Veterinary and Comparative Oncology*, 14 (1), pp. 1–12.

Genelhu M. C., *et al.* (2007). “A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands,” *BMC Cancer*, 7 (218).

Goldschmidt M. L. *et al.* (2011). Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*. 48(1), pp. 117-131.

Gregg L. Semenza (2007). HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr.* 39, pp. 231–234.

Grüntzig, K. *et al* (2016). Swiss Canine Cancer Registry 1955-2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. *J. Comp. Pathol.*, pp. 1-15.

Hayes H. M. *et al.* (1991). Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *J Natl Cancer Inst.* 83 (17), pp.1226-31.

Jantzen G L, Santos do Amaral A, Bassani-Silva S, Sousa R N. (2009). Imunorreatividade à glicoproteína-p nos diferentes tipos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível canino. *Veterinaria en Foco.* 6(2), pp. 140-146.

Jubb, Kenedy and Palmer (2007). *Pathology of Domestic animals*. Edited by M. Grant Maxie. Ed. Saunders Elsevier. Fifth Edition. 3 Vol. Sel. ISBN 13.978-07020-28236.

Kambayashi S., *et al* (1998). Hypoxia inducible factor 1 α expression and effects of its inhibitors in canine lymphoma. *J Vet Med Sci.* 77(11), pp.1405-12.

Kelsey J. L., Moore A. S., Glickman L. T. (1998). Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol Rev.* 20 (2), pp. 204-17.

Kisiel, L. M. *et al* (2016). Owned Dog Ecology and Demography in Villa de Tezontepec, Hidalgo, Mexico. *Prev. Vet. Med.*, 135, pp. 37-46.

Liao K., *et al.* (2003). Canine transmissible venereal tumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92 (3–4), pp. 149–162.

London C. A., *et al.* (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp Hematol.* 27(4), pp. 689-97.

López V., Jordáa E., Monteagudo C. (2012). Actualización en el síndrome Birt-Hogg-Dubé. *Actas Dermosifiliogr.* 103(3), pp. 198-206.

Madej J. A., *et al.* (2013). Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular density in mammary adenomas and adenocarcinomas in bitches. *Acta Vet Scand.* 55(1), pp. 73.

Markert CL. (1968). Neoplasia: A Disease of Cell Differentiation. *Cancer Res.* 28 (9), pp. 1908-14.

Martínez de Merlo E., Pérez D. C. (2007). Influencia de la edad en el desarrollo del cáncer. How age can influence on cancer development. *Retvet.* 2, pp. 01-04.

Moore, P. F. (2014). A Review of Histiocytic Diseases of Dogs and Cats. *Veterinary Pathology*, 51 (1), pp. 167-184.

Moro J.V., Tinucci-Costa M, Silveira A.C.T., Gerardi D.G., Alessi A.C (2010). Reactivity of p53 protein in canine transmissible venereal tumor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 (2), pp.318-323,

Morris J. and Dobson J. (2001). Small animal oncology. Blackwell Science Ltd. London.

Moulton J. E. (1978). Tumors in domestic animals. Second edition. University of California Press.

Oliveira P. A., et al. (2007). Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 79 (4), pp. 593-616.

Olsen RG., Mathes LE, Melinda T, Blakeslee JR. Oncogenic Viruses of Domestic Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 16, No. 6, November 1986.

Ortega-Pacheco A, Acevedo-Arcique M, Sauri-Arceo C, Bolio-González M, Gutiérrez-Blanco E (2003). Prevalencia de tumor venéreo transmisible en perros callejeros de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. *Rev Biomed;* 14, pp 83-87.

Papazoglou L. G., Koutinas A. F., Plevraki A. G., Tontis D (2001), Primary Intranasal Transmissible Venereal Tumour in the Dog: A Retrospective Study of Six Spontaneous Cases. *J. Vet. Med. A* 48, pp. 391-400.

Patnaik K, W. J. Ehler and E. G. MacEwen (1984). Canine Cutaneous Mast Cell Tumor: Morphologic Grading and Survival Time in 83 Dogs. *Vet Pathol,* pp 21: 469.

Pineda CJ, Romero NC, Mendoza MGD, García CCA (2010). Tumor venéreo transmisible en caninos del área metropolitana de la ciudad de México. *Revista Científica,* 20 (4), pp 362 – 366.

Reif J. S (2007) The epidemiology and incidence of cancer in Small animal clinical oncology. In: Withrow, SJ and MacEwen, EG. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. Fourth edition. Philadelphia, USA. Saunders Company; 2007. p. 68-76.

Rezaei M, Azizi S, Shahheidaripour S, Rostami S (2016). Primary oral and nasal transmissible venereal tumor in a mix-breed dog. *Asian Pac J Trop Biomed*; 6(5), pp 443–445.

Ruple and Morley PS (2016). Risk Factors Associated with Development of Histiocytic Sarcoma in Bernese Mountain Dogs A. *J Vet Intern Med*; 30, pp. 1197–1203.

Sabattini S., Scarpa, F. Berlato D, Bettini G (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3?. *Veterinary Pathology*. V 52(1), pp 70-73.

Salas, Y., Márquez, A, Diaz, D., *et al* (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One.*, v. 10, pp. 1-15.

Santos, I.F.; Cardoso, J.M.; Oliveira, K.C., *et al* (2013). Prevalência de neoplasias diagnosticadas em cães no Hospital Veterinário da Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.*, v. 65, pp.773-782.

Sapierzyński R., Malicka E., Bielecki W, Krawiec M, Osińska B, Sendecka H., Sobczak-Filipiak M (2007). Tumors of the urogenital system in dogs and cats. Retrospective review of 138 cases. *Pol J Vet Sci.* v10(2), pp 97-103.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS (2002). Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest.* 14, pp. 25–34.

Scott WD, Miller HW, Griffin EC. (2002). Muller & Kirk. Dermatología en pequeños animales. 6ta ed. Buenos Aires: Ed. Inter-Médica. 1572 p.

Shin J.I, Lim HY, Kim HW, Seung BJ, Sur JH (2015). Analysis of Hypoxia-Inducible Factor-1a Expression Relative to Other Key Factors in Malignant Canine Mammary Tumours. *J. Comp. Path.* V 1 (10).

Silva-Hidalgo G; Juárez B F; López V M, Dávila P M (2015). Carcinoma de células escamosas en caninos de Culiacán, Sinaloa, México: estudio retrospectivo (2006-2014). *Revista Científica.* V 25 (4), pp. 304-310.

Simoes J P, Schoning P, Butine M (1994). Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol.* V 31(6), pp. 637-47.

Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ (1991). Body Conformation, Diet, and Risk of Breast Cancer in Pet Dogs: A Case-Control Study. *Am J Epidemiol.* V 133(7), pp.694-703.

Spangler WL., Kass PH (2006). The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. *Vet Pathol.* V 43, pp.136–149.

Todorova I (2006). Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 9 (2), pp. 85–98.

Tomoko N.A; Oliveira M.C; Ronca F. C., *et al.* (2016). Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet. Sci.*, 3, pp. 1-22.

Trosko JE. (2001). Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? *Mol Carcinog.* 30(3), pp.131-7.

Vail D. M. & Withrow, S. J. (2007). In Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology. Eds D. M. Vail, S. J. Withrow. Elsevier.

Vázquez M N, Martínez S J, Cordova A E, Lagunas L, Fajardo L (2008). The T963C mutation of TP53 gene does not participate in the clonal origin of canine TVT. *Veterinary Research Communications.* 32(2), pp.187-91.

Williams GM. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology.* 166(1-2), pp.3-10.

Yhee JY, Yu CH, Kim JH, Im KS, Kim NH, Brodersen BW *et al.* (2012). Angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor, tumour necrosis factor- α and hypoxia inducible factor-1 α in canine renal cell carcinoma. *J Comp Pathol.*;147(2-3), pp. 129-38.

Yoshifumi B, Katsuhiko N, Kaori S, Natsumi I, Andrew T, Jeffrey A. (2010). HIF1A Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in a Cohort of 731 Colorectal Cancers. *The American Journal of Pathology.* 176 (5).

Zachary (2017). Pathology basis of veterinary diseases. 6 edition. Elsevier 2017. Misuri, USA.

Ziller ortiz VH (2004). “Clasificación histopatológica de tumores mamarios caninos extraídos en clínicas veterinarias de la ciudad de Santiago, Chile”. memoria de título presentada como parte de los requisitos para optar al título de médico veterinario Chile 2004.

11. ANEXOS

ENCUESTA PARA DETERMINACIÓN DE POBLACIÓN CANINA Y FACTORES DE RIESGO DE CANCER

Esta encuesta es parte de un proyecto de investigación el cual se realiza con el objetivo de Identificar la población canina con tumores y los factores de riesgo que lo pueden causar dentro del municipio de Toluca, Estado de México.

Las preguntas marcadas con un asterisco (), son importantes para la encuesta, favor de contestar, muchas gracias por su participación.*

1. ¿Tiene usted perros como animales de compañía o guardianes?

a) Sí () ¿Cuantos? _____ b) No ()

2. ¿El perro vive en la ciudad o dentro del municipio de Toluca desde hace más de 5 años?

a) Sí () *Colonia o localidad _____ b) No ()

3. ¿Cuál es su Sexo?

a) Macho () b) Hembra ()

4. ¿Qué edad tiene su perro en años?

a) < 1 ()

b) 1-7 ()

c) >7-15 ()

5. ¿Qué raza es su perro? (*Al seleccionar la opción A, señalar el tipo de raza del perro*)

a) Raza pura () ¿cuál es la raza? _____

b) Criollo ()

6. ¿Qué tipo de alimento le brinda a su perro?, (*Se puede seleccionar más de una opción*)

a) Comercial en croquetas () b) Enlatado ()

c) Sobras de comida () d) Preparado en casa ()

7. ¿Qué agua de bebida le brinda a su mascota?

a) De grifo () b) Purificada ()

8. ¿En qué lugar habita su perro?

a) dentro de casa ()

b) fuera de casa provisto de sombra ()

c) fuera de casa expuesto al sol la mayor parte del día ()

9. ¿Con que frecuencia lleva a su mascota a revisión con el Médico Veterinario Zootecnista?

6 meses (), 1 año (), Más de 1 año (), Especifique _____.

10. ¿Su mascota está esterilizada reproductivamente?

a) Sí () ¿A qué edad la esterilizó? _____

b) No ()