

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**EVALUACIÓN DE CICLOOXIGENASA 2 Y APOPTOSIS SOBRE LA
REGRESIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EN
PERROS TRATADOS CON CASIOPEÍNA® IIGLY.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

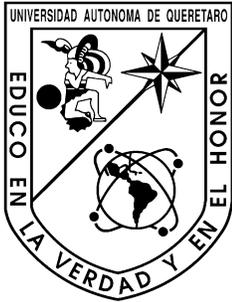
Presenta

M.V.Z. Sandra Patricia Rodríguez

Dirigido por:

MVZ. MSPAS. Paola Jazmín Aranda Vargas

Querétaro, Qro. Septiembre del 2022.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

**EVALUACIÓN DE CICLOOXIGENASA 2 Y APOPTOSIS SOBRE LA
REGRESIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
EN PERROS TRATADOS CON CASIOPEÍNA® IIGLY.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

MVZ. Sandra Patricia Rodríguez

Dirigido por:

MVZ. MSPAS Paola Jazmín Aranda Vargas
SINODALES

MSPAS Paola Jazmín Aranda Vargas
Presidente

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez
Secretario

MSPAS Orlando Federico Chávez Moreno
Vocal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto
Vocal

Dra. Xóchitl Zambrano Estrada
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Septiembre del 2022.

Fecha de aprobación por Dirección de Investigación y Posgrado: 19 de abril del 2021.

No. Registro. 12367.
México.

RESUMEN

El carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide (CCE) es una neoplasia maligna presente en perros que se origina en el epitelio escamoso. No cuenta con un tratamiento quimioterapéutico eficiente, y los disponibles tienen costos de terapéutica elevados. Dentro de la carcinogénesis del CCE, se ha comprobado la sobreexpresión de la enzima Ciclooxygenasa-2 (Cox-2) en queratinocitos neoplásicos. Su sobreexpresión prolonga la supervivencia de las células anormales y favorece la acumulación de cambios genéticos que aumentan el riesgo de carcinogénesis.

En este trabajo se expone la eficacia de las Casiopeínas® (Cas) como tratamiento quimioterapéutico en cuatro perros con CCE, evaluando el efecto que tienen sobre determinados indicadores de regresión tumoral y se realizó una comparación con un grupo control de tres perros, tratados con un fármaco AINE inhibidor selectivo de Cox-2.

En los resultados obtenidos se observó una ligera linfopenia en el caso de los pacientes tratados con Cas. También se encontró una disminución en el porcentaje de linfocitos intratumorales (TIL's) en los tejidos después del tratamiento con Cas.

En el grupo experimental se encontró un incremento en la expresión de caspasa-3 del 63%, además de un aumento de Cox-2 de un 70%, mientras que en el grupo control tratado con Cimicoxib se encontró un aumento en la expresión de caspasa-3, de 13 veces el valor inicial y una inhibición del 82% de la expresión de Cox-2. En el caso del volumen tumoral en ambos grupos se observó una disminución, siendo más marcada en el grupo control.

Palabras clave: CCE, Perro, Casiopeínas®, Ciclooxygenasa -, caspasa-3.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma or epidermoid carcinoma (SCC) is a malignant neoplasia present in dogs that originates in the squamous epithelium. It does not have a current efficient chemotherapy treatment and those available have prohibitive therapeutic costs. Within the carcinogenesis of SCC, the overexpression of the enzyme Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in neoplastic keratinocytes has been confirmed. Thus overexpression prolongs the survival of abnormal cells and favors the accumulation of genetic changes that increase the risk of further carcinogenesis.

In this paper, the efficacy of Casiopeínas® (Cas) as a chemotherapy treatment in four dogs with SCC is discussed, evaluating the effect they have on certain indicators of tumor regression and a comparison is made with a control group of three dogs, treated with a selective Cox-2 inhibitor NSAID.

In the results obtained, a slight lymphopenia was observed in the case of patients treated with Cas. A decrease in the percentage of intratumoral lymphocytes (TIL's) was also found in certain tissue after treatment with Cas.

In the experimental group, an increase in the expression of caspase-3 of 63% was found in addition to an 70% increase in Cox-2, while in the control group treated with Cimicoxib, an increase in the expression of caspase-3 was found up to 13 times the initial value and an inhibition of up to 82% of the expression of Cox-2. In the case of tumor volumen, in both groups a decrease was observed, being more noticeable in the control group.

Keywords: CCE, Dog, Casiopeínas®, Cyclooxygenase-2, caspase-3.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a todos los profesores que me han apoyado en mi formación profesional compartiéndome todo su conocimiento y brindándome su apoyo. Inspirando mi trabajo a cada momento, despertando mi curiosidad y enseñándome a explotar mi creatividad y carácter.

A mi familia ya que ha estado conmigo desde el inicio de mi formación académica, acompañándome en este largo y arduo camino ofreciéndome siempre las herramientas para crecer tanto intelectual como personalmente e inspirándome con su ejemplo.

A mis hijos que me acompañaron cada día brindándome toda su comprensión y cariño, dándome su amor incondicional el cual me motivaba a no rendirme.

A mi compañero de vida que trabajó junto a mi cada día para sacar adelante a nuestra familia. En los momentos más pesados me enseñó a detenerme, tomar fuerza, organizar todo nuevamente y continuar con todo el trabajo.

A mis amigos y colegas especialmente Luis Enrique Díaz Zepeda y Sylvia Limones Luna, que siempre me apoyaron con manos en el quirófano o brindándome los espacios adecuados para la atención óptima de mis pacientes, sin su colaboración este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo.

A mis alumnos los cuales siempre han sido una inspiración y me han dado todo su apoyo y cariño. Especialmente a todos los Estudiantes que me brindaron su apoyo en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma de Querétaro y a los médicos que ahí laboran, la MVZ Gabriela Rodríguez, MVZ Fernanda Almada, MVZ MSPAS Orlando Chávez, Dr. Rodrigo Barrón y MVZ Manuel Trejo Mandujano su apoyo y conocimiento fue crucial para el éxito del proyecto.

Y por último a mi directora la cual ha puesto todo su esfuerzo en este proyecto, trabajó a mi lado y me enseñó con su ejemplo a buscar la excelencia en todo lo que hago.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a toda la gente que trabajó a mi lado de manera indirecta como el laboratorio Biocel, especialmente la MVZ MMVZ Cert. Diana Cecilia Ontiveros Rodríguez y el MVZ MMVZ Cert. Luis Javier Ortega Hernández colaborando grandemente y apoyando al desarrollo de la investigación.

Al laboratorio PatVet especialmente al MSPAS Alejandro Enríquez Vázquez y a la MVZ Paula Verónica Guzmán Ángeles quienes tienen todo mi cariño y respeto por el apoyo en mi preparación en el área de patología, compartiendo su trabajo y conocimiento conmigo para realizar las técnicas de histopatología necesarias.

Agradezco enormemente a mis sinodales por su apoyo, consejo y direccionarme de manera acertada en este proyecto, confiando en mi trabajo y ayudándome a mejorarlo cada semestre, a la Dra. Lena Ruiz Azuara por permitirme trabajar con este compuesto y formar parte de este equipo de trabajo.

También quiero agradecer especialmente a la Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano y el equipo del Laboratorio de Biología Molecular de la FCN, ya que gracias a su apoyo y fé en mi trabajo se pudieron montar las técnicas realizadas en este proyecto.

Por último, quiero agradecer al sistema de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyar el trabajo de todos los investigadores, haciendo posible el poder llevar a cabo los proyectos y trabajos que fomentan el desarrollo de nuevas tecnologías que mejoran a cada momento.

ÍNDICE

	Página
Resumen (palabras clave)	i
Abstract	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de tablas	viii
Índice de gráficos	viii
Índice de figuras	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Piel	3
2.1.1 Histología de la piel	3
2.1.1.1 Epidermis	3
2.1.2.2 Dermis	5
2.1.2.3 Irrigación e inervación	5
2.1.2.4 Mecanismos de defensa físicos	5
2.2 Apoptosis	5
2.2.1 Mecanismos de activación de la apoptosis	6
2.2.2 Genes reguladores de la apoptosis	8

2.3	Carcinoma de Células Escamosas (CCE)	9
2.3.1	Generalidades	9
2.3.2	Cox-2 y en la carcinogénesis del CCE	11
2.3.3	Células del sistema inmune involucradas con el CCE	13
2.3.4	Marcadores tumorales	16
2.3.5	Regresión tumoral	19
2.4	Casiopeínas	20
2.4.1	Composición y mecanismo de acción	21
2.4.2	Casiopeína IIgly	22
III.	HIPÓTESIS	24
IV.	OBJETIVO GENERAL	24
4.1	Objetivo Especifico	24
V.	METODOLOGÍA	25
5.1	población de estudio	25
5.2	Toma de muestra	25
5.3	Administración de tratamientos	26
5.4	Realización de histopatológicos e Inmunohistoquímicos	28
5.5	Determinación del volumen tumoral	30
5.6	Medición de leucocitos intratumorales	30
5.7	Análisis estadístico	30
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1	Tratamientos	31
6.2	Estado general de los pacientes antes de	

recibir tratamiento	32
6.3 Alteraciones pos-tratamiento encontrados	
en la Hematología	33
6.4 Evaluación de linfocitos intratumoral (TIL's)	35
6.5 Evaluación del porcentaje de apoptosis y	
expresión de Cox 2	37
6.6 Volumen tumoral	40
VII. CONCLUSIÓN	42
VIII. BIBLIOGRAFÍA	43
IX. APÉNDICE	53
9.1 Lugar y condiciones de realización del estudio	53
9.2 Colaboración de clínica particular Vet 101	54
9.3 Colaboración de HVPE de la UAQ	55
9.4 Consentimiento informado para tutor del paciente	56

ÍNDICE DE CUADROS

Tablas	Título del cuadro	Página
1	Clasificación de los marcadores utilizados en CCE	17
2	Características de los pacientes que participaron en el proyecto	31
3	Comparación de los resultados de hematología previos al tratamiento de ambos grupos.	32
4	Resultados de la hematología antes y posterior a los tratamientos	33
5	Porcentaje de TIL's por paciente antes y después del tratamiento	35
6	Análisis estadístico para la evaluación de TIL's.	36
7	Expresión de caspasa-3 por paciente antes y después del tratamiento	37
8	Expresión de Cox-2 por paciente antes y después del tratamiento	38
9	Análisis estadístico para la expresión de caspasa-3 y Cox-2.	39
10	Base de datos del progreso del volumen tumoral después del tratamiento de cada grupo	40
11	Análisis estadístico del volumen tumoral entre ambos grupos	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Título del Gráfica	Página
1	Expresión de caspasa-3 por paciente antes y después del tratamiento.	35
2	Expresión Cox-2 por paciente antes y después del tratamiento.	37
3	Valores de TIL's por paciente antes y después del tratamiento	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la figura	Página
1	Corte histopatológico de la piel.	4
2	Vías de apoptosis.	7
3	Lesión macroscópica de un carcinoma de células escamosas.	9
4	Imagen citológica de un CCE en perro	10
5	Corte histopatológico de un CCE	10
6	Ciclo del ácido araquidónico.	12
7	Esquema de transformación maligna y la presentación de sus péptidos en moléculas MHC clase I.	14
8	Esquema de presentación de péptidos tumorales y activación de LT CD4+.	15
9	Estructura molecular de CasIIgly	22
10	Preparación de Cas IIgly	27

I. INTRODUCCIÓN.

El carcinoma de células escamosas (CCE) es una neoplasia maligna muy común e invasiva que se presenta en los perros generalmente de color blanco o colores claros, con predilección de las zonas sin pelo. Estos presentan masas que crecen aceleradamente y que llegan a ulcerarse e infectarse, generando sangrado y mucho dolor (Lascelles et al., 2000; Echeverry y Buriticá, 2007).

Dentro de la carcinogénesis del CCE, se ha determinado que la participación de la ciclooxigenasa-2 (Cox-2) tiene un papel importante en la progresión tumoral. Cox-2 regula la tasa de producción de eicosanoides (prostaglandinas PGs, prostaciclina y tromboxanos) a partir de ácido araquidónico libre. Para la biosíntesis de estos eicosanoides la enzima presenta diferentes formas, Cox-1 y Cox-2 (Leahy et al., 2002; Vega, 2005; Díaz et al., 2009). Cox-1 se presenta constitutivamente, está presente en la mayoría de las células sanas y está relacionada con procesos fisiológicos normales. Cox-2 es una enzima que genera inhibición de la apoptosis en pacientes CCE, inhibiendo la expresión de genes relacionados con promoverla y aumentando los que la inhiben (Zhang et al., 2006).

En la actualidad, el aumento de los factores carcinogénicos ha provocado incremento en la incidencia de tumores de tipo CCE. En Latinoamérica esta neoplasia no cuenta con un tratamiento quimioterapéutico accesible y los disponibles causan efectos secundarios que pueden llegar a comprometer la vida del animal presentando pocos resultados eficientes. Por este motivo, es necesario continuar en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas menos tóxicas y más efectivas.

Las Casiopeínas® (Cas) son fármacos experimentales utilizados como tratamientos quimioterapéuticos, que en líneas celulares humanas de carcinoma han mostrado buenos resultados. Estos fármacos actúan mediante apoptosis mitocondrial y la formación de aductos con fracciones nitrogenadas que impiden la división de las células neoplásicas. Las Cas presentan baja toxicidad en células sanas y tienen una importante selectividad tumoral (López et al., 2011; Gutiérrez et al., 2013; Hernández et al., 2013; Campos, 2019; Godínez et al., 2022; Johnson et al., 2022).

En investigaciones anteriores, se ha evaluado el efecto antineoplásico de este compuesto mediante mediciones de caspasa-3 en perros con tumor venéreo transmisible (TVT) y CCE, obteniendo resultados favorables para la regresión de dichos tumores (manuscrito en preparación, 2022). Actualmente el grupo de trabajo de Cas realiza investigación para determinar si demuestra eficacia para emplearse como tratamiento quimioterapéutico en perros con CCE.

II. ANTECEDENTES

A continuación, se presenta una descripción sobre los temas principales relacionados con este proyecto.

2.1. Piel

La piel es el órgano más amplio del cuerpo y tiene funciones de termorregulación, sensibilidad y protección (Castellanos, 2005). Interviene en complejas interacciones celulares y moleculares de respuesta a estímulos del medio ambiente y la mayoría de las enfermedades metabólicas o sistémicas se ven reflejadas en ella (Trigo et al., 2011).

La piel está formada por dos capas: la epidermis, una región avascular formada por tejido epitelial estratificado plano queratinizado y la dermis que corresponde a una región vascularizada compuesta por fibras colágenas y elásticas que conforman un tejido conjuntivo denso irregular con abundantes terminaciones nerviosas (Castellanos, 2005). La hipodermis corresponde al tejido subcutáneo y de manera específica no es parte de la piel; sin embargo, está estrechamente relacionada con la misma, lo que hace importante su evaluación en conjunto (Banks, 1986; Castellanos, 2005; Trigo et al., 2011).

2.1.1 Histología de la piel.

Se caracteriza por muchas capas celulares derivadas de una sola capa basal y su grosor varía dependiendo de la región anatómica (Banks, 1986; Megías, 2020).

El epitelio escamoso estratificado queratinizado, en casi todas sus localizaciones, es una membrana epitelial gruesa. El espacio entre la capa de células basales y el tejido conjuntivo presenta muchas interdigitaciones. Esta relación morfológica particular permite la difusión y adhesión de diferentes moléculas. Las capas queratinizadas protegen contra daños mecánicos y deshidratación (Banks, 1986; Navarrete, 2003).

2.1.1.1 Epidermis.

Presenta una serie de proyecciones que se dirigen hacia la dermis, conocida con el nombre de red de Malpighi. Según Navarrete (2003), Castellanos (2005) y Trigo et al. (2011), el epitelio estratificado de la epidermis se compone de cinco estratos los cuales partiendo de lo basal a lo apical son: (Figura 1).

Estrato basal. Formado por una capa de células cuboidales o prismáticas, las cuales descansan sobre una membrana basal que separa a la epidermis de la dermis. Las células basales reemplazan a las ya queratinizadas, que se descaman de manera constante. Entremezcladas con las células basales se encuentran los melanocitos, los cuales producen y almacenan pigmento que ayuda a evitar que la luz ultravioleta dañe el núcleo de las células. Además, se encuentran células de Langerhans, que actúan como células presentadoras de antígeno y células de Merkel (células neuroendocrinas que se localizan en zonas de la piel muy sensibles como dedos, labios y folículos pilosos) (Navarrete, 2003; Castellanos, 2005 y Trigo et al., 2011).

Estrato espinoso. Formado por células poliédricas adheridas de manera estrecha por abundantes uniones intercelulares (desmosomas); su función principal es la síntesis de queratohialina (Navarrete, 2003; Castellanos, 2005 y Trigo et al., 2011).

Estrato granuloso. Formado por una o dos capas de células alargadas con granulaciones citoplasmáticas basófilas, que corresponden con el cúmulo de la queratohialina. A nivel de los folículos pilosos sus granulaciones son eosinófilas y corresponden con la trichohialina (Navarrete, 2003; Castellanos, 2005 y Trigo et al., 2011).

Estrato lúcido. En áreas sin pelo se presenta un estrato adicional que consta de una o varias capas de células homogéneas y aplanadas repletas de queratina, que forman una capa compacta. En perros y gatos, este estrato se aprecia sólo en el cojinete plantar y en ocasiones en la nariz (Navarrete, 2003; Castellanos, 2005 y Trigo et al., 2011).

Estrato córneo. Barrera impermeable formada por una densa capa de escamas y queratina (Navarrete, 2003; Castellanos, 2005 y Trigo et al., 2011).

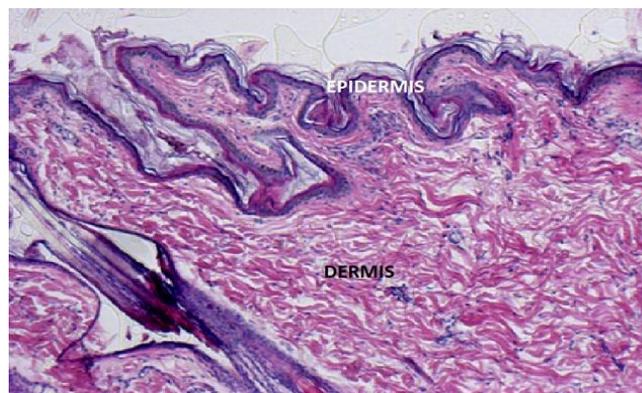


Figura 1. Corte histológico de la piel (Vera y Guerrero, 2018).

2.1.2.2 Dermis.

La dermis está compuesta por tejido conjuntivo laxo y denso irregular con vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La capa profunda de tejido conjuntivo denso irregular de piel delgada se denomina capa reticular. En la piel gruesa la capa superficial de tejido conjuntivo laxo, la capa papilar, forma proyecciones denominadas “papilas dérmicas” que se interdigitan con la epidermis y sirven para anclar ambas capas. Estas son poco manifiestas o ausentes en la piel fina (Bacha y Bacha, 2001).

2.1.2.3 Irrigación e inervación.

El aporte sanguíneo es dado por dos tipos de arterias; las cutáneas y las mixtas, que forman los plexos superficial, medio y profundo (Megías, 2020). Existe además inervación sensitiva en epidermis, folículos pilosos y terminaciones especializadas para el tacto, presión, calor y temperatura. Los plexos linfáticos se localizan a nivel de las papilas en la unión de la dermis con la hipodermis (Pérez, 2002; Trigo et al., 2011).

2.1.2.4 Mecanismos de defensa físicos.

La melanina que se encuentra en la epidermis y el pelo protegen de la radiación ultravioleta (Pérez, 2002; Trigo et al., 2011).

La membrana basal es un excelente filtro de macromoléculas y en cierto grado, evita la invasión de células neoplásicas de la epidermis a la dermis (Pérez, 2002; Trigo et al., 2011).

2.2. Apoptosis.

La epidermis de la piel, se encuentra constantemente expuesta a factores que pueden provocar daño a nivel de los queratinocitos. Dentro de estos factores podemos mencionar a los rayos UV, citocinas, neuropéptidos, estrés oxidativo, linfocitos T citotóxicos, macrófagos y quimosinas, los cuáles pueden producir un proceso de muerte celular denominado apoptosis. Dicho proceso, es un mecanismo de defensa para mantener la integridad, la habilidad de restablecimiento celular y se considera un balance para mantener la homeostasis de la piel, así como el ciclo del folículo piloso (Díaz, 1997).

De acuerdo a Elmore (2007), la apoptosis se puede definir como “un proceso coordinado dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteína proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula”.

Es indispensable que todas las células tengan la capacidad de autodestrucción en caso de que estas ya no sirvan, no sean necesarias o se produzca un error irreversible en su genoma y sean portadoras de mutaciones (Pardo, 2005; Trigo et al., 2017). Para esto las células poseen la información genética necesaria para sintetizar moléculas proteolíticas cuando estas son requeridas. Mientras la célula es funcional dichas moléculas proteolíticas permanecen de manera latente, inactivadas por proteínas anti-apoptóticas. Si la integridad de la célula es afectada por cualquier agente al grado de volverse una amenaza para el organismo se activan las proteínas pro-apoptóticas (Roseto y Brenner, 1999; Trigo et al., 2017).

2.2.1 Mecanismos de activación de la apoptosis.

Las caspasas se dividen en iniciadoras y ejecutoras, una vez activadas, las caspasas iniciadoras sufren un cambio en su estructura y comienzan con la transducción y ejecución de la señal de la apoptosis (Lowe y Lin, 2000). Su activación se realiza por autoproteólisis cuando son traslocadas a sitios de la célula específicos o mediante adaptadores. Dichas proteasas activan a las caspasas ejecutoras mediante un corte específico, para encargarse de la lisis y destrucción de la célula (Elinos-Báez et al., 2003).

La apoptosis se puede desarrollar de manera intrínseca en caso de que la célula ya esté programada para morir como en la mayoría de las células de la sangre, o extrínseca cuando la apoptosis es secundaria a unión de receptores de membrana en la célula como en el caso de algunos fármacos quimioterapéuticos (Lowe y Lin, 2000; Trigo et al., 2017).

En la apoptosis intrínseca o mitocondrial, el citocromo C es liberado del espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol y se une a una proteína conocida como Factor activador de proteasa apoptótica-1 (Apaf-1). La unión de procaspasa-9 a Apaf-1 oligomérica da lugar a su forma activa, como caspasa iniciadora. El complejo de citocromo C / Apaf-1 / caspasa-9 (apoptosoma), divide de manera proteolítica la

procaspasa-3, lo que genera caspasa-3 activa, que inicia la cascada de reacciones que matan la célula. La caspasa-3 es una de las ejecutoras más importantes y producto final de varias de las vías que intervienen en la destrucción celular (Figura 2) (Lowe y Lin, 2000; Owen et al., 2014).

De acuerdo con Martínez (2009), la activación extrínseca de la apoptosis se da por medio de receptores transmembranales como el Factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando al receptor de TNF, el TRAIL (*TNF- Related Apoptosis inducing Ligand*) a los receptores DR4 (*Death receptor-4*) y DR5 ó 3 (*Fatty acid synthetase ligand*) al receptor Fas R (Figura 2). Se conoce que estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (*Fas-Associated Death Domain*) o TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*), las cuales activan las caspasas iniciadoras -8 y -10 y finalmente se da la activación de las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico.

Una vez activada la cascada de las caspasas, éstas actúan sobre una gran variedad de sustratos que incluyen proteínas reguladoras y estructurales como las del citoesqueleto y del núcleo (Figura 2). Las caspasas activan las enzimas endonucleasas para iniciar la fragmentación del ácido desoxirribonucleíco (ADN)).

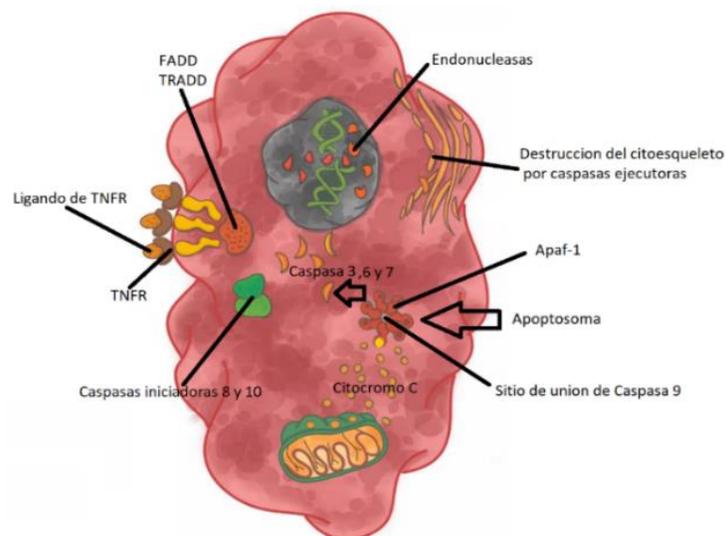


Figura 2. Vías de apoptosis. Esquema que representa las vías de activación de la apoptosis (Dibujo propio digitalizado con Autodesk SketchBook).

En el citoplasma existen desoxirribonucleasas o DNasa activada por caspasa (CAD). El efecto de CAD es bloqueado por otra molécula llamada, inhibidor de la ADNasa activada por caspasa (ICAD) formando el complejo CAD-ICAD, cuando se activa la caspasa-3 fragmenta el complejo, dejando libre el CAD para que pueda actuar sobre el ADN (Martínez, 2009; Trigo et al., 2017).

2.2.2 Genes reguladores de la apoptosis.

Los encargados de la regulación del ciclo celular por medio de la activación o inhibición de la expresión de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, son los genes de la familia *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*). Estos codifican proteínas que regulan los cambios estructurales en la membrana mitocondrial que pueden insertarse en ella y regular procesos de permeabilización actuando en un punto clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular (Martínez, 2009).

La familia Bcl-2 incluye un importante grupo de proteínas con dominios BH1 a BH4. Específicamente, la familia BH3 solo incluye miembros pro-apoptóticos (Lowe y Lin, 2000; Owen et al., 2014).

Los estímulos apoptóticos intrínsecos actúan en parte al activar miembros de ésta familia, los que a menudo están secuestrados en las mitocondrias de una célula sana. Por ejemplo, la caspasa-8 generada mediante la vía Fas (receptor de la apoptosis por vía extrínseca en membrana celular) escinde al miembro de la familia BH3, Bid, lo cual lo libera del secuestro, y le permite activar la vía de muerte mitocondrial en su forma truncada (tBid) (Owen et al., 2014). Bax es una proteína relacionada con la familia de genes *BCL2* que promueve la apoptosis y actúa como un supresor de tumores. Se piensa que Bax es un objetivo de la transcripción de p53 y así puede formar parte de la vía del gen *TP53* (Díaz, 2003).

Elmore (2007) reporta que las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-W, Bag.

2.3 Carcinoma de Células Escamosas (CCE)

2.3.1 Generalidades

El CCE es una de las neoplasias más comunes en perros, ocupa el octavo lugar en neoplasias cutáneas y subcutáneas y es la segunda neoplasia más común en cavidad oral de perros (Pestili, 2001; Echeverry y Buriticá, 2007). Es una neoplasia de tipo maligna que se origina en el epitelio escamoso, cavidad oral, falanges, cavidad nasal y, en general, en las zonas descubiertas de pelo como la ingle y el prepucio (Silva et al., 2015). Sin embargo, se puede desarrollar en miembros torácicos, pelvianos, escroto y perineo en general, siendo reportados los de cavidad oral más agresivos (Mestrinho, 2018). Estos son localmente invasivos, en ocasiones provocan osteólisis y en casos crónicos pueden desarrollar metástasis a linfonodos regionales, tonsilas, pulmón y falanges (Figura 3) (Pestili, 2001; Belluco et al., 2013).



Figura 3. Lesión macroscópica de un CCE. Se observa una lesión en ingle generada por un CCE en un perro (Imagen propia).

Macroscópicamente, los perros con CCE, presentan crecimientos papilares con aspecto de coliflor que predisponen a la ulceración y sangrado de la lesión (Silva et al., 2015).

Citológicamente se observan abundantes células epiteliales pleomórficas de tipo escamoso. Estas células presentan núcleos con cromatinas finamente granulares o muy condensadas y nucleolos prominentes (Figura 4-A, B). Entre los hallazgos más característicos se encuentra la presencia de citoplasmas reforzados con queratina, que se observan de un color rosa vivo a naranja (Figura 4-A). Este hallazgo varía de acuerdo a la diferenciación de la neoplasia. También se observan células fibroideas (células

renacuajo) (Figura 4-C), donde en ocasiones se pueden apreciar los espirales de Heis Jaimer. Un hallazgo característico es la presencia de perlas de queratina y escamas en cantidad variable (Cowell et al., 2009; Raskin, 2016).

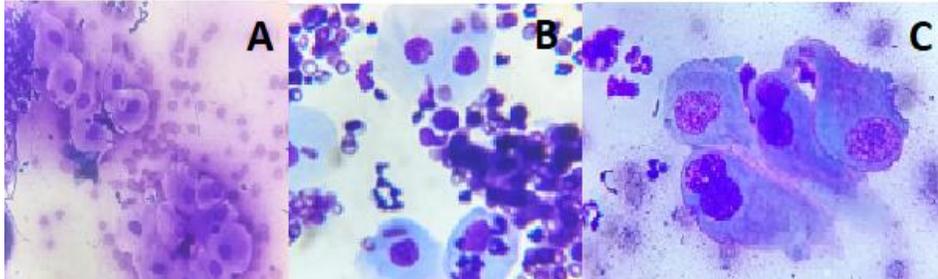


Figura 4. Imagen citológica de un CCE en perro. A. Grupos de células epiteliales con citoplasmas rosa brillante. B. Célula epitelial con núcleos prominentes, granulares y pleomórficos. Se aprecia Emperipolesis. C. Células fibroideas (células renacuajo). Tinción con Hemocolorante rápido, A y B objetivo 10x, C objetivo 100x con aceite de inmersión (Imagen propia).

Histopatológicamente se observa hiperqueratosis, paraqueratosis, pérdida de polaridad celular, marcadas uniones intercelulares, perlas de queratina y pleomorfismo celular. También se aprecian figuras mitóticas en los queratinocitos y abundante queratina que conforme progresa la neoplasia invade dermis y otros tejidos (Figura 5) (De Buen de Arguero, 2014; Meuten, 2020).

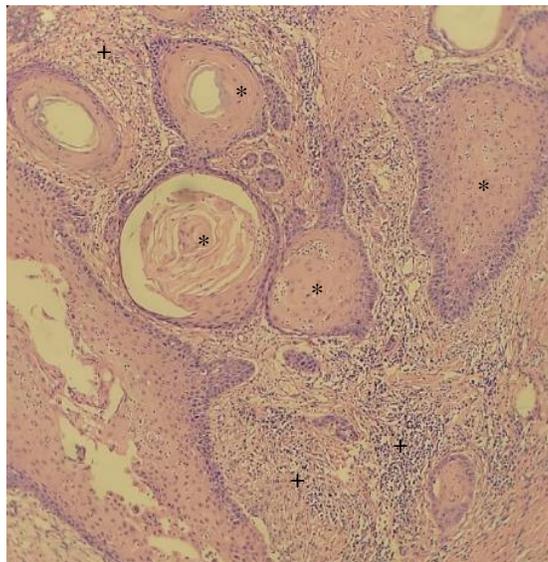


Figura 5. Corte histopatológico de un CCE. Se aprecian islotes epiteliales con material eosinofílico (*), correspondiente a perlas de queratina, con evidentes células atípicas en su periferia (+) (Imagen propia).

El rango de edad media de presentación es de ocho a diez años, aunque puede presentarse en animales más jóvenes. La exposición prolongada a los rayos ultravioleta (UV) es un factor predisponente, debido a que implica la supresión del gen *TP53* el cual codifica a proteína p53 que detiene el ciclo celular cuando el ADN se altera, para que la célula pueda reparar el daño antes de continuar con la mitosis, de lo contrario el gen *TP53* inducirá la apoptosis (Rodríguez, 2001). La presencia de pelaje blanco hace susceptibles a los animales a la presentación cutánea (ingle, prepucio, perineo o nariz), mientras que en los pelajes oscuros predomina la presentación en las falanges. Entre las razas más susceptibles encontramos el Schnauzer estándar, Basset Hound, Collie, Bóxer, Dálmata, Starrordshire Bull Terrier, Pitbull Terrier Americano y Beagle (Rodríguez, 2001; Echeverry y Buriticá, 2007; Silva et al., 2015).

La extirpación con un margen amplio en una etapa temprana es hasta ahora el tratamiento con mejores resultados y pronóstico, pero depende de una detección temprana y un diagnóstico preciso para un mejor pronóstico. En el caso de los tumores que no es posible extirpar por medio de cirugía, actualmente la terapia con radiación suele ser la mejor opción (Belluco et al., 2013; Mestrinho, 2018).

En caso de que exista metástasis o el resultado de la terapia con radiación no sea el esperado, el tratamiento quimioterapéutico, (Vincristina, Doxorubicina y 5-Fluoruracilo) se ha reportado con resultados variables y poco eficientes (Echeverry y Buriticá, 2007).

2.3.2 Cox 2 y la carcinogénesis del CCE.

Cox es una enzima relacionada con la inhibición de la apoptosis en pacientes con carcinoma incluyendo el de células escamosas, regulando la tasa de producción de eicosanoides [prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos] a partir de ácido araquidónico libre. Para la biosíntesis de estos eicosanoides, la enzima presenta diferentes formas: Cox-1, Cox-2 y Cox-3 (Figura 6) (Leahy et al., 2002; Vega, 2005; Díaz et al., 2009).

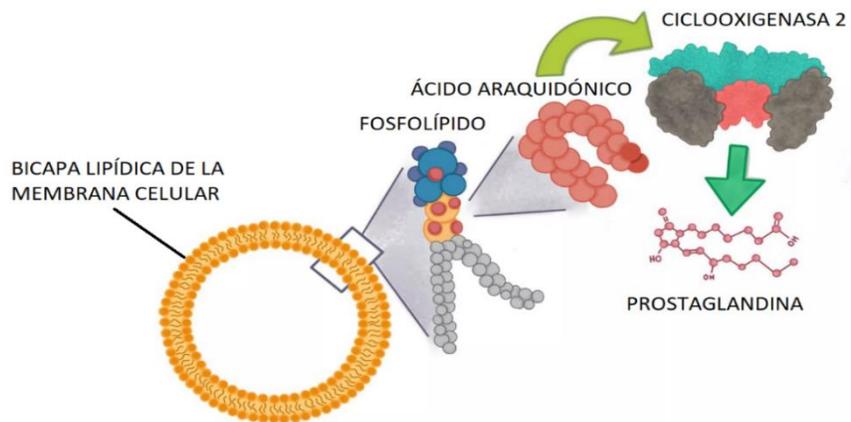


Figura 6. Ciclo del ácido araquidónico. Se representa el daño de la membrana celular y la síntesis de prostaglandina a partir de ácido araquidónico (Dibujo propio digitalizado con Autodesk SketchBook).

Cox-1 se presenta constitutivamente y está presente en la mayoría de las células y tejidos, ésta se expresa en bajos niveles y sintetiza la prostaglandina necesaria para las funciones fisiológicas. Cox-2 es inducible en respuesta a citoquinas, interleucinas (IL), factores de crecimiento, oncogenes, etc. Cox-2 no está presente en todas las células, pero es rápidamente expresada en respuesta a señales relacionadas con el crecimiento celular. La sobreexpresión de Cox-2 tiene como consecuencia el aumento de la producción de PGs lo que provoca aumento de la inflamación y carcinogénesis. Las prostaglandinas PGE2 y PGF2, estimulan la mitogénesis en sinergia con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), moléculas proteicas biorreguladoras del ciclo celular. Está demostrado el aumento en la expresión de Cox-2 en células estromales intratumorales, extratumorales y neoplásicas propias del CCE (Leahy et al., 2002; Vega, 2005; Díaz et al., 2009; Cornejo, 2011).

Se ha comprobado que la apoptosis o muerte celular programada disminuye durante la carcinogénesis, mientras que aumenta la expresión de Cox-2 en células epiteliales.

Debido a que Cox-2 se expresa en procesos inflamatorios, la inflamación crónica puede promover la carcinogénesis por medio de una sobre-expresión de la enzima. Cox-2 posee actividad peroxidasa que cataliza la conversión de procarcinógenos a carcinógenos, las reacciones oxidativas son catalizadas principalmente por el citocromo p-450. La expresión de esta enzima se ha encontrado disminuido en diferentes tipos de

neoplasias de células epiteliales como en cáncer de glándula mamaria, próstata y cáncer de ovario (Sánchez, 2013), provocando la sobre-expresión de Cox-2 y la predisposición a sufrir daños en el ADN y promover la carcinogénesis (Vega, 2005; Díaz et al., 2009).

Se ha identificado la sobre-expresión de Cox-2 en células inflamatorias, hiperplásicas, en epitelio neoplásico, células vasculares intra y adyacentes al tumor y enfermedad metastásica (Leahy, 2002). Este efecto ha sido atribuido, al menos en parte, a un aumento en los niveles de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Posiblemente, la sobreexpresión de Cox-2 prolonga la supervivencia de células anormales favoreciendo la acumulación secuencial de cambios genéticos que aumentan el riesgo de carcinogénesis (Díaz et al., 2009).

Se ha encontrado una relación negativa entre la expresión de Cox-2 en células de carcinoma mamario y el periodo de supervivencia en perras con tumores mamaros (Eunice et al., 2012). De igual manera, Pestili (2001) encontró la expresión de Cox-2 de manera abundante en queratinocitos neoplásicos y en células estromales de CCE sin mostrar predilección por un sitio específico. Eunice et al. (2012) y Zhang et al. (2006), evaluaron la tasa de apoptosis en células de carcinoma y leucemia tratadas con Celecoxib, inhibidor específico de Cox-2 y encontraron disminución de ésta, así como un periodo de supervivencia más largo. Por estos motivos se ha indagado en el uso de antiinflamatorios tipo AINE, inhibidores específicos de Cox-2 como tratamiento antineoplásico.

El Cimicoxib es un fármaco antiinflamatorio no esteroidal tipo AINE utilizado para manejo del dolor, desinflamación y como antipirético. Este es un inhibidor de Cox, selectivo de Cox 2, lo que conlleva a una buena analgesia con un mínimo de efectos secundarios y adversos (Jiménez, 2017).

2.3.3 Células del sistema inmune involucradas con el CCE.

Otro mecanismo por el cual el organismo regula la formación de tumores es por medio de la destrucción de las células que han sufrido transformaciones potencialmente malignas en su genoma, este proceso es llamado inmunovigilancia (Dhabhar et al., 2010).

Una consecuencia de esta transformación maligna es la modificación de las moléculas que se expresan en su membrana, las cuales producen un cambio en la

inmunotolerancia del organismo. Esto propicia una respuesta inmunológica contra ellas y son conocidos como antígenos tumorales. Estos antígenos tumorales pueden ser reconocidos tanto en el interior como en el exterior de la célula, aunque comúnmente este cambio se lleva en la membrana (Figura 7) (Batista, 2003).

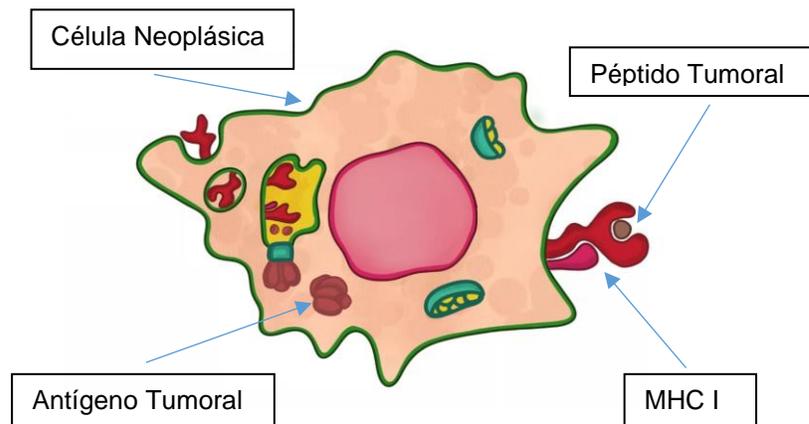


Figura 7. Esquema de célula que ha sufrido una transformación maligna. Se muestra la presentación de sus péptidos en moléculas MHC clase I (Dibujo propio digitalizado con Autodesk SketchBook).

Entre las células encargadas de llevar a cabo la inmunovigilancia de los antígenos tumorales en carcinomas, se encuentran los linfocitos LT CD8+ o LT_c (citotóxicos). Estos reconocen los péptidos que se acoplan al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (CMH de clase I), el cual varía en el tamaño de sus cadenas α y β de acuerdo a la especie y presentan estos péptidos en las células malignas como antígenos tumorales (Batista, 2003). Estos antígenos estimulan a los linfocitos T CD8+ que reconocen a las células tumorales a través del receptor de células T. Las células T CD8+ cumplen la función de lisar células propias modificadas (como las tumorales) directamente, e incluso se ha demostrado que destruyen tumores grandes en estudios *in vivo*. Las células LT CD 4+ o LT_h (cooperadores) son responsables de eliminar tumores por medio de la activación y reclutamiento de células efectoras como los macrófagos y eosinófilos. Estas células son necesarias para la activación de los LT CD8+ específicos de antígeno, además del mantenimiento de las funciones efectoras de éstas por medio de la secreción de IL-2, esencial para el crecimiento y proliferación de las células LT CD8+ (Figura 8) (Cho et al., 2003; Balkwill, 2004; Owen et al., 2014).

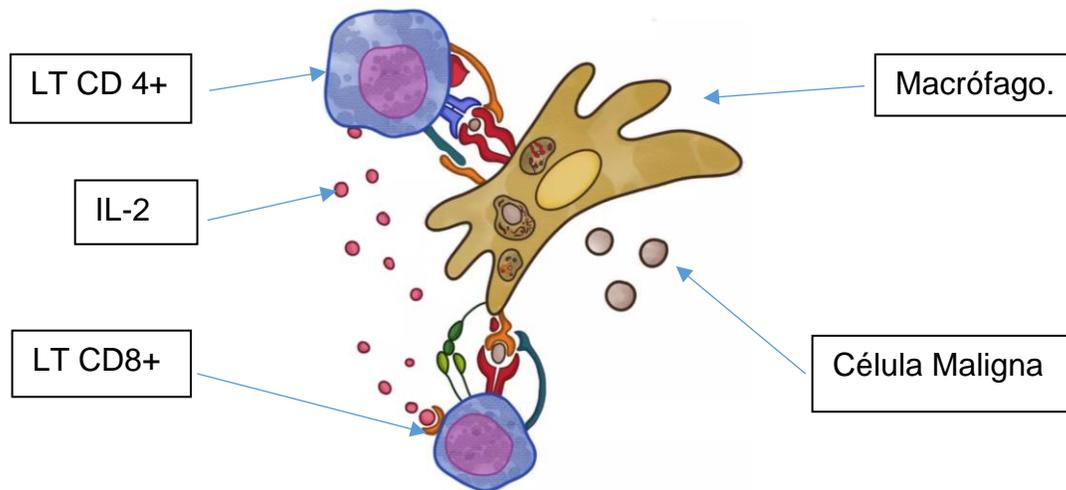


Figura 8. Respuesta tipoTh1. Esquema de presentación de péptidos tumorales y activación de LT CD4+ (Dibujo propio digitalizado con Autodesk SketchBook).

Las citocinas que producen los LT_h (CD4+) que activan a los LT_c (CD8+) son de una respuesta Th1 y son TNF β , IL-2, IL-12 e IFN γ . Estas citocinas incrementan la expresión de MHC_I en la superficie tumoral (Owen et al., 2014). Los LT_c generan perforinas, que producen agujeros en la membrana de las células tumorales o las granzimas, las cuales degradan el ADN de las células malignas (Batista, 2003; Dhabhar et al., 2010).

Cho et al. (2003), Balkwill, (2004) y Owen et al., (2014), indican que la reacción inmunológica de las células LT CD4+ y LT CD8+ contra células de CCE pueden ser eficaces en los pacientes que padecen este tipo de cáncer y su infiltración intratumoral está relacionada con un mejor pronóstico.

Por otro lado, los macrófagos expresan CD16+ en su membrana y son capaces de desarrollar el mecanismo de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Estos fagocitan células tumorales, presentan el antígeno a los LT, son capaces de producir (TNF), IL-1 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM), los cuales son reguladores de eventos antitumorales y han sido evaluados como candidatos a agentes inmunoterapéuticos (Balkwill, 2004; Owen et al., 2014).

Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para evadir los procesos celulares y humorales propios del sistema inmune, por lo cual la eficacia del mismo se puede ver comprometido. Algunos de estos mecanismos son:

- Pérdida o disminución de la expresión de moléculas del CMH de clase I.
- Liberación de factores inmunosupresores como el factor de crecimiento transformante- β (TGF β).
- Pérdida o disminución de moléculas coestimuladoras.
- Mutaciones en los genes del CMH.
- Modulación antigénica: anticuerpos que no fijan complemento, a los antígenos tumorales.
- Enmascaramiento: las células tumorales pueden recubrirse con moléculas normales del hospedero.
- Resistencia de la célula tumoral a los mecanismos efectores tumoricidas.
- Inducción de apoptosis en los LT por expresión en la célula tumoral de moléculas como Fas ligando.
- Rápida proliferación celular que supera la capacidad de respuesta del sistema inmune.
- Tumores en sitios privilegiados como ojo y cerebro donde el alcance del sistema inmune es limitado (Batista, 2003).

2.3.4 Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales (MT) son proteínas o moléculas producidas por células malignas o por el organismo en respuesta a una transformación maligna. La identificación de los MT tiene muchas funciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las neoplasias. Estos se pueden clasificar de diferentes formas dependiendo de su estructura y función. La mayoría de estos marcadores no poseen una alta sensibilidad, por lo que se sugiere hacer el uso de más de uno para investigación o con fines de diagnóstico y monitoreo de evolución del paciente (Chimenos et al., 2004; Hermida et al., 2016; Gómez, 2017).

Los marcadores más utilizados en el caso del CCE se describen en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Clasificación de los marcadores utilizados en CCE (Chimenos et al., 2004; González, 1013; Hermida et al., 2016; Aylas, 2017; Gómez, 2017; Santibáñez et al., 2017).

Tipo de Marcador	Marcador	Descripción
Marcadores de crecimiento tumoral	Marcador Tumoral	Regula eventos proteolíticos asociados con la coagulación, fibrinólisis, apoptosis e inflamación. Esta presente en los queratinocitos normales, sin embargo, se sobreexpresa en el CCE. Sus niveles están relacionados con el tamaño y extensión tumoral.
	Ag- SCC (Antígeno del carcinoma de células escamosas)	Pertenece a la familia de receptores de tirosín cinasa (TKR), constituida por los genes <i>erbB-1</i> , <i>erbB-3</i> y <i>erbB-4</i> . Cuando ocurre una transformación maligna se ha encontrado un aumento del oncogén <i>erbB-1</i> y sobreexpresión del gen <i>EGFR</i> en células de tumores como carcinomas orales de células escamosas.
	EGF (Factor de Crecimiento Epidermal) y EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal)	Intervienen en el ciclo celular. La proteína ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en carcinomas de células escamosas orales.
	Cox 2 (Ciclooxigenasa 2)	Enzima involucrada con la producción de Eicosanoides como PG2, relacionadas con aumento de la angiogénesis, aumento de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2, EGFR y EGF. Se encuentra sobreexpresada en células de CCE.
	Ciclinas (A, B1, D1, E)	Son anticuerpos monoclonales que aumentan cuando hay proliferación tisular y estan relacionados con el grado histológico del carcinoma de células escamosas oral.
	Ki-67/MIB1	Su aumento está ligado a la disminución de p27 y se ha relacionado con un pronóstico desfavorable.
	SKp2 (S-phase kinase-interacting protein 2)	Es una proteína antiapoptótica. Altas concentraciones de ésta pueden disminuir la iniciación de la apoptosis favoreciendo la progresión tumoral.
	Bcl-2/BAG1	Están asociados con la mutación del gen <i>TP53</i> y se han encontrado niveles elevados en los carcinomas orales de células escamosas (COCE).
	HSP27 y 70 (Heat shock proteins)	Es una estructura proteica del ADN, se asocia con la supervivencia de las células. Su detección puede ser muy útil en la detección precoz de los CCE.
	Marcadores de supresión tumoral y de respuesta antitumoral	pRb (Proteína del retinoblastoma)
CDKIs (Inhibidores de ciclina dependientes de la cinasa)		p21 es el gen inhibidor universal de las CDKs (proteínas celulares con alteraciones). Relacionada con el grado de diferenciación tumoral y su alteración está relacionada con p53.
<i>p53</i>		Es la encargada de que la duplicación del material genético en la replicación se realice de manera correcta en el ciclo y diferenciación celular. Esta proteína no se detecta en el estudio inmunohistoquímico de las células normales y se ha encontrado su sobreexpresión en pacientes con COCE.

	BAX	Es necesario para que p53 inicie el proceso de apoptosis. En pacientes con CCE niveles de Bax tienen un mal pronóstico.
	Fas/FasL	Regulan la apoptosis y pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R). En pacientes con CCE se observa sobreexpresión de FasL. En tumores poco diferenciados puede haber pocos receptores para FasL.
	DC (Células dendríticas)	Se expresan como respuesta antitumoral. La sobreexpresión se relaciona con un buen pronóstico.
	Cadenas Zeta	Son parte de los receptores de las células T, que actúan en la defensa tumoral. Su falta de expresión se relaciona con un mal pronóstico.
Marcadores de angiogénesis	VEGF/VEGF-R (factor de crecimiento endotelial vascular/ receptor del factor de crecimiento endotelial vascular .	Es una citocina multifuncional, que controla la angiogénesis y también actúa como factor de supervivencia de las células endoteliales.
	NOS2 (Óxido Nítrico sintetasa tipo II).	Enzima responsable de la angiogénesis en los tumores y metástasis.
	PD-ECGF (Factor de Crecimiento Celular Endotelial- Derivado de Plaquetas).	Es una citocina angiogénica que deriva de las plaquetas. Se ha reportado su presencia en la microvascularización de carcinoma de células escamosas orales.
	FGFs (Factor de Crecimiento de Fibroblastos).	Familia de polipéptidos que regulan la proliferación y diferenciación celular. Una menor concentración de FGF-1 en la carcinogénesis del CCE puede influir en una pobre diferenciación.
Marcadores de invasión tumoral y potencial metastásico	MMPs (Metallo-Proteasas de Matriz)	Son metaloenzimas de zinc, se expresan en el COCE y se relacionan con el estadio del tumor.
	Integrinas	Familia de proteínas de superficie celular. Relacionadas con procesos tales como reparación epitelial, inflamación o transformación maligna. Algunos estudios demuestran que la integrina $\alpha\beta6$ se expresa en el COCE, ésta expresión es necesaria, pero no suficiente para que se produzca una transformación maligna.
Marcadores celulares de superficie	MHC (Complejo Mayor de histocompatibilidad)	Las moléculas que forman el complejo mayor de inmunohistocompatibilidad clase I intervienen en el reconocimiento de células propias modificadas. La disminución de su expresión está relacionada con un mal pronóstico. El antígeno MHC de clase II se expresa en algunos carcinomas orales comúnmente en los poco diferenciados.
Marcadores intracelulares	Citoqueratinas	Estructuras proteicas de las células epiteliales. La malignización de lesiones orales se relaciona con la ausencia de éstas. Su expresión es utilizada como marcador diagnóstico para evaluar lesiones precancerosas.
Marcadores de queratinización anómala	Filagrinas	Son proteínas ricas en histidina, que se encuentran en las capas granular y córnea del epitelio normal y son responsables de la agregación de queratina en las etapas finales de diferenciación de los queratinocitos. En los

		COCE y CCE forman parte de las perlas de queratina. Su expresión es independiente del grado de atipia histológica.
	Involucrina	Es un producto de diferenciación de los queratinocitos y se piensa que su expresión es independiente de la agresividad tumoral o de la atipia histológica.
	Proteínas desmosomales (E-cadherina)	Está relacionada con la unión célula-célula en tejido normal. En muestras de tejido epitelial normal, displásico y de un COCE se encontró que entre más indiferenciado está el tejido, hay menos expresión de E-cadherina. Esto se relaciona con la transición epitelio mesénquimal (TEM) de las células en la carcinogénesis y que es característico de esta neoplasia. Se observó que su expresión estaba reducida en tumores primarios poco diferenciados y/o con metástasis en ganglios linfáticos cervicales.
	Antígeno de la sustancia intercelular	La pérdida de expresión de este antígeno se observa en el 95 % de los carcinomas oral.

2.3.5 Regresión tumoral

De acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer (NCI) la regresión tumoral se define como la disminución del tamaño de un tumor o del alcance del cáncer en el cuerpo.

Es importante realizar una evaluación objetiva de las neoplasias para poder estimar la regresión y la respuesta del tumor a la terapia administrada. Por esto se crearon diferentes criterios de evaluación de regresión tumoral como RECIST (Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos) en el 2000 para estandarizar los criterios de respuesta tumoral. Posteriormente en enero del 2009 el grupo de trabajo de RECIST presentó la guía actualizada RECIST revisada (versión 1.1) (Eisenhauer et al., 2009; Nishino et al., 2010).

En este sistema se evalúa la regresión del tumor de acuerdo a la medición de las lesiones antes y después del tratamiento. Estas lesiones deben tener un diámetro mayor a 10 mm (Lesiones Diana) y presentarse de 2 a 5 por órgano para sacar un promedio y poder clasificar a los pacientes en cuatro grupos (Eisenhauer et al., 2009; Nishino et al., 2010):

1. Respuesta completa (CR): Desaparición de todas las lesiones diana y ganglios linfáticos patológicos.
2. Respuesta parcial (PR): Disminución de al menos 30% del promedio de los diámetros de las lesiones diana.
3. Enfermedad progresiva (PD): Al menos un aumento del 20% del promedio del diámetro de las lesiones diana o la aparición de lesiones nuevas.
4. Enfermedad estable (SD): No calificar en el grupo PR ni tener un aumento suficiente para calificar como PD (Eisenhauer et al., 2009; Nishino et al., 2010).

Otra forma de clasificar la regresión tumoral es a nivel histopatológico donde se determina el porcentaje de células residuales tumorales/tejido fibrótico en la pieza anatomopatológica. Hay varias clasificaciones y a continuación, describiremos la más utilizada denominada “Grado de regresión de Becker” (Sánchez de Molina, 2018):

- Grado 1a: RC (Respuestas patológica completa) No se identifica tumor en los cortes.
- Grado 1b: RS (Respuesta patológica subtotal). Se observan menos del 10% de células neoplásicas en el lecho tumoral.
- Grado 2: RP (Respuesta parcial). Se observan 10-50% de células neoplásicas en el lecho tumoral.
- Grado 3: RM (Respuesta menor). Se observan más del 50% de células neoplásicas en el lecho tumoral (Sánchez de Molina, 2018).

Los pacientes que presentan menos del 10% de células neoplásicas se clasifican como “Respuesta patológica mayor” (Sánchez de Molina, 2018).

2.4 Casiopeínas® (Cas)

Las Cas (Ruíz- Azuara, 1992, 1996, 2002), son una familia de más de 100 compuestos de quelatos con centro activo de cobre (II). Tienen actividad antineoplásica y presentan un aminoácido que parece darles especificidad y selectividad tumoral (Mejía y Ruiz, 2008; Hernández et al., 2013). Dentro de las Cas más estudiadas se encuentran la Cas IIIa, Cas IIIEa y Cas IIgly.

2.4.1 Composición y mecanismo de acción.

Su fórmula general es $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N}) (\text{a-L- amino acidato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]\text{NO}_3$. El cobre es un metal de transición esencial involucrado en muchas funciones biológicas como el equilibrio Redox (Macedo, 2012).

El oxígeno molecular (O_2) es utilizado por los organismos aerobios para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO's) tales, como el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La mitocondria es la mayor productora de ERO's debido a su función de producción de energía (López et al., 2011; Macedo, 2012; Hernández et al., 2013).

Las ERO's regulan varios procesos celulares; sin embargo, grandes cantidades de éstas pueden ser nocivas para el organismo, ya que dañan los constituyentes celulares e inducen la muerte celular por estrés oxidativo (Macedo, 2012).

El efecto tóxico de las Cas se ha relacionado con la inhibición de la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Campos, 2019). Debido a su centro activo de cobre (II), las Cas y sus complejos tienen la capacidad de catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno como OH^+ mediante una reacción tipo Fenton. La reacción tipo Fenton es un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo lo cual desencadena la producción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en las mitocondrias (López et al., 2011; Hernández et al., 2013). Como consecuencia, se produce un desacoplamiento de la cadena respiratoria celular del tumor por interacción con succinato, piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Lo anterior inhibe la cadena de transporte de electrones y genera una despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Por otra parte, se ha reportado que las Cas también producen daño a nivel del ADN lo que propicia una alteración en la producción de apoproteínas (E4, A1) de la cadena respiratoria, lo que también promueve una mayor producción de ERO's (Campos, 2019). Todo esto conlleva a una disminución en el metabolismo mitocondrial e induce la muerte de las células tumorales, principalmente por la vía intrínseca debido al estrés oxidativo mitocondrial además de la formación de aductos en fracciones nitrogenadas de ADN (Gutiérrez et al, 2013).

2.4.2 Casiopeína Ilgly

La Casiopeína Ilgly (Cas Ilgly) (Figura 9) cuya fórmula es $[\text{Cu} (4,7\text{-dimethyl-1, 10-phenanthroline) (glycine) (\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$, tiene alta actividad citotóxica y neoplásica con baja toxicidad para células sanas en comparación con las otras Casiopeínas (Leal et al., 2006; Cañas et al., 2010).

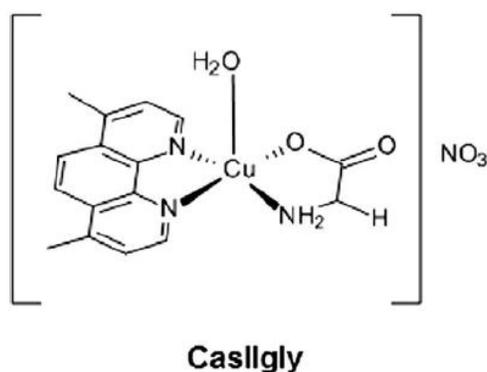


Figura 9. Estructura molecular de CasIlgly (Campos et al., 2019).

En un estudio realizado por Trejo-Solís et al. (2005), el tratamiento con Cas Ilgly indujo apoptosis tanto por la vía dependiente e independiente de caspasas, en células de glioma C6 y en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Obteniendo como resultado la inhibición de la proliferación celular, un aumento de ERO's y finalmente apoptosis inducida de manera dependiente de la dosis.

Alemón-Medina (2007) y Kachadourian *et al.* (2009), mencionan que la Casiopeína Ilgly genera citotoxicidad mediante la formación de radicales hidroxilo en compartimentos celulares como el núcleo o las mitocondrias debido a que se encontró agotamiento de los niveles de glutatión celular (GSH). En este estudio, el tratamiento con Cas Ilgly indujo una caída dramática en los niveles intracelulares de GSH en células HeLa, H157 y A549. También observaron que el tratamiento con Cas Ilgly produjo daño en el ADN mitocondrial lo que resultó en un desequilibrio en la expresión de las apoproteínas de la cadena respiratoria mitocondrial, que también pueden contribuir a un aumento de la producción de ERO's lo que sugiere que Cas Ilgly origina múltiples fuentes de producción de ERO's las cuales inducen la muerte celular programada por la vía mitocondria.

Marín *et al.* (2012), reportaron que Cas Igly fue más eficaz que el 3-bromopiruvato (3BrPyr) para inhibir el crecimiento de varias líneas de carcinomas humanos 24 a 72 h después de su aplicación sin presentar efecto aparente en linfocitos y fue de 1 a 21 veces más potente que 3BrPyr y Cisplatino para inhibir la Hexocinasa (HK) de las células tumorales. También reportaron que en experimentos con Cas Igly luego de 60 min, aumentó la producción de lactato de células tumorales y hubo degradación del glucógeno. Por este motivo, es el compuesto de elección para la investigación de tratamientos antineoplásicos más eficientes y menos tóxicos en animales y humanos (Cañas *et al.*, 2010). La toxicidad de la mayoría de las drogas está asociada con su conversión enzimática en metabolitos tóxicos.

En estudios realizados en perros, se determinó que el margen terapéutico seguro fue de 66.6-166.6 mg/m² y el margen terapéutico verdadero era de 20 a 50 mg/m². La dosis letal (DL) 99 reportada de Cas Igly en esta especie fue de 160 mg/m², mientras que la DL 50 era de 100 mg/m². Así, la DL 99 indujo la muerte de manera aguda causada por edema pulmonar sin infiltración leucocitaria luego de 30 a 50 min. No se han revelado datos de toxicidad cardíaca directa, sin embargo, la microscopía electrónica de transmisión revela daño mitocondrial en las células del miocardio (Leal *et al.*, 2006).

III. HIPÓTESIS.

El tratamiento con Casiopeína Igly produce regresión tumoral por apoptosis e inhibición de expresión de Cox-2 en carcinoma de células escamosas, sin generar efectos adversos que comprometan la salud del animal.

IV.OBJETIVO GENERAL

Evaluar la regresión del carcinoma de células escamosas y la presencia de efectos adversos en perros tratados con Casiopeína Igly.

4.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la existencia de alteraciones sistémicas en perros con CCE tratados con CasIgly.
2. Evaluar la infiltración de leucocitos intratumorales en perros con CCE tratados con CasIgly.
3. Determinar el fenómeno apoptótico por medio de la expresión de caspasa-3 en células de CCE antes y después del tratamiento con CasIgly.
4. Determinar la expresión de Cox-2 en células tumorales antes y después del tratamiento con CasIgly.

V. METODOLOGÍA

Todas las metodologías desarrolladas en este trabajo fueron autorizada por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales con número de registro 112FCN2019.

5.1 Población de estudio

El tamaño de la muestra correspondió a 7 perros con CCE.

Criterios de inclusión

- Caninos domésticos sin importar la raza, edad o sexo con diagnóstico positivo a CCE.
- Caninos cuyo dueño o tutor firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Caninos que presentaron una enfermedad viral y/o bacteriana sistémica.
- Caninos que presentaron alteraciones en los estudios de sangre sugestivos de alteraciones en el estado de salud no relacionados con un CCE.
- Animales cuyo estado de salud se encontró muy delicada lo que implicaba un periodo muy largo de recuperación.

Criterios de eliminación

- Animales cuyo tratamiento genere efectos secundarios adversos.
- Animales cuyo propietario decidiera retirarse del proyecto de investigación.

5.2 Toma de muestras

Para la evaluación del estado general de salud del paciente, se tomó sangre por venopunción de yugular para biometría hemática (fórmula roja y blanca) y bioquímica sanguínea (urea, creatinina, fósforo, alanino-aminotransferasa, fosfatasa alcalina, aspartato-aminotransferasa, albúmina, globulinas, glucosa y proteínas). Se recolectó orina por medio de cateterización para medir densidad urinaria. Para el proceso apoptótico se obtuvieron muestras de tejido tumoral mediante biopsia incisional para

buscar mediante inmunohistoquímica la caspasa-3. El sistema inmune se evaluó por corte histopatológico para conteo de leucocitos intratumorales y presencia de Cox-2 por inmunohistoquímica.

5.3 Administración de tratamientos

De manera aleatoria, los animales se dividieron en dos grupos de 3 y 4 perros cada uno. El grupo control (n=3) se trató con Cimicoxib y el grupo tratamiento (n=4) con Cas llgly.

Grupo cimicoxib

Antes de aplicar el tratamiento, se recolectaron 3 ml de sangre en un tubo con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se realizó una biopsia incisional de la masa tumoral, para diagnóstico por estudio histopatología, de aproximadamente 1 cm² que se conservó en formol al 10%. Cuatro días después de la toma de muestras, se midió el volumen tumoral (largo, ancho y profundo) para determinar el volumen inicial y se administró Cimicoxib por vía oral a dosis de 2 mg/kg de peso cada 24 h durante 3 días (Jiménez, 2017).

Durante la primera dosis de Cimicoxib se monitoreó al paciente 6 h después de la administración del fármaco. La administración de las dos dosis faltantes se realizó en el domicilio del paciente bajo la tutela del propietario.

El día posterior a la finalización del tratamiento, día 4, se realizó la evaluación final del paciente, se tomaron muestras de sangre y se midió el volumen tumoral. En los casos donde se apreciaba todavía la lesión del CCE, se procedió a realizar la remoción quirúrgica de la neoplasia para realizar el estudio histopatológico e inmunohistoquímica posterior al tratamiento. Este último procedimiento se realizó dentro de las instituciones antes mencionadas.

Grupo CasIlgly

Antes de iniciar con el tratamiento en los perros, se tomaron muestras de sangre y se realizó una biopsia incisional para diagnóstico. Cuatro días después, se midió el volumen tumoral y se administró la CasIlgly a dosis de 35 mg/m^2 en infusión intravenosa continua durante 120 min en solución glucosada al 5% (Figura 10) (Leal et al., 2006).



Figura 10. Preparación de CasIlgly antes de ser administrada en un paciente con CCE.

Se administraron tres dosis en total con un intervalo de tiempo entre cada una de ellas de 24 h. Posterior a la administración del fármaco, los perros se resguardaron en jaulas de acero inoxidable con fondo sanitario, donde se les proporcionó alimento y agua. Al cuarto día posterior al inicio del tratamiento (tres dosis), se citó a los pacientes para la evaluación final. En esta última evaluación se tomaron muestras de sangre, se midió el volumen de la neoplasia y en los casos donde se apreciaba todavía la lesión del CCE, se procedió a realizar la remoción quirúrgica de la neoplasia y recolectar muestra para posterior estudio histopatológico e inmunohistoquímica. Este último procedimiento se llevó a cabo en las instituciones médicas veterinarias con las cuales se colaboró.

5.4 Realización de histopatológicos e inmunohistoquímicas

En los tejidos para histopatología se procedió a la realización de la descripción del tejido y el corte macroscópico para la preparación del casete el cual se dejó fijando en formol al 10% durante 24 h. Para preparar los cortes en las laminillas se realizaron los siguientes pasos (Dey, 2018):

1. Se lavaron las muestras con agua común.
2. Se colocaron en alcohol al 96% en un recipiente sobre tapado y se colocaron en la estufa a 60 C° por 30 min.
3. Se pasaron a alcohol absoluto sobre tapados y se dejaron en la estufa a 60 C° por 30 min.
4. Se colocaron en acetona sobre tapados en la estufa a 60 C° por 30 min.
5. Se colocaron en xilol sobre tapados en la estufa a 60 C ° durante 30 min.
6. Se colocan en el centro de inclusión en parafina a 61.3 C° durante 1 hora.
7. Se colocó el tejido en el casete, se le agregó la parafina y se dejó endurecer en la platina fría.
8. Se realizaron los cortes con un Microtomo Finesse con un grosor de 3 micras, se extendieron los tejidos en el baño de inmersión a una temperatura de 32–35 C° y se recolectaron las muestras con la laminilla.
9. Posteriormente se colocaron en la platina caliente durante una hora y se procedió a teñirlas con hematoxilina-eosina.
10. Por último, se montaron las laminillas con resina.

Las histopatologías fueron realizadas para la obtención del diagnóstico de la neoplasia y el conteo leucocitario. El diagnóstico se realizó por medio de microscopía óptica y el conteo leucocitario por medio del software ImageJ versión 1.53e, aplicación basada en Java para analizar imágenes donde se determinó el promedio del área de porcentaje de linfocitos intratumorales (TILs) por muestra.

Los tejidos para inmunohistoquímica se fijaron con formol al 10% y se procesaron hasta la inclusión con parafina en el casete, tal y como se describe en la técnica para histopatología. Posteriormente se realizaron los cortes en un Microtomo Finesse 325 con un grosor de 3 micras, se extendió el tejido en el baño de inmersión Precision Scientific

water bath 180 a 32 C° y se recolectaron con laminillas electrocargadas (marca Adhesive Microscope Slides White Froseted Groud Edge). Las laminillas con las muestras se mantuvieron en la platina caliente durante una hora y se dejaron atemperar. Para dar inicio a la técnica se realizaron los siguientes pasos (modificado de Ahumada-Solorzano et al., 2014; Luna et al., 2016).

1. Las laminillas con el corte del tejido se desparafinaron colocándolas en posición inclinada en un horno a 80 C° durante 1 hora.
2. Se realizaron 2 baños de 15 min cada uno con Xilol en un vaso couplin.
3. Se, realizaron 2 baños de 2 min cada uno en alcohol al 100%, posteriormente al 95%, 80%, 70% y se enjuagaron con agua destilada.
4. El desenmascaramiento de epítomos se realizó, con citrato de sodio a 80°C por 20 min en un vaso couplin.
5. La permeabilización de la membrana se realizó colocando las laminillas en Tritón X100 durante 10 min en un vaso couplin.
6. La inactivación de peroxidasa endógena (relación 3:1 de metanol y peróxido de hidrógeno al 30%) durante 30 minutos en un vaso couplin.
7. Posteriormente se realizaron los bloqueos con suero de caballo al 5 % en TBS 1X por una hora, colocándolo sobre las laminillas dentro de la cámara húmeda.
8. Se aplicaron los anticuerpos primarios correspondientes a cada grupo: caspasa-3 (No. de Catálogo 3C119, Santa Cruz Biotechnology, Europa) y Cox-2 (No. de Catalogo 29, Santa Cruz Biotechnology, Europa) a una dilución 1:50 sobre las laminillas y se dejó en las laminillas toda la noche en la cámara húmeda.
9. Al otro día las preparaciones se lavaron con TPBS (PBS+Tris) y se aplicó el anticuerpo secundario (m-IgG x BP- HRP, No. de Catálogo sc-516102, Santa Cruz Biotechnology Europa) a una dilución 1:1000 durante 2 h sobre las laminillas, dejándolo actuar por 4 h.
10. Posteriormente las laminillas, se lavaron con TPBS y se revelaron con diaminobenzidina (DAB), se lavó con agua corriente y se contrasto con hematoxilina.
11. El exceso de agua se retiró con baños de alcoholes y xilol para la realización del montaje.

La evaluación de las inmunohistoquímicas (IHQ) fue realizada mediante el software ImageJ. Dicho análisis consistió en determinar el área de señal positiva en 15 imágenes tomadas de cada IHQ para posteriormente determinar un promedio y porcentaje de señal en cada muestra. En este análisis primero se guardó la escala de micras-pixeles en el programa ImageJ para determinar las áreas con esta unidad de medida. Posteriormente se configuró el programa para seleccionar el área que ocupaba determinado umbral de color el cual coincidía con el de la señal positiva de la IHQ.

5.5 Determinación del volumen tumoral

Se estableció midiendo el largo, ancho y profundizado del tumor antes y después del tratamiento. El volumen se determinó con la fórmula $(L)(A)(P)(\pi)/6$, y se estableció la diferencia del volumen antes y después del tratamiento (Scarpelli et al., 2010).

5.6 Medición de leucocitos intratumorales

Se tomaron 10 fotos de 10 campos escogidos aleatoriamente a lo largo de el parénquima tumoral del corte histológico en cada paciente, antes y después del tratamiento. Se analizaron con el programa ImageJ, donde se seleccionaron las zonas donde se encontraban los leucocitos mononucleares, para determinar el área en μm^2 , lo que correspondía al infiltrado de leucocitos mononucleares. Posteriormente se estableció un promedio por paciente antes del tratamiento y después de este. Por último, se determinó el porcentaje de TILs que correspondía a cada paciente.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics versión 25, haciendo un análisis para pruebas no paramétricas, con U de Mann-Whitney para muestras independientes y con una prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Tratamientos

Se evaluaron 7 perros, 4 para el grupo experimental tratado con Cas Ilgly y 3 para el grupo con Cimicoxib (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los pacientes que participaron en ambos grupos.

Perro	Raza	Edad (años)	Sexo	Peso (Kg) Pre/Pos tratamiento	Tratamiento	Dosis aplicada
4	Pitbull	7	Hembra	23.0 / 23.2	Casiopeína	35 mg/m ²
6	Schnauzer gigante	12	Hembra	52.0 / 53.5	Casiopeína	35 mg/m ²
7	Pitbull	5	Macho	25.1 / 23.0	Casiopeína	35 mg/m ²
9	Pitbull	8	Macho	19.8 / 18.9	Casiopeína	35 mg/m ²
1	Pitbull	5	Macho	21.4 / 21.2	Cimicoxib	2 mg/Kg
2	Pitbull	8	Macho	20.6 / 19.5	Cimicoxib	2 mg/Kg
8	Pitbull	8	Macho	36.4 / 38.2	Cimicoxib	2 mg/Kg

La mayoría de la población canina tratada corresponde a la raza Pitbull, con un intervalo de edad de 5 a 12 años, los cuales registraban diversos pesos y en cuanto al sexo, los machos se ven mayormente afectados. El 85% de los perros tratados, eran de color blanco y presentaban la neoplasia en la ingre, mientras que el otro paciente era un Schnauzer gigante color negro que presentaba la neoplasia en una de las falanges. Esto concuerda con lo reportado por Rodríguez (2001), Echeverry y Buriticá (2007), Silva et al. (2015) donde mencionan que la falta de melanina y pelo en la piel, los hace más susceptibles a los rayos UV con la consecuente transformación maligna de las células epiteliales. Por lo que los animales blancos presentan la neoplasia comúnmente a nivel de la ingre, mientras que en los animales negros predominan la presentación en las falanges.

6.2 Estado general de los pacientes antes de recibir tratamiento.

Se revisó el estado general de salud de los pacientes antes de administrar los medicamentos para comprobar que ambos grupos contaban con condiciones de salud estadísticamente similares. En la Tabla 3, se muestra el promedio por grupo, del valor de cada analito que tenía cada perro antes de la administración de los fármacos y se pudo concluir que no existe diferencia significativa entre los valores sanguíneos de los animales tratados, por lo tanto todos los animales entraron al proyecto con condiciones hematológicas similares.

Tabla 3. Comparación de resultados hematológicos entre ambos grupos previo al tratamiento.

Analito	Rango de referencia	Pre/Cas Ilgly	Pre/Cimalgex	Δ PreCas Ilgly vs PreControl	P Pre Casiigly vs Cimalgex
CTE	5.5-8.5	6.58	5.51	-0.16	1.00
Ht	0.37-0.55	0.45	0.42	-0.07	1.00
Hb	120-180	155.34	142.67	-0.08	1.00
CTL	6.0-17.0	8.60	15.68	0.82	1.00
Neutrófilos	3.0-11.5	6.55	12.65	0.93	1.00
Globulinas	23 - 39	40.40	45.00	0.11	1.00
Linfocitos	1.0-4.8	1.57	1.97	0.25	1.00
ALT	<70	24.60	28.33	0.15	1.00
AST	<55	26.40	23.33	-0.12	1.00
FA	<189	36.60	51.00	0.39	1.00
Albúmina	29 - 40	31.20	28.33	-0.09	1.00
Glucosa	3.4 - 6.9	5.28	5.03	-0.05	1.00
Proteínas	56 - 75	71.60	77.67	0.08	1.00
Urea	2.1 - 7.9	6.28	6.23	-0.01	1.00
Creatinina	<126	67.00	79.67	0.19	1.00
Fósforo	0.75 - 1.7	1.40	1.49	0.06	1.00
SG	1.015-1.045	1.04	1.04	-0.01	1.00

(CTE) conteo total eritrocitario, (HB) hemoglobina, (Ht) hematocrito, (CTL) conteo total leucocitario, (AST) aspartato aminotransferasa, (ALT) alanino aminotransferasa, (SG) Densidad urinaria. U de Mann-Whitney. $p < 0.05$. N= 7.

6.3 Alteraciones post-tratamiento encontradas en la Hematología.

En la Tabla 4 se muestra la significancia del cambio de cada analito después de los tratamientos verificada con un análisis de Wilcoxon para muestras relacionadas y entre las deltas de los dos tratamientos con una prueba de U de Mann-Whitney para el análisis de muestras independientes. Se muestran los valores hematológicos para evaluar función renal, hepática y estado general del paciente, donde apreciamos cómo los cambios observados entre los analitos pre y pos tratamiento no tuvieron cambios estadísticamente significativos con excepción de los neutrófilos, globulinas, linfocitos, AST y las proteínas totales del grupo experimental.

Tabla 4. Resultados de la hematología antes y después de los tratamientos

Analito	Rango de referencia	GRUPO CASIIGLY				GRUPO CONTROL				Δ%
		Pre	Pos	Δ	P	Pre	Pos	Δ	P	
CTE	5.5-8.5	6.58	5.86	-0.11	0.08	5.51	5.87	0.06	0.59	1.00
Ht	0.37-0.55	0.45	0.40	-0.11	0.10	0.42	0.40	-0.05	0.59	1.00
Hb	120-180	155.34	140.60	-0.09	0.23	142.67	136.67	-0.04	0.66	1.00
CTL	6.0-17.0	8.60	9.06	0.05	0.08	15.68	17.50	0.12	0.59	1.00
Neutrófilos	3.0-11.5	6.55	7.44	0.14	0.04	12.65	15.30	0.21	0.59	1.00
Globulinas	23 - 39	40.40	34.40	-0.15	0.04	45.00	38.33	-0.15	0.29	1.00
Linfocitos	1.0-4.8	1.57	0.98	-0.38	0.04	1.97	1.57	-0.20	0.29	1.00
ALT	<70	24.60	24.40	-0.01	1.00	28.33	40.00	0.41	0.59	1.00
AST	<55	26.40	23.40	-0.11	0.04	23.33	33.33	0.43	0.11	1.00
FA	<189	36.60	37.80	0.03	0.89	51.00	52.00	0.02	0.59	1.00
Albumina	29 - 40	31.20	29.80	-0.04	0.89	28.33	27.00	-0.05	0.41	1.00
Glucosa	3.4 - 6.9	5.28	5.66	0.07	0.89	5.03	17.70	2.52	0.66	1.00
Proteínas	56 - 75	71.60	64.20	-0.10	0.04	77.67	65.33	-0.16	0.11	1.00
Urea	2.1 - 7.9	6.28	6.22	-0.01	0.89	6.23	8.50	0.36	0.29	1.00
Creatinina	<126	67.00	80.40	0.20	0.14	79.67	76.67	-0.04	0.59	1.00
Fosforo	0.75 - 1.7	1.40	1.77	0.26	0.50	1.49	1.41	-0.05	0.66	1.00
SG	1.015-1.045	1.04	1.10	0.05	0.14	1.04	1.04	0.00	1.00	1.00

(CTE) conteo total eritrocitario, (HB) hemoglobina, (Ht) hematocrito, (CTL) conteo total leucocitario, (AST) aspartato aminotransferasa, (ALT) alanino aminotransferasa, (SG) Densidad urinaria. U de Mann-Whitney. $p < 0.05$. N= 7.

Los neutrófilos, globulinas, AST y las proteínas totales se mantienen dentro de los rangos de referencia de acuerdo a la especie, por lo que podemos inferir que clínicamente no tiene relevancia.

En el caso de los linfocitos el promedio post- tratamiento es menor al rango inferior de referencia.

En un estudio realizado por Dufau (2009) a pacientes con diferentes tipos de enfermedades oncológicas, se encontró que el 63.6% de los pacientes presentaban linfopenia asociada a desnutrición.

El comportamiento de los linfocitos en caninos tratados con Cas no se ha estudiado con profundidad anteriormente, sin embargo, en un estudio realizado en ratas tratadas con Casiopeína III-Ea por Vertiz et al., (2012), se observó una disminución de linfocitos en sangre 8h después de la administración del tratamiento, volviendo a aumentar a las 48 h. La sangre para realizar la BH del grupo control post tratamiento, fue tomada 24 h después de la última administración de Cas Ilgly, lo que podría ser la causa de la linfopenia encontrada.

La linfopenia por estrés es un hallazgo muy común, donde se observa disminución de los linfocitos como resultado de liberación de la hormona cortisol por parte de las glándulas suprarrenales en respuesta a estrés por enfermedades sistémicas importantes, alteraciones metabólicas, dolor o enfermedad inflamatoria. Los esteroides pueden inducir la apoptosis en los linfocitos alterando los valores de estos en circulación (Dhabhar et al., 2010; Thrall et al., 2012). Debido a que la mayoría de los pacientes se someten a varios de estos factores, como estrés por el manejo o inflamación crónica secundaria al tumor, se pueden desencadenar estos fenómenos fisiológicos. Por estos motivos, la linfopenia se atribuye principalmente a una respuesta por estrés. Para hacer un análisis completo sobre la causa de linfopenia se sugiere la realización de una punción de medula ósea para hacer una evaluación completa de las células precursoras. Determinar si la linfopenia es causada por una fibrosis secundaria al tratamiento con Cas Ilgly. También se puede realizar una medición de cortisol sérico para determinar si la disminución de linfocitos es una respuesta al estrés (Thrall et al., 2012).

Al comparar ambos grupos, se pudo concluir que no existe diferencia significativa entre ellos, por lo que concluimos que en ninguno de los dos tratamientos se muestran alteraciones hematológicas.

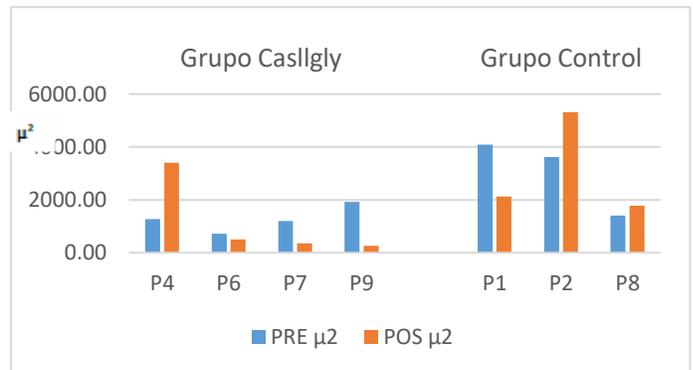
6.4 Evaluación de linfocitos intratumorales (TILs).

El análisis del infiltrado linfocítico intratumoral se realizó de acuerdo a las recomendaciones para la valoración del infiltrado linfocítico intratumoral (TILs), del acuerdo al International TILs Working Group 2014, tal y como lo recomienda el Consenso Mexicano sobre el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario y se extrapoló al CCE (Gutiérrez, 2019; Amat et al., 2018; Vivacqua et al., 2019).

Tabla 5. Porcentaje de TILs por paciente antes y después del tratamiento.

PACIENTE	PRE-TRATAMIENTO	POS-TRATAMIENTO
GRUPO EXPERIMENTAL	μ2	μ2
P4	1268.92	3398.78
P6	715.19	506.91
P7	1205.16	355.39
P9	1920.11	260.80
GRUPO CONTROL		
P1	4091.65	2124.17
P2	3621.85	5321.55
P8	1408.25	1776.28

Gráfica 1. Valores de TILs por paciente antes y después del tratamiento.



En la Tabla 5 y la Gráfica 1, se muestra el promedio del área en micras cuadradas (μ^2), ocupada por linfocitos intratumorales por cada paciente. En éste podemos observar que para el caso del grupo con Cas gllly solo el 25% de los pacientes tuvieron un aumento del porcentaje de TILs; mientras que en el grupo control tratado con Cimicoxib incrementó en un 66.6% .

En el análisis estadístico realizado para la evaluación de TILs (Tabla 6), se puede observar que el porcentaje inicial de TILs del grupo experimental disminuyó después del tratamiento, mientras que en el caso del grupo control este porcentaje aumentó, lo cual se considera favorable para el pronóstico del paciente.

Tabla 6. Análisis estadístico para la evaluación de TILs.

Análisis de TILs													
Variable	Grupo Cas Igly						Grupo Control						Δ%
	Área μ ² PRE	% TILs	Área μ ² POS	%TILs	Área μ ² Δ	p	Área μ ² PRE	% TILs	Área μ ² POS	%TILs	Área μ ² Δ	p	
Conteo de Linfocitos	1277.346	3.81	1130.472	3.38	-0.1149	0.715	3040.58	9.092	3074	9.1927	0.0109	1.00	1.00

(PRE) Pretratamiento, (POS) Postratamiento, (Δ) Delta, (μ²) micras cuadradas, (P) significancia. Prueba de Wilcoxon y U de Mann-Whitney. $p < 0.05$. N=7

Vivacqua et al. (2019), mencionan que, en un experimento realizado en pacientes con cáncer de mama triple negativo, en los que se administró un tratamiento quimioterapéutico neoadyuvante, se observó una respuesta patológica completa después del tratamiento en los pacientes que presentaban un porcentaje de TIL's mayor, antes de la administración del fármaco.

Cho (2003) y colaboradores, en un trabajo realizado en carcinoma epidermoide esofágico, donde evaluaron la expresión de LTCD4+ y CD8+ intratumoral, relacionaron la presencia de estos linfocitos con un mejor pronóstico, concluyendo que los LTCD8+ pueden lisar células tumorales completas y su infiltrado es importante para la respuesta inmune contra las células tumorales.

Por otro lado, Chen (2020) con su grupo de trabajo, diferenciaron subpoblaciones de linfocitos T infiltrados en carcinomas de células escamosas orales para determinar los tipos de tratamiento dependiendo de las células inmunitarias encontradas en el microambiente tumoral. Así, identificaron 14 subpoblaciones distintas de células T dentro de los tumores y 5 en tejidos normales adyacentes al tumor. Entre estas subpoblaciones encontraron marcadores como TOX (proteína de caja de grupo de alta movilidad de timo) el cual es un factor que se une al ADN que regula la transición de CD4+ y CD8+ durante la selección positiva de células T), PDCD1+ (Inhibidor del punto de control inmunitario), CTLA 4 (identificado como marcador de Tregs CD4+ y T CD8+ agotados), PD-1 (proteína de muerte celular programada). Este grupo de trabajo determino que la presencia de LTreg CD3+ y LTCD28+ median la evolución de LTCD8+ y LTCD4+ a la inmunosupresión.

En un estudio realizado por Pascalau (2021) y colaboradores mencionan que el pronóstico de una neoplasia no se relaciona con una subclase en específico, más bien, con las proporciones de estas subclases. Ellos mencionan que en carcinoma de colon y recto una relación CD8+/Treg aumentada, reduce la tasa de mortalidad en un 70%; mientras que linfocitos pertenecientes a poblaciones de CD4+, Foxp3 y Treg favorecen el desarrollo y progresión tumoral.

Sin embargo, en ambos grupos el cambio en el porcentaje de TILs no tiene significancia estadística, lo cual se puede deber al número de pacientes tratados.

Considerando estos puntos el aumento de TIL's después del tratamiento se podría describir como favorable para el pronóstico del paciente; sin embargo, sería indispensable definir el tipo de linfocitos y sus subclases que se encuentran infiltradas entre las células tumorales y su microambiente para poder definir de manera más precisa el pronóstico del paciente.

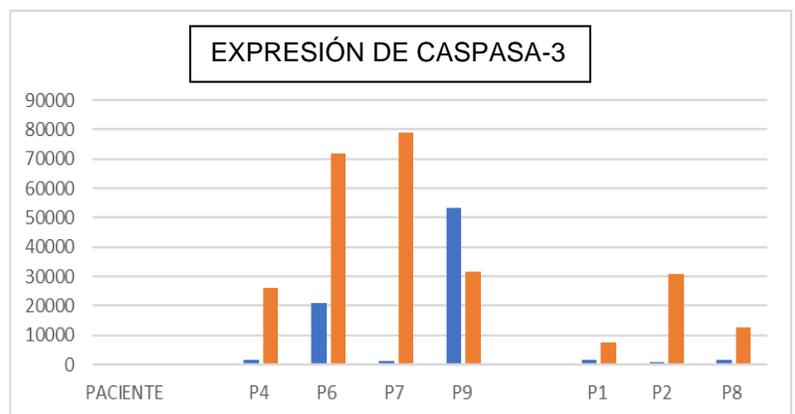
6.5 Evaluación del porcentaje de Apoptosis y expresión de Cox-2

En las Tablas 7 y 8, se observan los resultados del área en micras cuadradas (μ^2) que presentaban señal positiva en el análisis de las IHQ por paciente. En las Gráficas 2 y 3 se puede observar la diferencia del área en μ^2 entre la expresión de caspasa-3 y Cox 2 antes y después del tratamiento.

Tabla 7. Expresión de caspasa-3 por paciente antes y después del tratamiento.

PROMEDIOS CASPASA-3		
PACIENTE	PRE-TRATAMIENTO	POS-TRATAMIENTO
GPO CASIIGLY	μ^2	μ^2
P4	1717.33	26007.09
P6	20996.69	71839.22
P7	1032.37	78884.53
P9	53212.54	31542.15
GRUPO CONTROL		
P1	1717.33	7300.93
P2	762.697	30756.95
P8	1474.91	12642.71

Gráfica 2. Expresión de caspasa-3 por paciente antes y después del tratamiento.

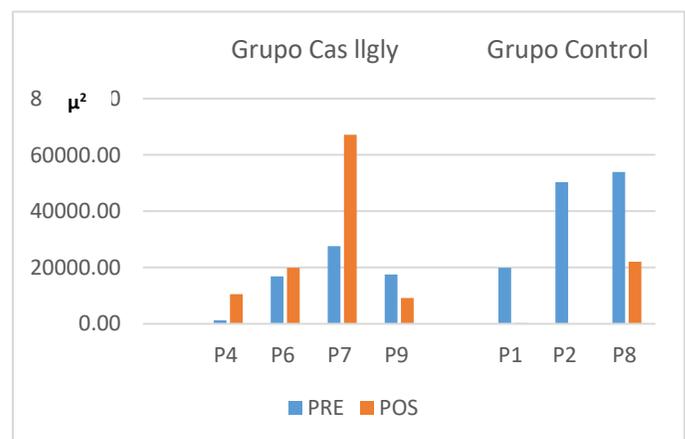


En el caso de la expresión de caspasa-3 (Tabla 7), el 75% de los pacientes del grupo experimental presentó aumento de su expresión, mientras que en el grupo control todos los pacientes presentaron este incremento. En la expresión de Cox-2 (Tabla 8), el 75% de los pacientes tratados con Cas Ilgly no presentaron disminución de esta enzima, mientras que el 100% de los animales tratados con Cimicoxib tuvieron reducción de la expresión de la misma.

Tabla 8. Expresión de Cox-2 por paciente antes y después del tratamiento.

PROMEDIOS COX 2		
PACIENTE	PRE-TRATAMIENTO	POS - TRATAMIENTO
GPO CASIIGLY		
	μ^2	μ^2
P4	1240.28	10488.88
P6	16911.70	19870.65
P7	27560.77	67160.27
P9	17571.93	9222.06
GRUPO CONTROL		
P1	19957.51	243.77
P2	50338.56	42.10
P8	53935.00	22091.00

Gráfica 3. Expresión de Cox-2 por paciente antes y después del tratamiento.



En la Tabla 9 se puede observar que, en el caso del grupo experimental después del tratamiento, se encontró un aumento de 2.4 veces el valor inicial de la expresión de caspasa-3 y un aumento de 1.6 veces el valor inicial de Cox-2. En el grupo control se evidenció un aumento de más de 13 veces el valor inicial en la expresión de caspasa-3 y una disminución de un 82% de la expresión de Cox-2. En ambos grupos, la diferencia entre los resultados pre-tratamiento y post-tratamiento y entre los dos grupos, no es estadísticamente significativo. A pesar de esto, el grupo de Cas Ilgly tuvo un aumento de la expresión de Cox-2 en la mayoría de los pacientes, lo que no es favorable para el pronóstico.

Tabla 9. Análisis estadístico para la expresión de caspasa-3 y Cox 2.

Variable	Grupo Cas Ilgly						Grupo Control						Δ%
	Área μ2 PRE	% Positividad PRE	Área μ2 POST	% Positividad POST	Área μ2 Δ	p	Área μ2 PRE	% Positividad PRE	Área μ2 POST	% Positividad POST	Área μ2 Δ	p	
CAS 3	19239.73	2.56	52068.24	6.95	1.70	0.144	1318.31	0.17	16900.20	2.25	11.81	0.109	1.00
COX 2	15821.17	2.11	26685.46	3.56	0.68	0.273	41410.35	5.53	7458.95	0.99	-0.81	0.109	1.00

(PRE) Pretratamiento, (POST) Postratamiento, (Δ) Delta, (μ2) micras cuadradas, (P) significancia. Prueba de Wilcoxon y U de Mann-Whitney. $p < 0.05$.

N=7

En el estudio realizado por Zhang et al. (2006), hablan sobre la relación negativa que existe entre la expresión de caspasa-3 y Cox-2. Evaluaron la presencia de caspasa-3 y Cox-2 por medio de Inmunohistoquímica y Western Blot y encontraron que en las muestras donde se expresaba más caspasa-3, la expresión de Cox-2 era menor y a la inversa.

En un estudio realizado por Pestili et al. (2001), se encontró que la expresión de Cox-2 era mayor en queratinocitos neoplásicos que en los sanos. En esta misma investigación también se menciona que en investigaciones recientes se ha demostrado que *TP53* causa una marcada disminución en la expresión de Cox-2 en fibroblastos de ratón y que la radiación de rayos UVB en la piel de los ratones induce mutaciones del gen. Este grupo de trabajo también indica que el uso de inhibidores específicos de Cox-2 reduce el desarrollo de tumores inducidos por radiación UV de piel en ratones sin pelo.

En una revisión bibliográfica realizada por Shaker et al. (2018), se menciona como los agentes inflamatorios contribuyen a promover la carcinogénesis de los carcinomas orales debido a que la inflamación crónica promueve la presencia de mediadores inflamatorios como Cox-2/PGE2 que apoyan la incidencia, progresión e invasión de los tumores.

Díaz et al. (2009) mencionan que la sobreexpresión de Cox-2 produce inhibición de apoptosis y promueve la mitogénesis por la producción de prostaglandina y la actividad peroxidasa de Cox-2. Por otro lado, Eunice et al. (2012) asociaron la sobre-expresión de Cox-2 con la gravedad de la enfermedad y un periodo de supervivencia más corto.

Cox 2 utiliza al ácido araquidónico (AA) para formar prostanoideos como la prostaglandina (PG) el cual es un mediador biológico esencial del proceso de inflamación y como se mencionó anteriormente la sobreexpresión de ésta promueve la carcinogénesis de los queratinocitos. Por este motivo se sugiere que los pacientes del grupo control tratados con Cimicoxib presentaron mayor expresión de caspasa-3 y menor de Cox-2, lo que concuerda con la revisión previamente descrita por Zhang et al. (2006), Díaz et al. (2009), Eunice et al. (2012), Shaker et al. (2018). Moon et al. (2020).

6.6 Volumen tumoral

Se realizó el registro de los volúmenes tumorales antes y después de la administración de los tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Volumen tumoral antes y después del tratamiento de cada grupo.

Paciente	Tratamiento	Longitud	Ancho	Profundidad	Volumen Tumoral (cm ³) (L*A*P*Pi/6)
Grupo experimental					
P4	Pre	1.3	1.3	0.2	0.18
	Pos	1	1	0.1	0.05
P6	Pre	2	1.3	0.1	0.14
	Pos	1.5	1	0.1	0.08
P7	Pre	4	4	0.1	0.84
	Pos	4	3.5	0.1	0.73
P9	Pre	2.4	2.3	0.1	0.29
	Pos	2.6	2.2	0.1	0.30
Grupo control					
P1	Pre	8.3	7.6	2.5	82.57
	Pos	8.1	5.9	1.5	37.53
P2	Pre	6.5	4.5	2	30.63
	Pos	6.2	4.3	1.5	20.94
P8	Pre	3.8	3.7	1.7	12.52
	Pos	3.8	3.6	1.6	11.46

(L) Largo, (A) Ancho, (P) Profundo, (Pi) 3.1416. $p < 0.05$. N= 7.

En la Tabla 11 se muestra el cambio del volumen tumoral antes y después del tratamiento, así como el análisis entre ambos grupos utilizando un análisis de Wilcoxon para muestras relacionadas y prueba de U de Mann-Whitney. $p < 0.05$. $N = 7$.

En ambos grupos hubo disminución del volumen tumoral; sin embargo, la disminución fue más evidente en el tratamiento control que en el grupo experimental. Este hallazgo se puede relacionar con el evidente aumento de la expresión de caspasa-3. Al determinar el valor de P para las Deltas de ambos grupos, se determinó que estadísticamente no había significancia (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico del volumen tumoral entre ambos grupos.

	Vol. Pre-tratamiento(cm3)	Vol. Pos-tratamiento (cm ³)	p	Δ	$P \Delta$ Casllgly vs Cimicoxib
Cas llgly	0.36	0.33	0.686	-0.08	1.00
Cimicoxib	41.91	23.31	0.11	-0.44	

(p) Significancia, (Δ) Delta. $p < 0.05$. $N = 7$.

Por otra parte, haciendo una clasificación del Grado de regresión de RECIST ambos grupos se clasifican como Enfermedad estable (SD). Sin embargo, en ambos grupos se observó una disminución del tamaño de la lesión y un aumento del porcentaje de expresión de caspasa-3 por lo que se puede determinar que sí presentaron regresión. De igual manera también se puede identificar la relación negativa que se observa entre la expresión de caspasa-3 y Cox-2. Con este análisis se comprobó que el tratamiento con Casiopeínas promueve la apoptosis de queratinocitos neoplásicos. Sin embargo no tiene un efecto en Cox-2, mientras que el tratamiento con Cimicoxib si promueve la expresión de caspasa- 3 e inhibe la expresión de Cox 2.

Dados los resultados obtenidos, se podría indagar en el uso de ambos tratamientos de manera sinérgica ya que ambos actúan de manera diferente al promover la regresión tumoral en CCE.

VII. CONCLUSIONES

En la evaluación hematológica de los pacientes de ambos grupos, se demostró que los animales del grupo experimental tienden a presentar linfopenia. Sin embargo, las diferencias observadas en los resultados del hemograma y química sanguínea entre ambos grupos, no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Clínicamente no se observó que la aplicación de tres dosis cada 24 h de Cas Igly a dosis de 35 mg/m², tengan un efecto dañino en la función renal, hepática, ni el estado hematológico del paciente.

Los resultados de los estudios de hemograma y química sanguínea entre ambos grupos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de la evaluación del porcentaje de TILs se concluyó que el grupo experimental no presentó aumento, mientras que en el grupo control tratado con Cimicoxib sí se observó un incremento.

En el análisis de los resultados de IHQ, se puede concluir que en el caso del grupo de Cas Igly se encontró un incremento en la tasa de apoptosis en los queratinocitos neoplásicos. Sin embargo, el efecto en la expresión de Cox 2 no está del todo claro ya que en más de la mitad de los pacientes no se observó disminución de su expresión.

Por otra parte, en los pacientes del grupo control tratados con Cimicoxib se determinó un mayor aumento en el porcentaje de expresión de caspasa-3, que en el grupo experimental y una disminución marcada en la expresión de Cox-2.

En los resultados de la evaluación del volumen tumoral se observó una disminución más evidente de la masa tumoral en el grupo control. En este grupo, se identificó un aumento de 13 veces más el valor inicial en la expresión de caspasa 3 y disminución de la expresión de Cox 2, lo cual junto con el resultado del volumen tumoral indica que existe cierto grado de regresión tumoral.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Aylas G. M. K. (2017). Valor pronóstico de la sobre-expresión de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) en el carcinoma epidermoide localmente avanzado de cérvix. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Pp. 43-80.

Alemón-Medina R., Muñoz-Sánchez J. L., Ruiz-Azuara L. y Garcia-Mora I. (2007). Casiopeína Ilgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in Vitro*. 22: 710-715.

Amat M., Mandó P., Ostinelli A., Manglio R., Pérez de la Puente C., Constanzo M. V., Nervo A., Nadal J., García S. X., Cappuccio M. F., Coló F. Loza M., Loza J., Fabiano v., Ponce C., Chacón R. Los linfocitos estromales intratumorales (tils) como factor pronóstico en tumores primarios de mama Triple Negativos. *Rev. Argent. Mastología*. 37(134):69-79.

Bacha W. J., Bacha L. M. (2001). Atlas a color de Histología Veterinaria. 2 Ed. Buenos Aires, República Argentina. Editorial Inter-médica. Pp 88.

Balkwill F. (2004). Cáncer y la red de quimiocinas. *Nat Rev Cancer*. (4):540-550.

Banks W. J. (1986). Histología Veterinaria Aplicada. 2 Ed. México, D.F. Editorial El Manuel Moderno. Pp 63-71.

Batista D. A. (2003). Función del Sistema Immune en la Defensa Contra Tumores Malignos. *MEDISAN*. 7 (2):75-88.

- Belluco S., Brisebard E., Watrelot D., Pillet E., Marchal T., Ponce F. (2013). Digital Squamous Cell Carcinoma in Dogs: Epidemiological, Histological and Immunohistochemistry Study. VET. 50 (6): 1078-1082.
- Campos M. R. (2019). Evaluación de la actividad del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial mediante el silenciamiento de Bax y Bcl-2 en células de neuroblastoma tratadas con Casiopeína® Illia. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp 12-20.
- Castellanos G. C. (2005). Estructura histológica normal de la piel del perro (estado del arte). Rev. Med. Vet. 1 (10): 109-122.
- Cañas A. R. C., Noriega F. I., Ruiz- Azuara L. (2010). Pharmacokinetics of Casiopeína Ilgly in beagle dog: A copper-based compound with antineoplastic activity. Journal of Bioanalysis y Biomedicine. 2: 1-7.
- Cornejo U. R. (2011). El factor de crecimiento epidérmico y la diferenciación celular del epitelio mamario. Int. J. Morphol. 29 (3): 821-824.
- Cowell R. L., Meinkoth J. H., Tyler R. D., DeNicola D. B. (2009). Diagnóstico Citológico Hematológico del perro y el gato. 3 Ed. España, S. L. Elsevier. Pp 101.
- Chen J., Yang J., Li H., Yang Z., Zhang X., Li X., Wang J., Zhang Y., Chen S., Song M. (2021). Single-cell transcriptomics reveal the intratumoral landscape of infiltrated T-cell subpopulations in oral squamous cell carcinoma. Molecular Oncology 15 (2021): 866–886.
- Chimenos K. E., Font C. I., López L. J. (2004). Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. Med. oral patol. oral cir. Bucal. 9 (5): 1698-4447.
- Cho Y., Miyamoto M., Kato K., Fukunaga A., Shichinohe T., Kawarada T., Hida Y., Oshikiri

T., Kurokawa T., Suzuoki M., Nakakubo Y., Hiraoka K., Murakami S., Shinohara T., Itoh T., Okushiba S., Kondo S., Katoh H. (2003). CD4+ and CD8+ T Cells Cooperate to Improve Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. AACR. 63: 1555–1559.

De Buen de Argüero, N. (2014). Atlas de Citopatología Veterinaria. Ed 2. Intermédica. México. Pp. 127.

Dey P. (2018). Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. 1ed. Springer. Chandigarh, India. Pp. 19-27.

Dhabhar F. S., Saul A. N., Daugherty C., Holmes T. H., Bouley D. M., Oberyszyn T. M. (2010). Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma. Behav Immun Health. 24: 127–137.

Díaz, M. L. N. (1997). Apoptosis y Piel. Dermatología Venezolana. 35(3).

Díaz L. A. M. (2003). Estudio genotípico del Citocromo P450 en una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón en el área sanitaria de Mérida. Tesis de doctorado. Universidad de Extremadura. Pp. 52-54.

Díaz P. S., Gallego G. A., López C. L., Granado F. J., Antón A. L. (2009). La ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en lesiones epiteliales orales premalignas. Rev. Esp. Cir. Oral Maxilofac. 31(3):170-181.

Dufau L. (2009). Prevalencia de desnutrición en pacientes oncológicos. Diaeta. 28(130): 1852-7337.

Echeverry B. D. F., Buriticá G. D. E. F. (2007). Carcinoma de Células Escamosas en un paciente Canino. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2(1): 29-33.

Eisenhauer E. A., Therasse P., Bogaerts J., Schwartz L. H. Sargent D., Ford R., Dancey J., Arbuck S., Gwyther S., Mooney M., Rubinstein L., Shankar L., Dodd L., Kaplan R., Lacombe D., Verweij J. (2009). New response evaluation criterion in solid tumours: Revised RECIST guideline (versión 1.1). *European Journal of Cancer*. 45: 228-247.

Elinos-Báez C. E., Maldonado V., Meléndez Z. J. 2003. Caspasas: Moléculas inductoras de apoptosis. *Rev. Gac Med Mex*. 139 (5): 493-499.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516. Citado por: Martínez S. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 11 (2): 152-156.

Eunice L. G., Bonolo C. C., Cavalheiro B. A., Dantas C. G. (2012). Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. *In vivo* 26: 375-380.

Godínez L. Y., García M. J., Rojas M. D., Hernández A. L. F., Reina M., Ortiz F. L. A., Rascón V. L. A., Robles Z. R. E., Gómez V.V., Bernard B. M.J., Ruiz A. L. (2022). Casiopeinas® third generation, with indomethacin: synthesis, characterization, DFT studies, antiproliferative activity, and nanoencapsulation. *RSC Adv*. 12: 21662–21673.

Gómez O. S. (2017). Valor pronóstico del antígeno del carcinoma de células escamosas en los pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado tratadas con radioquimioterapia. Tesis de doctorado. Universidad Complutense De Madrid.

González G. E. (2013). Marcadores tumorales en dermatología. *Más Dermatol*. (20): 4-11.

Gutiérrez M., Hellmann M., Gubens M., Aggarwal C., Tan D., Felip E., Lam W., Chiu J.W.Y., Lee J., Yang J., Garon E., Basso A., Ma H., Fong L., Snyder A., Yuan J., Herbst R. (2019). *Revista de oncología torácica*.14(10):403.

Gutiérrez R. A., Vázquez A. A., García R. J. C., Flores A. M., Hernández L. E., Ruíz A. L. Mejía C. (2013). Copper (II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem*. 126: 17-25.

Hermida L. I., Sánchez T. E, Nerín S. C., Cordero B. R., Mora E. I. Pinar S. J. (2016). Marcadores Tumorales. *REV CLÍN MED FAM*. 9 (1): 31-42.

Hernández L. E., Gutiérrez A. G., Vázquez A. A., Palma T. M. L., Ruiz-Azuara L., Mejía C. (2013). Neuroblastoma. Capítulo 7: Analysis of apoptotic and autophagic pathways in Neuroblastoma by Treatment with Copper Compounds. Ed1. In Tech. Croacia. Pp 145-158.

Jiménez G. L. (2017). Breve reseña del Cimicoxib en Medicina Veterinaria. *Vanguardia Veterinaria*. 83: 75-80.

Johnson A., Iffland M. L., Northcote S. J., Singh K., Ortu F., Apfel U. P., Suntharalingam K. (2022). A bioinspired redox-modulating copper(II)–macrocyclic complex bearing non-steroidal anti-inflammatory drugs with anti-cancer stem cell activity. *Dalton Trans*. 51: 5904-5912.

Kachadourian R., Brechbuhl H. M., Ruiz-Azuara L., Garcia-Mora I., Day B. J. (2009). Casiopeína II-gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*. 268:176 -183.

- Lascelles, B.D., Parry, A.T., Stidworthy, M.F., Dobson, J.M. & White, R.A. (2000) Squamous cell carcinoma of the nasal plane in 17 dogs. *Vet. Rec.* 147 (17): 473–476.
- Leahy K. M., Ornberg R. L., Wang Y., Zweifel B. S., Koki A. T., Masferrer J. L. (2002). Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo. *Advances in Brief.* 62 (3): 625–631.
- Leal G. M., García O. L., Ruiz A. L., Gracia M. I., Luna D. V. J., Sumano H. (2006). Assessment of Acute Respiratory and Cardiovascular Toxicity of Casiopeinas in Anaesthetized Dogs. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 101: 151-158.
- Lopez R. A., Cárabez- T. A., Rosas S. F., Mejía C., Ruiz A. L., Miledi R., Martínez T. A. (2011). *Biometals.* 24:1189-1196.
- Lowe S. W., Lin A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11 (2): 152-166.
- Macedo M. A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces Cerevisiae*. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 15 (2):97-103.
- Marín H. A., Gallardo P. J. C., López R. S.Y., García G. J. D., Rodríguez Z. J. S., Ruíz R. L., Garcia M. I., Zentella D. A., Sosa G. M., Macias S. M., Moreno S. R., Rodríguez E. S. (2012). Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol.* 86: 753-766.
- Martínez S. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11 (2) 152-166.

Megías M., Molist P., Pombal M. A. (2020). Tejidos Animales Epitelios de Revestimiento. 1 Ed. Universidad de Vigo. Pp 2-7.

Mejía C., Ruiz OA. L. (2008). Casiopeinas Ilgly and Illia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol. Oncol. Res.*14:467–472

Mestrinho A. L. (2018). Current Status and Future Perspectives in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Pathol.* 55 (2): 200-201.

Meuten D. J. (2020). Tumors in domestic animals. 1 Ed. John Wiley y Sons. Pp 250.

Moon H, M White A. C., Borowsky A. D. (2020). New insights into the functions of Cox-2 in skin and esophageal malignancies. *Experimental & Molecular Medicine.* 52:538-547.

Navarrete F. G. (2003). Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM.* 46(4): 130-132.

Nishino M., Jagannathan J. P., Ramaiya N. H., Van den Abbeele A. D. (2010). Revised RECIST Guideline Version 1.1: What Oncologists Want to Know and What Radiologists Need to Know. *AJR.* 195:281–289.

Owen J. A., Punt J., Stranford S. A. (2014). Kuby Inmunología. 7 Ed. Mc. Graw Hill. Mexico D.F. Pp. 318-321.

Pardo G. A., Hernández C. P. y Delgado H. R. (2005). La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Rev cubana med.* 44: 1-2.

Pascalau A. V., Cheregi C. D., Muresan M. S., Sandor M. I., Huniadi C. A., Nikin Z., Judea P. C. T., Bodog F. D., Ionescu C., Pop O. L. (2021). CD4+ CD25+ regulatory T-cell role in tumor microenvironment of the squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 62(1):249–253.

Pérez M. J. (2002). Histología Veterinaria. 1 Ed. Sucursal del Socorro en Tecnología Veterinaria y en la Unipaz en Barrancabermeja. Pp. 8 – 20.

Pestili A. E. M., Piché C. Sirois J., Monique D. (2001). Expression of Cyclo-oxygenase-2 in Naturally Occurring Squamous Cell Carcinomas in Dogs. *J Histochem Cytochem.* 49 (7): 867–875.

Rodríguez G. R., Hechavarría M. J. H., Azze P. M. A. (2001). Cáncer de piel y ocupación. *Rev Cubana Med.* 40 (4): 66-72.

Raskin R. E., Meyer D. J. (2016). *Canine and Feline Cytology.* 3 Ed. SL. Louis, Missouri Elsevier. Pp. 55-57.

Roseto A., Brenner C. (1999). Apoptosis o la muerte celular programada. *Arch. Argent. Pediatr.* 97(4): 253-255.

Ruiz-Azuara, L. United States Patent **1992**, vol. RE 35, 458.

Ruiz-Azuara, L. United States Patent **1996**, vol 5, 576, 326.

Ruiz-Azuara, L. Mark Tittle Casiopeína, Reg. 407543 SECOFI, **1992,2002**.

Sánchez C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Rev. Med. Clin. Condes.* 24 (4):553-562.

Sánchez de Molina R. M. L. (2018). Factores predictores del grado de regresión tumoral en los tumores gástricos localmente avanzados. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

- Santibáñez N., Fernández A., Fernández J., Martínez R., Fawaz J. P., Olate S., Haidar Z. (2017). Immunoexpression of E-cadherin and vimentin in normal oral mucosa, Oral Epitelial Displasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Morphol.* 35 (2):596-602.
- Scarpelli K. C., Valladao, M. L., Metze K. (2010). Predictive factors for the regression of canine transmissible venereal tumor during vincristine therapy. *The Veterinary Journal.* 183: 362–363.
- Shaker N. W. H., Rodríguez L. J. C., Martin C. K. (2018). Role of COX-2/PGE2 Mediated Inflammation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers.* 10:348.
- Silva H. 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). *RC FCV.* 25 (4): 304-310.
- Thrall, M. A., Weiser G., Allison R. W. y Campgell T. W. *Veterinary Hematology and clinical Chemistry.* WILEY- BLACKWELL. SECOND EDITION. EU.2012.
- Trejo S. C., Palencia G., Zúñiga S., Rodríguez R. A., Osorio R. L., Sánchez T. L., Garcia M. I., Marquez R. L., Sánchez A., Moreno G. M. E., Cruz A., Bravo G. M. E., Ruiz R. L., Rodríguez E. S. y Sotelo J. (2005). Cas Ilgly induces Apoptosis in Glioma C6 Cells in vitro and in vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia.* (7)6: 563-574.
- Trigo T.F.J., Aburto F. E.M., Candanosa A. I.E., Constantino C. F., De Buen A. N., Martínez B. J., Mateos P. A., Morales S. E., Ramírez L. J., Schunemann A. A., Valero E. G., Vanda C.B. (2011). *Patología Sistémica Veterinaria.* 5 Ed. México, D. F..McGraw-Hill Interamericana Editores. Pp. 263-267.

- Trigo, F., Valero, G., López, A., Martínez, L., Martínez, I., Romero, L., Salas, G., y Vanda, B. (2017). En *Patología General Veterinaria*. 4 Ed. México, D. F..McGraw-Hill Interamericana Editores. Pp. 137.
- Vega R. A. (2005). Bases moleculares de la inflamación: regulación de la expresión del óxido nítrico sintasa inducible, la ciclooxigenasa-2 y de la activación del factor nuclear de células T activadas en células fagocíticas. Facultad de medicina, Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla.
- Vera M. K. M., Guerrero C. M. J. (2018). *Prácticas de laboratorio: Histología Veterinaria. Laboratorio de Histopatología. Facultad de Ciencias Naturales, Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Querétaro. Manual de Prácticas. Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia Presenta: Karla Magdalena Vera Mendoza. Dirigido por: M. en C. María de Jesús Guerrero Carrillo. Pp.*
- Vertiz G., García O. L. E., Bernal J. P., Bravo G. M. E., Lounejeva E., Huerta A., Ruiz-Azuara L. (2012). Farmacocinética y hematotoxicidad de un nuevo agente anticancerígeno a base de cobre: casiopeina III-Ea, después de una dosis intravenosa en ratas. *Fundam Clin Pharmacol*. 28(1): 78-87.
- Vivacqua M., Hobaica N., Méndez O. V., Valenzuela D., Castelletto E., Fernández A., Terrier F., Barbera L. A. (2019). La infiltración linfocitaria (TILS) como factor pronóstico en pacientes con cáncer de mama Triple Negativo que realizan quimioterapia neoadyuvante. *Revista Argentina de Mastología*. 38(140): 34-47.
- Zhang G. S., Liu D. S., Dai Ch. w., Li R. J. (2006). Antitumor Effects of Celecoxib on K562 Leukemia Cells Are Mediated by Cell-Cycle Arrest, Caspasa-3 Activation, and Downregulation of Cox-2 Expression and Are Synergistic With Hydroxyurea or Imatinib. *American Journal of Hematology* (3)81: 242-255.

IX. APENDICE

9.1 Lugar y condiciones de realización de estudio

Los procedimientos quirúrgicos y la administración de los tratamientos se realizaron con la colaboración de dos instituciones: 1) Hospital Veterinario de Especialidades en Pequeñas Especies (HVEPE), de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ; y 2) clínica veterinaria particular Vet-101.

Las pruebas hematológicas se realizaron en laboratorios de análisis clínicos particulares y las pruebas moleculares en las instalaciones del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

9.2 Colaboración de clínica particular Vet 101.

Santiago de Querétaro, Qro., a 02 de enero del 2021.

MVZ. Sylvia Teresa Limones Luna

Responsable de la Clínica Veterinaria Vet-101

Por medio de la presente, me permito solicitar a la clínica Vet-101 su colaboración para el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Evaluación de COX-2 y apoptosis sobre la regresión tumoral del CCE en caninos domésticos tratados con Casiopeina Ilgly", el cual estoy dirigiendo y es parte de la tesis de maestría de la MVZ Sandra Patricia Rodríguez. Dicha investigación se encuentra aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.

Dicho proyecto consiste en la administración de un quimioterapéutico sintético diseñado y patentado por la Dra. Lena Ruiz Azuara de la facultad de Química de la UNAM llamado Casiopeinas®. El fármaco se encuentra en fase I para su uso clínico en humanos y nuestra intención es aplicarlo en la medicina veterinaria. Debido a ello, solicitamos el apoyo de la clínica Vet-101 para la captación de 10 pacientes que presenten carcinoma de células escamosas en piel y unos de las instalaciones para la aplicación de los tratamientos.

Sin más por el momento y agradeciendo el tiempo presentado a la presente quedo a sus órdenes para cualquier comentario.

Atentamente



MVZ. MSPAS Paola Jazmín Aranda Vargas
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro.

9.3 Colaboración de Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Santiago de Querétaro, Qro., a 4 de noviembre del 2020.

MVZ. Martha Noria Sánchez
Responsable administrativo del HVEPE
Facultad de Ciencias Naturales, UAQ.

Por medio de la presente, me permito solicitar al Hospital Veterinario de Especialidades en Pequeñas Especies (HVEPE) de la Facultad de Ciencias Naturales, su colaboración para el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Evaluación de COX-2 y apoptosis sobre la regresión tumoral del CCE en caninos domésticos tratados con Casiopeína@Hgly", el cual estoy dirigiendo y es parte de la tesis de maestría de la MVZ Sandra Patricia Rodríguez. Dicha investigación se encuentra aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Del mismo modo, hago referencia a que el MVZ. MSPAS. Orlando Federico Chávez Moreno es colaborador de este proyecto.

Dicho proyecto consiste en la administración de un quimioterapéutico sintético diseñado y patentado por la Dra. Lena Ruiz Azuara de la facultad de Química de la UNAM llamado Casiopeínas®. El fármaco se encuentra en fase I para su uso clínico en humanos y nuestra intención es aplicarlo en la medicina veterinaria. Debido a ello, solicitamos el apoyo del HVEPE para la captación de 10 pacientes que presenten carcinoma de células escamosas en piel, asistencia técnica por parte de los médicos veterinarios y uso de las instalaciones para la aplicación de los tratamientos.

Sin más por el momento y agradeciendo el tiempo prestado a la presente quedo a sus órdenes para cualquier comentario.

Atentamente

MVZ. MSPAS. Paola Jazmín Aranda Vargas
Profesor-Investigador
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro



05 NOV. 2020

RECIBIDO

9.4 Consentimiento informado para el tutor del paciente.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

En Santiago de Querétaro, a ____ de ____ de ____.

Yo, _____ con domicilio _____, Propietario de _____, especie _____, sexo _____, raza _____, edad _____.

He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Autorizo a los MSPAS. Paola Jazmín Aranda Vargas y MSPAS. Orlando Chávez Moreno a la realización del procedimiento experimental, comprendiendo el significado de los riesgos, teniendo conocimiento de que este consentimiento puede ser revocado en cualquier momento.

Firma propietaria

MSPAS Sandra Patricia Rodríguez

MSPAS. Orlando Chávez Moreno

Firma Testigo

Firma Testigo

INVESTIGADOR O REPRESENTANTE

He explicado al Sr (a). _____ la naturaleza o propósitos de la investigación le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma investigador o representante

9.5 Carta revocación del consentimiento.

CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

EVALUACIÓN DE CICLOOXIGENASA 2 Y APOPTOSIS SOBRE LA REGRESIÓN TUMORAL DEL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EN PERROS TRATADOS CON CASIOPEÍNA® IIGLY.

MVZ SANDRA PATRICIA RODRÍGUEZ
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Santiago de Querétaro, Qro., a ___ de _____ del _____.

Nombre del propietario _____

Nombre del perro _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones (opcional):

Firma del propietario

Testigo 1

Testigo 2

c.c.p. MSPAS Orlando Federico Chávez Moreno

