



Universidad Nacional  
del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales y Agrimensura



---

ESTUDIO CITOGENÉTICO DE  
TUMORES DE GLÁNDULA MAMARIA  
EN HEMBRAS DE  
*CANIS FAMILIARIS*  
(MAMMALIA, CANIDAE)

---

Tesis para optar por el grado de  
Licenciatura en Ciencias Biológicas – Orientación Genética  
2010



Autor:  
*Romina Canzoneri*

Directora: *Lilian Cristina Jorge*

Co-Directora: *Graciela Inés Lavia*

## *Agradecimientos*

---

- ξ A mis directoras la Dra. Lilian Cristina Jorge y la Dra. Graciela Inés Lavia, por el tiempo y las energías invertidas en guiarme en la realización de este trabajo.
- ξ A la Dra. Adriana Silvia Rosciani quien fue el nexo fundamental por el cual esta tesis pudo realizarse.
- ξ A la Dra. Patricia Koscinczuk quien me permitió estar presente en cirugías en su establecimiento para obtener material para el estudio.
- ξ A mis amigos y compañeros de carrera Laura, Analía, Marcos, Javier, Silvia, Silvina, Juan Manuel y Constanza, quienes me acompañaron en el transcurso de mis estudios, me prestaron sus oídos y tiempo para escuchar las buenas nuevas y las no tan buenas, con quienes comparto anécdotas inolvidables, gracias por alentarme a cada momento y soportarme.
- ξ Y por sobre todo a mi familia, en especial a mis padres, Iris y Claudio, por educarme, apoyarme, impulsarme a ser mejor, y sin quienes nada de esto sería posible. A ellos les dedico esta producción....

## Índice

---

<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	6
<b>Objetivos Generales y Particulares</b> .....	11
<b>Hipótesis</b> .....	11
<b>Materiales y Métodos</b> .....	12
<b>Resultados</b> .....	16
<b>Discusión</b> .....	26
<b>Conclusiones</b> .....	31
<b>Bibliografía</b> .....	33
<b>Anexo</b> .....	39

## Resumen

---

Una detallada investigación citogenética de los tumores caninos puede revelar la identidad de los cambios recurrentes que sean de importancia diagnóstica y/o pronóstica. Muchos tumores se caracterizan por presentar cromosomas marcadores muy anormales los cuales son, en general, resultado de fracturas múltiples fáciles de analizar. Los sitios frágiles son sitios cromosómicos específicos y heredables, susceptibles a presentar *gaps* o fracturas y estarían indicando regiones del genoma de mayor inestabilidad. Son usualmente hallados en genes envueltos en la tumorigénesis y mapean con más de la mitad de todos los sitios de quiebre y translocaciones recurrentes y específicos del cáncer.

En este trabajo se realizó un estudio citogenético de la especie *Canis familiaris*, presentándose el cariotipo del perro doméstico el cual está constituido por un número diploide igual a  $2n=78$  (76AA+XX), siendo 38 pares de autosomas (acrocéntricos) y un par de cromosomas sexuales XX (metacéntricos). Las NORs se localizaron en la región terminal de los brazos largos de cromosomas acrocéntricos, observándose hasta 8 cromosomas portadores de las NORs en una misma metafase. En algunos autosomas y en el par sexual se observaron bloques de heterocromatina constitutiva en posición pericentromérica.

Sobre tumores de glándula mamaria canina se llevó a cabo el análisis citogenético, para considerar las posibilidades diagnósticas del mismo, a través de la ocurrencia de aberraciones cromosómicas y la determinación de correlaciones entre los tipos de alteraciones cromosómicas encontradas y los tipos tumorales.

El material analizado se obtuvo a partir de tumores mamaros de pacientes caninas hembras, destinándose parte de la muestra a la evaluación diagnóstica y tipificación tumoral; y la otra parte al análisis citogenético mediante técnicas de citogenética convencional: con Giemsa, Bando NOR y Bando C.

Se estudiaron 11 pacientes, siendo un total de 14 los tumores analizados, de los cuales 5 presentaron alteraciones cromosómicas a modo de quiebres y/o gaps afectando autosomas y cromosomas sexuales. El porcentaje de metafases que presentaron cromosomas con quiebres fue de 60,81%, el número promedio de cromosomas afectados por metafase de 1,45 y la media de quiebres y/o gaps por metafases fue de 1,7.

Estas alteraciones se encontraron asociadas a neoplasias malignas de los tipos Carcinoma Complejo y Carcinoma Simple. Quiebres de ADN inadecuadamente reparados caracterizan a las neoplasias agresivas, por lo que los quiebres y gaps encontrados, serían indicadores de una mayor malignidad tumoral, por lo tanto de mal pronóstico para el paciente.

## Introducción

---

### *Cariotipo de Canis familiaris*

El cariotipo de *C. familiaris* ( $2n=78$ ) se compone de 76 autosomas de morfología acrocéntrica, todos ellos similares en forma, cuyo tamaño decrece progresivamente desde el par más grande al más pequeño, y de un par cromosómico sexual XY, ambos de morfología metacéntrica, de los cuales el X es tan grande como el primer par de autosomas y el Y se reconoce como el cromosoma más pequeño del complemento. Por esto existen dificultades para la estandarización de la descripción del cariotipo del perro (Reimann *et al.*, 1999).

Para contribuir a la descripción del cariotipo del perro, varios estudios se han realizado, entre ellos se cuentan aquellos que describen la posición de las NORs en los cromosomas, observándose que se localizan en las regiones terminales de hasta 8 autosomas y en la región telomérica de los brazos largos de los cromosomas X e Y (Shibasaki *et al.*, 1990; Rønne *et al.*, 1991; Pienkowska & Switonski, 1998; Hatanaka, 1996).

El bandeo C es una técnica de tinción diferencial del ADN que permite estudiar los cariotipos. Mediante esta técnica se ponen de manifiesto las regiones de heterocromatina constitutiva en los cromosomas, las cuales comúnmente coinciden con la región centromérica de los mismos. Hatanaka (1996) realizó bandeo C sobre metafases de *C. familiaris* encontrando la heterocromatina constitutiva asociada a las regiones centroméricas de los cromosomas, indicando que existen variaciones en el patrón de coloración de las áreas de heterocromatina, evidenciándose como bandas C positivas bien notorias en solo 7 a 8 autosomas, siendo en el resto muy débiles o estando ausentes, mientras Pathak *et al.* (1982) coinciden con esta autora, también encuentran bandas positivas en el cromosoma X.

### *Citogenética de las Neoplasias*

*Neoplasia* significa “tejido de nueva formación”, término que utilizado en el ámbito de la biología se refiere, como lo ha expresado Willis (1952), a una masa anormal de tejidos cuyo crecimiento excede y es descoordinado respecto al de los tejidos normales y que persiste en este mismo estado excesivo luego de finalizado el estímulo que provocó el cambio (Rashid & Ul Haque, 2009). Las neoplasias pueden ser benignas o malignas. Las neoplasias *benignas* son tumoraciones limitadas, presentan una cápsula fibrosa de tejido que limita a las células proliferantes en su crecimiento e impide su dispersión o metástasis a distancia. En cambio, las neoplasias *malignas*, son aquellas cuyas células se multiplican sin control y pueden invadir otros tejidos por metástasis (Stricker & Kumar, 2008).

Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en las hembras caninas y aproximadamente el 50% de estos son malignos. El riesgo de padecer tumores mamarios aumenta con la edad de la hembra, siendo la media entre los 9-10 años (Brodey *et al.*, 1983; Ochoa-Amaya *et al.*, 2009). Se manifiestan como nódulos únicos o múltiples, en una o más glándulas, pudiendo pertenecer al mismo o diferentes tipos morfológicos. Se caracterizan por presentar una estructura y comportamiento biológico variables. El desarrollo de las neoplasias mamarias epiteliales de la perra puede iniciarse en una hiperplasia y progresar hacia displasia, adenoma, papiloma, carcinoma *in situ* y sus formas invasivas. Una vez que la progresión comienza, probablemente en la paciente se genere una neoplasia y con frecuencia se desarrollan múltiples tumoraciones mamarias de diferente tipo (Foster, 2007).

Existe mucho interés desde el punto de vista pronóstico y del tratamiento de las neoplasias mamarias caninas, por lo que sus aspectos histopatológicos y clínicos están siendo ampliamente revisados (Foster, 2007).

En general, en todos los tumores mamarios caninos el índice mitótico de las células neoplásicas es bajo, por lo que la presencia de varias mitosis por campo es un indicador de gran malignidad histológica, asimismo, la existencia de áreas de necrosis indica que se trata de un tumor agresivo y de crecimiento

rápido (Ochoa-Amaya *et al.*, 2009). Es imprescindible, por lo tanto, la búsqueda e identificación de herramientas que permitan reconocer pacientes con alto riesgo de recurrencia y muerte (Madewell, 2001).

Es evidente que el desarrollo de enfermedades malignas depende considerablemente de factores genéticos (Therman & Susman, 1996). Los mecanismos de mutagénesis y carcinogénesis parecen estar íntimamente ligados. La mutación es una consecuencia del daño en el DNA y este puede ser el estadio inicial en el proceso por el cual se inicia la formación del tumor (Bishop, 1983, 1991; Marx, 1993).

La pérdida generalizada del control del crecimiento que muestran las células neoplásicas es el resultado neto de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula y se refleja en varios aspectos del comportamiento celular (Cooper, 2002).

La carcinogénesis de múltiples pasos se sustenta en numerosas comprobaciones moleculares las cuales revelan que ningún oncogén puede transformar por sí solo a las células, se necesita de la cooperación entre varios de ellos, así como la pérdida de función de dos o más genes supresores de tumores, cada oncogén induce solo una parte del fenotipo necesario para que la transformación sea completa (Kusewitt & Rush, 2007).

Según Muñetón Peña *et al.* (2004) a través de la citogenética del cáncer, se ha logrado establecer que tumores como el de mama, estómago, colon y cerebro presentan alteraciones cromosómicas complejas, las cuales se asocian con un estado patológico avanzado de malignidad.

Diversos autores han publicado revisiones sobre las primeras investigaciones llevadas a cabo acerca de las constituciones cromosómicas de las enfermedades malignas (Atkin, 1974; Sandberg & Sakurai, 1974; Makino, 1975; Sandberg, 1979; Nowell, 1982). Las aberraciones cromosómicas en el cáncer presentan un amplio espectro de fenómenos (Mitelman, 1988; Sandberg, 1990). Análisis citogenéticos en tumores mamarios caninos revelaron la ocurrencia de diferentes tipos de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales siendo estas trisomías, monosomías, fusiones,



translocaciones, isocromosomas, cromosomas marcadores (Mellink *et al.*, 1989; Mayr *et al.*, 1990, 1991, 1992, 1994, 1996 y 1998; Bartnitzke *et al.*, 1992; Reimann *et al.*, 1994; Perez Alenza, 1994).

Aunque es considerable el número de trabajos de citogenética encontrados, en general ocurre lo observado en Rutteman *et al.* (1988), que evalúan ploidía por citometría de flujo, aunque no refieren correlación entre tipo histopatológico con las alteraciones de ploidía encontradas. Por su parte, Milne *et al.* (2004), mencionan dificultades en el estudio de las alteraciones cromosómicas de los tumores caninos, debidas fundamentalmente al complejo cariotipo del perro que determina una identificación y reorganización laboriosa y dificultosa de los cromosomas.

Muchos tumores se caracterizan por presentar cromosomas marcadores muy anormales los cuales son, por lo general, resultado de fracturas múltiples fáciles de analizar (Therman & Susman, 1996).

Los sitios frágiles son sitios cromosómicos específicos y heredables, susceptibles a presentar *gaps* o fracturas (Escribano *et al.*, 2009) y estarían indicando regiones del genoma de mayor inestabilidad.

La apariencia citológica es muy variable, se visualizan como *gaps*, discontinuidades o fracturas en cromátides y cromosomas. En algunas metafases, el cromosoma se rompe en el sitio frágil dando lugar a cromosomas delecionados, fragmentos acéntricos, figuras trirradiales, deleciones, translocaciones, intercambio de cromátidas hermanas, amplificaciones e integración de plásmidos (Fundia & Larripa, 1996; Escribano *et al.*, 2009).

El mecanismo exacto de su formación no está claramente entendido, así Ray *et al.* (2001) proponen que surgen de roturas en la doble cadena del ADN. Burrow *et al.* (2010) sostienen que se debería a una falla en la compactación de la cromatina en regiones pobres en genes y con retraso en la replicación. Finalmente Casper *et al.* (2002) demostraron que, en general a nivel de estos sitios frágiles, el ADN presenta islas flexibles ricas en AT capaces de formar estructuras secundarias estables que dificultan la replicación y originan regiones de ADN no replicadas.

Algunos sitios frágiles se manifiestan en forma espontánea en condiciones normales de cultivos celulares, mientras que otros necesitan la adición de sustancias químicas inductoras altamente específicas (Llambí & Nuñez, 2007).

De acuerdo a Escribano *et al.* (2009), los sitios frágiles se clasifican, basados en su frecuencia poblacional en tres grupos principales:

1. *Raros*: presentes en un individuo por varios cientos de personas.
2. *Intermedios*: existen dos más frecuentes en una población.
3. *Comunes*: universales y parte de la arquitectura cromosómica normal.

Los sitios frágiles comunes no varían y son inocuos. Sólo los sitios frágiles *raros* e *intermedios* se clasifican como variantes cromosómicas y se han descrito asociados con malformaciones congénitas, anomalías cromosómicas esporádicas y mayor predisposición a enfermedades malignas. Existe evidencia de que estas regiones tienen relación con los rearrreglos cromosómicos producidos en tumores sólidos.

Breen (2008) señala que en la actualidad es ampliamente aceptado que la precisa identificación de las anomalías cromosómicas recurrentes en las células malignas, proporciona oportunidades para aumentar la complejidad del diagnóstico, la sub-clasificación y el pronóstico de enfermedades neoplásicas. En la medicina humana, la identificación de aberraciones cromosómicas, especialmente en las leucemias, ayuda a la selección del enfoque terapéutico más adecuado.

En el perro las neoplasias mamarias tienen gran importancia como patología en medicina veterinaria, su incidencia en la población canina hembra es alta y se corresponden en la mayoría de los casos a tipos neoplásicos malignos. Los conocimientos existentes de esta patología en la región, se centran principalmente en los campos de la clínica, citología e histología, existiendo un gran desconocimiento en lo referente a la citogenética de estos tumores.

Por ello surge éste trabajo, para centrarse en el estudio citogenético de las neoplasias de glándula mamaria, en la búsqueda de alteraciones cromosómicas que sean reconocibles y recurrentes en las células neoplásicas de los distintos tipos tumorales. Contribuyendo así a la descripción de los tumores. Y considerando la factibilidad de realizar este análisis como procedimiento de rutina en el diagnóstico de las neoplasias caninas, a fin de proporcionar nuevas herramientas al médico veterinario a la hora de realizar el diagnóstico y pronóstico de sus pacientes.

## **Objetivos**

---

### **Generales**

- Ampliar el espectro de técnicas de diagnóstico de las neoplasias mamarias caninas incorporando el análisis citogenético de los tumores.

### **Particulares:**

- Realizar el cariotipo del perro doméstico, mediante la coloración convencional de Giemsa y bandeado C.
- Determinar la posición de las Regiones Organizadoras Nucleolares mediante Bando NOR en células de cariotipo normal y alterado.
- Realizar el estudio cromosómico en los Tumores de Glándula Mamaria Canina, para analizar sus posibilidades diagnósticas.

## **Hipótesis**

---

- Existen alteraciones cromosómicas recurrentes y reconocibles en las distintas neoplasias.
- Las alteraciones cromosómicas se relacionan con el tipo tumoral por lo que pueden considerarse marcadores tumorales.

## Materiales y Métodos

---

### *Obtención de las muestras*

Se trabajó con pacientes caninos hembras con tumores mamarios que asistieron a la consulta en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE) durante el año 2009. También se colectaron muestras de la clínica “Servicios Veterinarios” de la ciudad de Corrientes.

El material colectado se fraccionó, destinándose una parte al diagnóstico citológico, a cargo del Servicio de Diagnóstico Histopatológico y Citológico de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE), y la otra parte al estudio citogenético que tuvo lugar en el laboratorio de Genética del Instituto de Ictiología del Nordeste - UNNE.

La obtención de las muestras de los distintos tipos de lesiones se realizó de la siguiente manera:

1. Siguiendo la metodología de “punción con aguja fina” (PAF) que constituye una variante de la Punción Aspiración (Akhtar *et al.*, 1989; Cajulis & Sneige, 1993; Rosciani *et al.*, 1994). Empleándose para ello agujas descartables de 40 x 8.
2. A partir de material fresco de cirugía.

### *Procesamiento de las muestras*

Para el *diagnóstico citológico* las muestras fueron distribuidas en al menos 4 portaobjetos, fijados en alcohol 96° y coloreados con la técnica de Hematoxilina y Eosina.

Sobre estas muestras se realizó la *tipificación del tumor* de acuerdo a la actual Clasificación Histológica de los Tumores Mamarios del Perro y del Gato (Misdorp *et al.*, 1999).

Para los *estudios citogenéticos* el material obtenido de las punciones y de cirugía fue suspendido en una solución de Hank y posteriormente procesado siguiendo la metodología propuesta por Foresti *et al.* (1993), con algunas variantes:

- Disgregar una porción de tejido tumoral en 10 ml de solución de Hank con la ayuda de pinzas y jeringas de vidrio.
- Incubar en estufa a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir a la suspensión obtenida 1 gota de colchicina al 0,0125% con pipeta Pasteur de 1 ml.
- Centrifugar a 900 r.p.m. aproximadamente durante 10 minutos y luego descartar el sobrenadante. Agregar solución hipotónica KCl 0,075 M e incubar durante 25 minutos a 37°C.
- Prefijar el material con 0,5 ml de fijador 3:1 (alcohol metílico - ácido acético glacial), centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Realizar la primera fijación con fijador 3:1 (alcohol metílico - ácido acético glacial), centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Repetir 2 o 3 fijaciones con fijador 3:1 (alcohol metílico - ácido acético glacial)
- Conservar el material fijado en freezer en tubos de Ependorff de 1,5 ml.

Con dichas preparaciones se gotearon portaobjetos para observar los cromosomas con coloración convencional (Giemsa al 10% en buffer Sörensen durante 10'). Posteriormente estos preparados se sometieron a las técnicas de bandeo NOR y bandeo C.

### *Bandeo NOR*

Previa decoloración de los preparados con alcohol etílico al 96% por 12 hs, se procedió a la realización del bandeo NOR según la metodología de Howell & Black (1980), con algunas modificaciones:

- Colocar sobre un portaobjetos goteado con material fresco una mezcla de 1 gota de gelatina al 2%, 2 gotas de nitrato de plata al 50% y 1 gota de agua destilada.
- Colocar encima un cubreobjetos.
- Incubar en cámara húmeda en estufa a 60°C hasta que tome color ámbar oscuro.
- Retirar el cubreobjetos y enjuagar con agua corriente.
- Secar al aire.

### *Bandeo C*

Para la identificación de heterocromatina constitutiva se procedió según lo propuesto por Sumner (1972), con modificaciones:

- Colocar un portaobjetos goteado con material en HCl 0,2N durante 10 a 20 minutos (según la edad del preparado) a temperatura ambiente.
- Enjuagar con agua destilada y secar al aire.
- Colocar en 2xSSC a 60°C durante 15 min.
- Lavar con agua destilada y secar al aire.

- Colocar en solución acuosa de Hidróxido de Bario al 5%, durante 30 segundos a 2 minutos (según la edad del preparado) a 60°C.
- Enjuagar en HCl 0,2N.
- Lavar con agua destilada y secar al aire.
- Colocar en 2xSSC a 60°C durante 45 minutos.
- Lavar con agua destilada y secar al aire.
- Colorear con Giemsa 5% en buffer Sörensen durante 10 minutos.
- Lavar con agua destilada y secar al aire.

Las metafases fueron fotografiadas con Infinity 1 Digital Kit acoplado al microscopio óptico Olympus BX41, y posteriormente analizadas con el programa analizador de imágenes Image ProPlus 5.1. El análisis consistió en el recuento cromosómico y en la búsqueda de alteraciones cromosómicas.

Las metafases de mejor calidad y las que evidenciaron particularidades a destacar, fueron seleccionadas y destinadas a la ilustración de los resultados del presente trabajo.

## Resultados

---

### *Cariotipo de Canis familiaris*

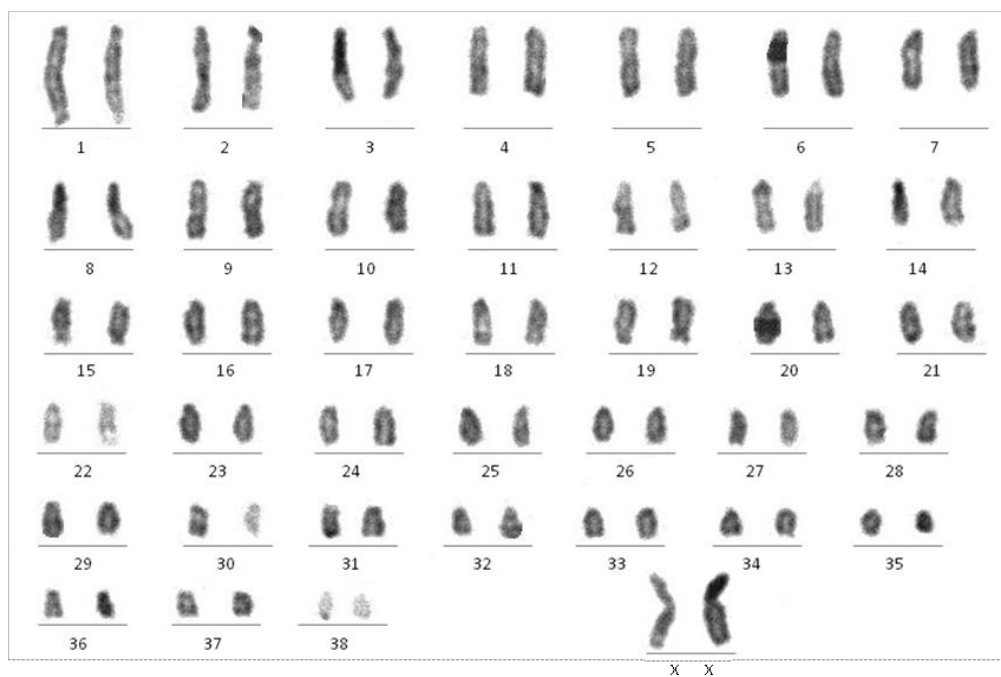
El cariotipo del perro doméstico (*Canis familiaris*), fue construido a partir del análisis de las metafases que no presentaron alteraciones cromosómicas, eligiéndose aquella de mejor calidad para confeccionar el cariotipo que se exhibe en la Figura 1. Surge entonces que el perro doméstico presenta  $2n=78$ , constituido por 39 pares cromosómicos de los cuales 38 corresponden a autosomas (acrocéntricos) y el par restante a los cromosomas sexuales XX (metacéntricos) por tratarse de una hembra de la especie.

Las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs) se localizaron en la región terminal de los brazos largos de cromosomas acrocéntricos, observándose hasta 8 cromosomas con marcaciones Ag-NOR+ en una misma metafase (Figura 2).

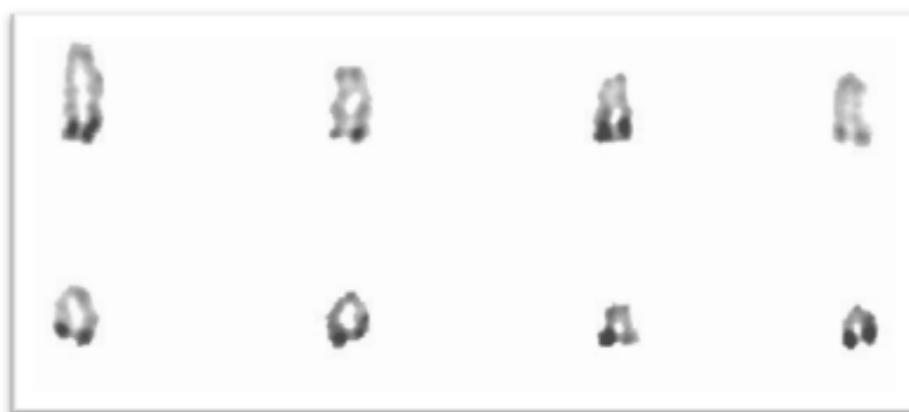
El bandeo C mostró bandas positivas en regiones centroméricas de 8 cromosomas, estas marcaciones ocurrieron sobre autosomas y cromosomas sexuales (Figura 3). En el resto de los cromosomas no se observaron marcaciones.

Debido a la dificultad para identificar específicamente los cromosomas del perro, no fue posible indicar a qué pares cromosómicos en particular corresponden los cromosomas portadores de las bandas NORs y bandas C.

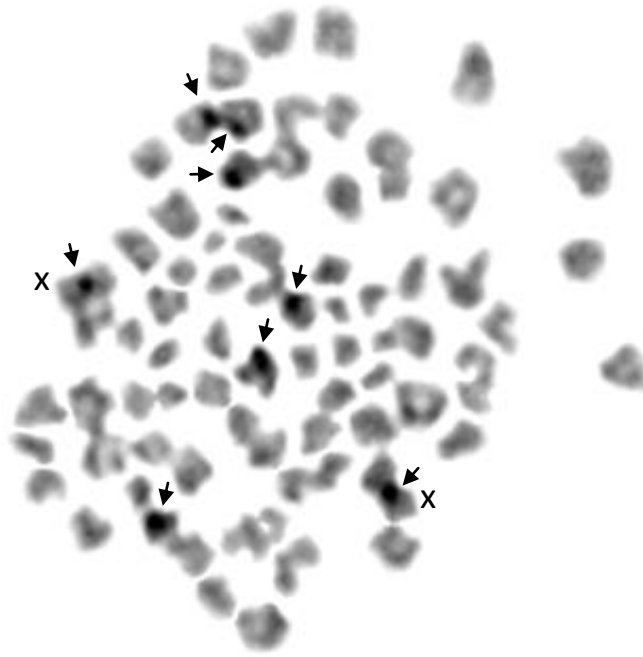




**Figura 1.** Cariotipo de *Canis familiaris*.  $2n=76AA+XX$ .



**Figura 2.** Cromosomas portadores de las NORs en *Canis familiaris*.



**Figura 3.** Metafase donde se indican con flechas los cromosomas con bandas C positivas.

### *Citogenética de los Tumores*

Se estudiaron 11 pacientes caninos hembras de entre 3 y 12 años de edad, siendo un total de 14 los tumores analizados (2 pacientes presentaban más de un tumor en su cadena mamaria). Cada tumor se consideró como un caso en particular. Los 14 casos analizados y sus diagnósticos respectivos se presentan en la Tabla 1.

Se obtuvieron resultados satisfactorios en 5 pacientes, evidenciándose metafases en las muestras de 8 casos (tumores), de los cuales 5 de ellos presentaron alteraciones cromosómicas a modo de quiebres y/o gaps (Q y G) cromatídicos y cromosómicos. Estos resultados se resumen en la tabla 2 y gráfico 1.

El número de cromosomas afectados en las metafases que presentaron estas alteraciones cromosómicas, varió de 1 a 5, siendo la media por metafase de 1,45. El número de Q y G en promedio observados entre las metafases portadoras de dichas aberraciones fue de 1,7 variando en número desde 1 hasta 8 (Figura 4). Los valores absolutos y las medias se presentan en las tablas 3 y 4.

Los Q y G se localizaron en los cromosomas sexuales y autosomas de diferentes tamaños, no siendo estas situaciones excluyentes entre sí, pudiéndose observar en una misma metafase tanto autosomas como X dañados (Figuras 4 y 5). Dichos quiebres y gaps se situaron sobre los brazos largos de estos cromosomas a nivel proximal, intersticial y distal.

En varias metafases se encontraron más de un cromosoma con quiebres y/o gaps, incluso Q y G sobre el mismo cromosoma, así se llegó a observar hasta un máximo de 5 cromosomas afectados e identificar dos autosomas pequeños, uno de ellos con un doble quiebre sobre una misma cromátide y otro con gaps en ambas cromátides (Figura 4). En el caso 1621-APi se observó un doble quiebre en el brazo largo del cromosoma X y un quiebre proximal en un autosoma (Figura 5). Algunos cromosomas presentaban ambas cromátides afectadas a la misma altura (Figura 6).

En porcentaje, el 13,33% de las metafases con aberraciones cromosómicas presentaron quiebres y/o gaps en los cromosomas sexuales, siendo que en una de ellas, ambos cromosomas X se vieron afectados; mientras que el 97,77% mostraron daños sobre los autosomas (Tabla 5 y Grafico 2).

**Tabla 1.** Casos estudiados, diagnóstico y método de obtención de la muestra.

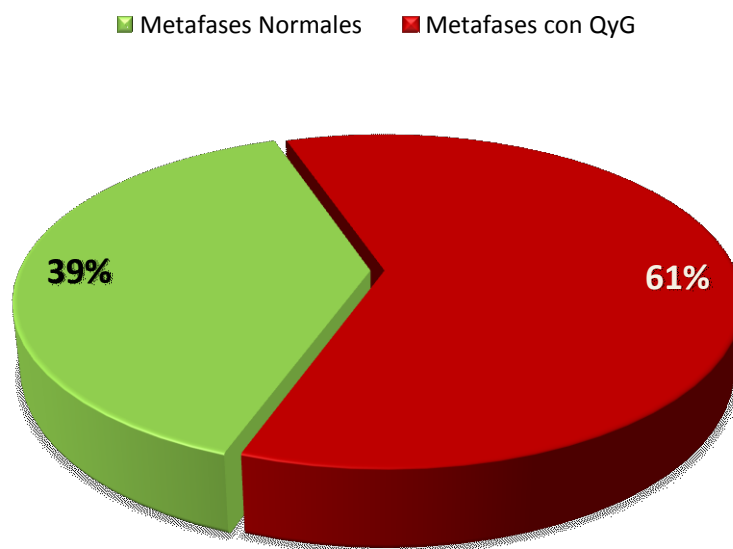
Paciente*	Caso/Tumor		Diagnóstico	Toma de la Muestra
	N°	Mama afectada		
C-2479	1607	APi	Carcinoma en Tumor Mixto	PAF**
C-2483	1608	li	Carcinoma Simple	PAF
C-2488	1609	APi	Carcinoma Simple	PAF
C-2494	1610	AAi	Carcinoma en Tumor Mixto	PAF
C-2647	1611	TPi	Carcinoma en Tumor Mixto	PAF
C-2646	1613	TPd	Carcinoma Complejo	PAF
C-2654	1616	AAi	Carcinoma en Tumor Mixto	PAF
C-2655	1617	li	Carcinoma Simple	PAF
C-2686	1619	li	Carcinoma Simple	PAF
C-2731	1621	AAi	Carcinoma Complejo	Cirugía
		APi	Carcinoma Complejo	Cirugía
C-2858	1622	AAi	Carcinoma Complejo	Cirugía
		APi	Carcinoma Complejo	Cirugía
		Id	Carcinoma Simple	Cirugía

N°: número en la colección de genética. \*Número de paciente en el servicio de diagnóstico de la Fac. de Cs. Veterinarias, UNNE. \*\*PAF: punción con aguja fina.

Las siglas en “mama afectada” indican la región sobre la cadena mamaria donde fue obtenida la muestra: APi (mama abdominal posterior izquierda), li (mama inguinal izquierda), AAi (mama abdominal anterior izquierda), TPi (mama torácica posterior izquierda), TPd (mama torácica posterior derecha), Id (mama inguinal derecha).

**Tabla 2.** Frecuencia de metafases con quiebres y/o gaps.

Caso	Metafases observadas	Metafases con Q y G	Porcentaje de metafases con Q y G
1608-li	6	0	0
1610-AAi	1	0	0
1619-li	3	0	0
1621-AAi	29	22	76
1621-APi	19	12	63
1622-AAi	5	1	20
1622-APi	7	7	100
1622-li	4	3	75
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>45</b>	<b>61</b>



**Gráfico 1.** Porcentaje de metafases normales y metafases con Q y G.

**Tabla 3.** Número de cromosomas con quiebres y/o gaps.

<b>Caso</b>	<b>Total Metafases</b>	<b>Total CcQG*</b>	<b>Media CcQG/M**</b>	<b>Máximo CcQG</b>
1621-AAi	29	41	1,41	5
1621-APi	19	31	1,63	5
1622-AAi	5	1	0,20	1
1622-APi	7	16	2,29	5
1622-li	4	4	1	2
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>93</b>	<b>1,45</b>	

\*CcQG: cromosomas con quiebres y gaps. \*\*CcQ/M: cromosomas con quiebres y gaps por metafase.

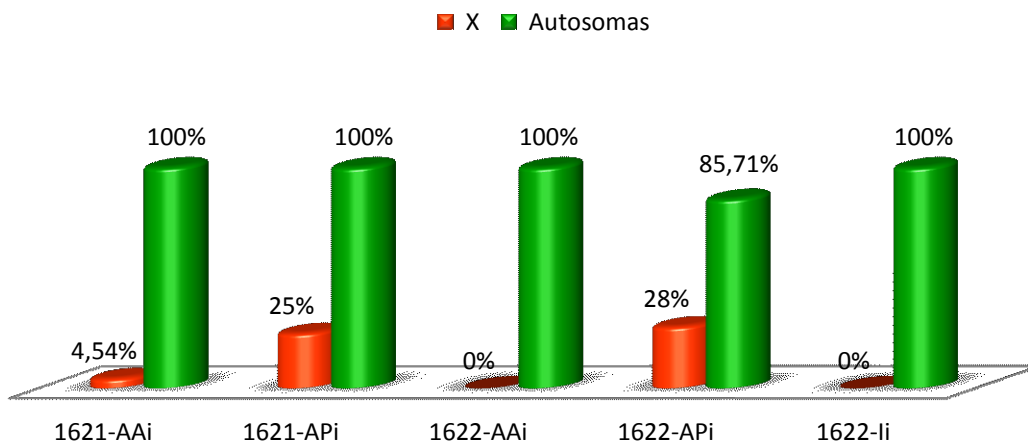
**Tabla 4.** Quiebres y/o gaps observados en las metafases de neoplasias mamarias caninas.

<b>Caso</b>	<b>Total Metafases</b>	<b>Total Q y G</b>	<b>Media QyG/M*</b>	<b>Máximo Q y G</b>
1621-AAi	29	44	1,52	5
1621-APi	19	38	2	7
1622-AAi	5	1	0,20	1
1622-APi	7	22	3,14	8
1622-li	4	4	1	2
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>109</b>	<b>1,70</b>	

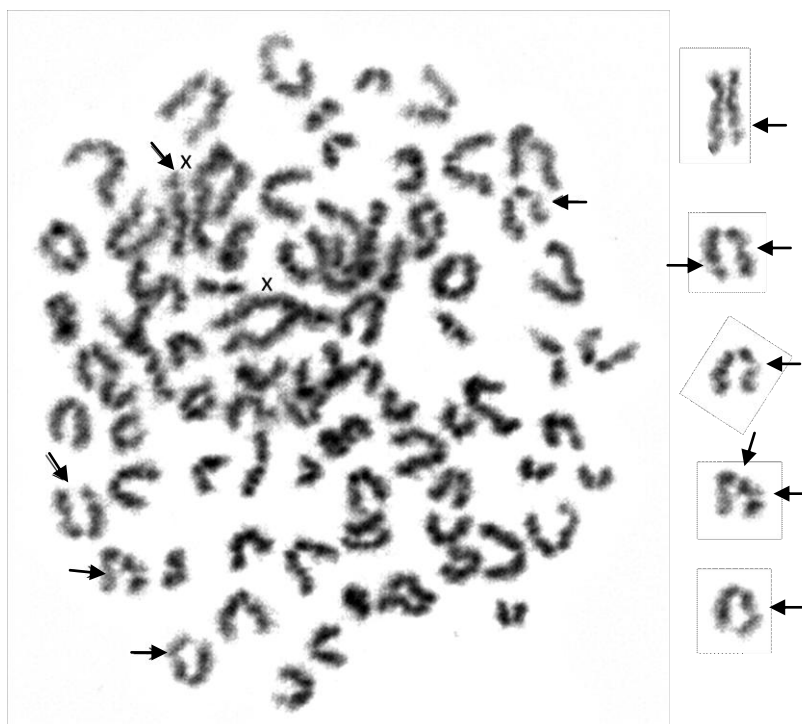
\*QyG/M: quiebres y gaps por metafase.

**Tabla 5.** Porcentaje de metafases que presentaron afectados los cromosomas X y los Autosomas, sobre el total de metafases afectadas.

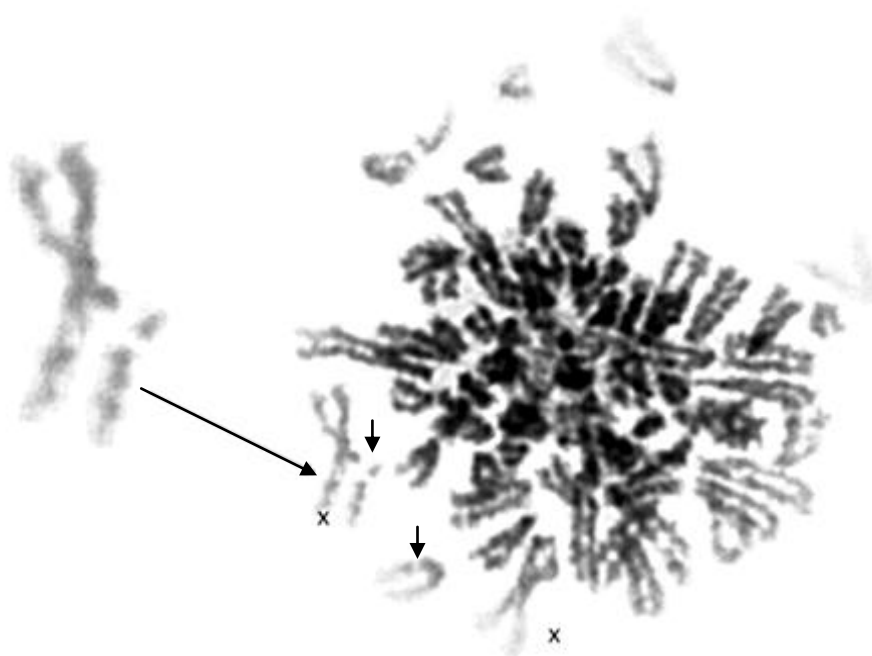
Caso	Total Metafases con Q y G	Metafases con			
		Q y G en X		Q y G en Autosomas	
		N°	%	N°	%
1621-AAi	22	1	4,54	22	100
1621-APi	12	3	25	12	100
1622-AAi	1	0	0	1	100
1622-APi	7	2	28	6	85,71
1622-li	3	0	0	3	100
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>6</b>	<b>13,33</b>	<b>44</b>	<b>97,77</b>



**Gráfico 2.** Porcentaje de metafases que presentaron afectados los cromosomas X y los Autosomas, sobre el total de metafases afectadas.

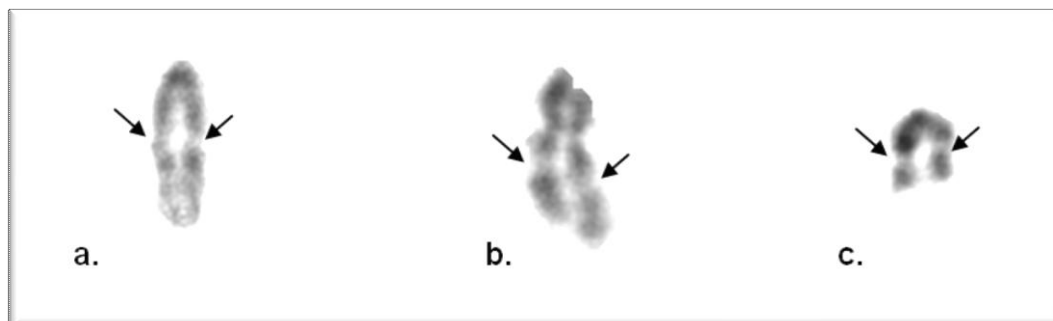


**Figura 4.** Quiebres y gaps en autosomas y cromosoma X. 1621-APi.

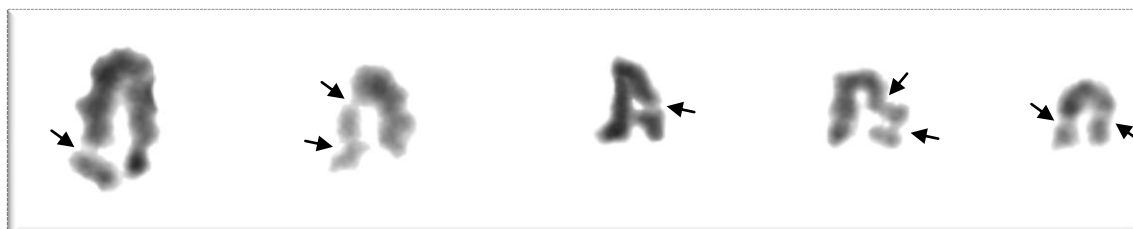


**Figura 5.** Doble quiebre en brazo largo de cromosoma X y quiebre en autosoma. 1621-APi.





**Figura 6.** Cromosomas con ambos brazos afectados. **a.** Caso 1621 AAi. **b.** y **c.** Caso 1622 APi.



**Figura 7.** Cromosomas extraídos de una metafase, donde se observan 8 quiebres/gaps sobre 5 cromosomas. Caso 1622 APi.

## Discusión

---

### *Cariotipo de Canis familiaris*

El cariotipo de *C. familiaris* presenta un  $2n=78$  (76AA+XY), siendo los autosomas acrocéntricos y los cromosoma sexuales metacéntricos. Se observó que el tamaño del cromosoma X es similar al de los cromosomas acrocéntricos de mayor longitud, y que los autosomas decrecen en tamaño progresivamente desde el par más grande al más pequeño. Estos datos son coincidentes con los encontrados en la literatura (Reimann *et al.*, 1999; Shibasaki *et al.*, 1990; Rønne *et al.*, 1991; Pienkowska & Switonski, 1998, Hatanaka, 1996).

Una variedad de cariotipos para el perro se han publicado en los últimos 30 años, utilizando distintos métodos de bandeo. Se hizo evidente que, al menos para muchos de los autosomas más pequeños del perro, los patrones de bandas de los cromosomas no ofrecen suficiente información para discriminar entre ellos y describir el cariotipo completo con confianza. En consecuencia, para garantizar la coherencia en la descripción de los cromosomas, se estableció un "Comité para la Estandarización del Cariotipo del Perro Doméstico" en 1990. Este Comité fue encargado de proponer una nomenclatura para los cromosomas del cariotipo del perro que sería aceptado en el ámbito internacional. Utilizando la técnica de bandeo G es posible identificar los 21 pares cromosómicos grandes, pero los 17 pares restantes son muy difíciles de caracterizar debido a su pequeño tamaño, éstos necesitarían del uso de marcadores cromosoma-específico, de modo que un cariotipo estándar completo requiere de la citogenética molecular (Breen *et al.*, 1999; Breen, 2008).

Las regiones organizadoras de nucléolos observadas mediante la técnica de bandeo NOR presentaron la misma localización autosómica terminal, como lo reportado por Shibasaki *et al.* (1990), Rønne *et al.* (1991), Pienkowska & Switonski (1998), no se observaron bandas positivas en los cromosomas sexuales. Estos resultados permiten considerar que los quiebres y

gaps descritos sobre los cromosomas, son quiebres y gaps en sí mismos y no constricciones secundarias asociadas a NORs.

Bandas C positivas se revelaron en las regiones centroméricas de autosomas y cromosomas sexuales, observándose hasta 8 cromosomas portadores de las mismas, en el resto de los cromosomas estas bandas estaban ausentes. Fujinaga *et al.* (1989) y Hatanaka (1996) encontraron bandas positivas de heterocromatina constitutiva bien notorias, en las regiones centroméricas de entre 6 a 8 autosomas, y en el resto de los cromosomas la marcación fue muy débil o estaba ausente. Otros autores coinciden con estos hallazgos y mencionan la ocurrencia de marcaciones en la región centromérica del cromosoma X (Pathak *et al.*, 1982).

### *Citogenética de los Tumores*

Se ha sugerido que los quiebres y gaps cromosómicos son los primeros eventos de inestabilidad cromosómica.

En éste trabajo se registraron *quiebres y gaps* en los cromosomas autosómicos y sexuales, encontrándose estos en la porción proximal, intersticial y distal de los brazos largos de dichos cromosomas. Se observaron cromosomas con quiebres y/o gaps dobles sobre una misma cromátide, así como en ambas cromátides. Ray *et al.* (2001), realizaron estudios similares, pero analizando la ocurrencia de quiebres y gaps en linfocitos de sangre periférica en mujeres con cáncer de mama, sus resultados mostraron una frecuencia de quiebres y gaps de 1,37 por metafase.

En humanos y otros mamíferos la fragilidad cromosómica ha sido asociada en procesos de enfermedades multigénicas con efectos fenotípicos graves como procesos oncológicos, síndrome del X frágil, alteraciones de la fertilidad (Sutherland *et al.*, 1998; Slota *et al.*, 2000). En bovinos se ha asociado la fragilidad cromosómica con alteraciones fenotípicas como síndrome de calvicie en terneros, paraqueratosis hereditaria, enanismo, alteraciones de la fertilidad (Escribano *et al.*, 2009).

Con respecto a los procesos oncológicos, Escribano *et al.* (2009), nos indican que los sitios frágiles representan puntos donde hay una mayor predisposición a rupturas y reordenamientos cromosómicos en las células somáticas llevando a la posible activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumor, relacionándose de este modo con la patogénesis del desarrollo neoplásico.

Los sitios frágiles son usualmente hallados en genes envueltos en la tumorigénesis, mapean con varios oncogenes y con más de la mitad de todos los sitios de quiebres y translocaciones recurrentes y específicas del cáncer. Se ha demostrado estadísticamente que la mayoría de las bandas que contienen sitios frágiles están involucradas en alteraciones estructurales específicas de enfermedades malignas (Fundia & Larripa, 1996; Yunis & Soreng, 1984). Incluso algunos autores han mencionado la presencia de sitios frágiles, estudiados por técnicas moleculares sobre núcleos de neoplasias malignas, en los cromosomas X de *Canis familiaris* (Milne *et al.*, 2004).

El porcentaje de metafases analizadas que presentaron cromosomas con quiebres es de 61%, el número promedio de cromosomas afectados por metafase fue de 1,45 y la media de quiebres y/o gaps por metafases de 1,70. Podría decirse que la incidencia de estas alteraciones cromosómicas es alta y está relacionada con el desarrollo del proceso canceroso.

Estas alteraciones se encontraron en 5 tumores de los 14 estudiados, y asociadas a neoplasias malignas de los tipos: Carcinoma Complejo y Carcinoma Simple (tipos neoplásicos de alta agresividad y pronóstico desfavorable). Los Carcinomas Complejos (de origen epitelial y mioepitelial) tienen mejor pronóstico que aquellos Simples (epiteliales) según lo enunciado por Ochoa-Amaya *et al.* (2009).

El tiempo de supervivencia de los pacientes tratados por tumores malignos es significativamente menor (25 a 40 % a los dos años) que los tratados por tumores benignos y el rango de supervivencia de los primeros se encuentra entre los 4 y 17 meses (Misdorp *et al.*, 1999).

Según Muñetón Peña *et al.* (2004), a través de la citogenética del cáncer, se ha logrado establecer que tumores como el de mama, estómago, colon y cerebro presentan alteraciones cromosómicas complejas, las cuales se asocian con un estado patológico avanzado de malignidad. Alteraciones teloméricas, quiebres de ADN inadecuadamente reparados y deficiencias en los sistemas de control de la mitosis son eventos capaces de generar inestabilidad cromosómica y aneuploidía que caracteriza las neoplasias más agresivas (Assumpção *et al.*, 2006).

Encontrar alteraciones cromosómicas asociadas a carcinomas agresivos indica un mal pronóstico para el paciente, y se consideran como un factor agravante para estas patologías, por lo que se esperaría que las hembras caninas a quienes se les extrajeran estos tumores tengan una expectativa de vida menor y sea muy probable la aparición de nuevos tumores.

Debido a que no se realizaron controles a largo plazo luego de las cirugías y así un seguimiento de los pacientes, no es posible conocer la evolución de las perras de quienes se obtuvieron las muestras, y por lo tanto evaluar su progreso.

Por otro lado, los quiebres y gaps cromosómicos registrados en los tipos tumorales Carcinoma Complejo y Carcinoma Simple, podrían ser considerados como marcadores tumorales, no del tipo tumoral-específico, pero sí como indicadores de malignidad y mal pronóstico para las pacientes que presentaron dichas patologías.

Debe señalarse que marcador tumoral es todo factor que proporciona datos sobre la biología del tumor. Se trata de información sobre su evolución, complementaria a la obtenida por el patólogo mediante el diagnóstico histológico y que permitiría elaborar decisiones terapéuticas más adecuadas, pues se ha hecho evidente que la evolución final obedece a un conjunto de características biológicas de las células tumorales. Debido a que es imposible conocer y prever el comportamiento de un tumor mediante el estudio de un factor genético o molecular aisladamente, un análisis conjunto de factores

podría ayudar a la creación de un perfil biológico pronóstico más completo (Díez Alonso *et al.*, 2001).

Muñetón Peña & Ramírez Castro (2002) destacan que debe tenerse en cuenta la importancia de los estudios cromosómicos en cualquier tipo de neoplasia, con el fin de obtener una mejor información acerca del espectro de alteraciones e identificar anomalías cromosómicas recurrentes específicas durante el proceso de transformación maligna. Además, existiría la posibilidad de correlacionar estos estudios con los hallazgos histopatológicos, obteniéndose información complementaria que ayudaría en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con diferentes neoplasias. Por otra parte, denotan que es importante estimular investigaciones multidisciplinarias en este campo, que aporten nuevos conocimientos acerca de la biología del cáncer.

Como es el caso de los cánceres humanos, una detallada investigación citogenética de las neoplasias caninas, puede revelar la identidad de los cambios recurrentes que sean de importancia diagnóstica y/o pronóstica. La evaluación de los cambios citogenéticos en tumores caninos se ha venido realizando en estos últimos años mediante la combinación de análisis citogenéticos directos de los cariotipos tumorales de células individuales, mediante citogenética convencional y molecular; y análisis indirectos del ADN de poblaciones de células tumorales mediante genómica comparativa por hibridación. La capacidad de caracterizar los cambios citogenéticos, sería de una valiosa ayuda para el refinamiento del pronóstico y por tanto del manejo clínico de los pacientes (Breen, 2008).

## Conclusiones

---

El perro doméstico presenta un cariotipo  $2n=78$  (76AA+XY), siendo los autosomas de morfología acrocéntrica y los cromosomas sexuales metacéntricos. Las regiones NORs se localizan en los autosomas en posición terminal de los brazos largos, siendo portadores de éstas hasta 8 cromosomas. El bandeo C muestra bandas positivas en las regiones centroméricas de hasta 8 cromosomas, incluyendo autosomas y cromosomas sexuales, ocurriendo que el resto de los cromosomas no evidencian bandas positivas.

Las alteraciones cromosómicas halladas, mediante el análisis citogenético de los carcinomas mamarios caninos, fueron quiebres y gaps. Estos pueden no necesariamente ser la causa misma que origina el desarrollo de la neoplasia y la carcinogénesis, sino que pueden ser la manifestación física de mutaciones que afectan a los genes implicados en el desarrollo de las neoplasias, o el control de la expresión de los mismos. En particular la falla de aquellos involucrados en la reparación del ADN y que debido a su incorrecto funcionamiento facilitan la ruptura del material genético a la altura de sitios frágiles, los cuales pueden localizarse cercanos a genes implicados en la tumorigénesis y dar paso al desarrollo de neoplasias que progresan hasta resultar en cáncer.

Encontrar este tipo de alteraciones genéticas (gaps/quiebres) asociadas a neoplasias mamarias malignas como lo son los Carcinomas Simple y Complejo, sería un agravante diagnóstico, pues actuarían como factores indicadores que vendrían a reforzar el mal pronóstico esperado en la evolución del paciente.

Complementar la evaluación diagnóstica de las neoplasias, la cual se realiza principalmente por citología e histología, incluyendo el estudio citogenético de las mismas, revestiría importancia para completar el perfil de la enfermedad, y ayudar a predecir la evolución y expectativa de vida de los pacientes afectados por estas patologías, pues la ocurrencia de alteraciones

cromosómicas en las células cancerosas se asocia a pronósticos desfavorables.

Por lo tanto se recomienda contemplar la inclusión de los estudios citogenéticos en el diagnóstico de rutina, a fin de completar la descripción de las neoplasias mamaria caninas y ampliar los conocimientos de estas patologías.

Incluir dichos estudios citogenéticos en el diagnóstico de rutina es factible. Para realizarlos se recomienda como métodos de obtención de las muestras: biopsias de los tumores o adquisición del material directamente de cirugía, por la cantidad de material que aporta debido al bajo índice mitótico que presentan las neoplasias mamarias caninas. Y para la identificación de las aberraciones cromosómicas, la tinción Giemsa permitiría el reconocimiento de mutaciones groseras (quiebres y gaps, aneuploidías, euploidías, translocaciones, inversiones pericéntricas, entre otras), mientras que mutaciones más sutiles (deleciones, duplicaciones, inversiones paracéntricas, entre otras) requerirían de otras técnicas como lo son el bandeo G y técnicas de citogenética y genética molecular más complejas.



Ejemplares de *Canis familiaris*



## Bibliografía

---

- Akhtar M, Ashraf A, Huq M, Faulkner C. Fine - Needle Biopsy: comparison of cellular yield with and without aspiration. *Diagnostic Cytopathology* 1989, 5 (2): 162-165.
- Assumpção PP, Seabra DA, Leal FM, Guimarães CA, Calcagno QD, Khayat SA, Smith CMA, Burbano RR. Chromosome instability in carcinomas. *International Journal of Morphology* 2006, 24 (3): 335-338.
- Atkin, NB. Chromosomes in Human Malignant Tumors: a Review and Assessment. En: German J. Chromosomes and Cancer. New York: John Wiley; 1974. p. 375-422.
- Bartnitzke S, Motzko H, Caselitz J, Kornberg M, Bullerdiek J, Schloot, W. A recurrent marker chromosome involving chromosome 1 in two mammary tumors of the dog. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1992, 60 (2): 135-137.
- Bishop JM. Cellular oncogenes and retroviruses. *Annual Review of Biochemistry* 1983, 52: 301-354.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991, 64: 235-248.
- Breen M. Canine cytogenetics-from band to basepair. *Cytogenetic and Genome Research* 2008, 120 (1-2): 50-60.
- Breen M, Langford CF, Carter NP, Holmes NG, Dickens HF, Thomas R, Suter N, Ryder EJ, Pope M, Binns MM. FISH mapping and identification of canine chromosomes. *The Journal of Heredity* 1999, 90 (1): 27-30.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1983, 19: 61-90.
- Burrow AA, Marullo A, Holder LR, Wang YH. Secondary structure formation and DNA instability at fragile site FRA16B. *Nucleic Acids Research* 2010, 38 (9): 2865-2877.
- Cajulis R, Sneige N. Objective comparison of cellular yield in fine-needle biopsy of lymph nodes with and without aspiration. *Diagnostic Cytopathology* 1993, 9 (1): 43-45.

- Casper AM, Nghiem P, Arlt MF, Glover TW. ATR regulates fragile site stability. *Cell* 2002, 111: 779-789.
- Cooper G. Cancer. En: Cooper G. The Cell. A molecular Approach. 2ªed. Madrid: Marbán; 2002. p. 609-648.
- Díez Alonso M, Pérez Piqueras J, Martín Duce A. Marcadores tumorales de valor pronóstico en adenocarcinomas de colon y recto. *Gastroenterología Integrada* 2001, 2 (4): 207-221.
- Escribano GR, Castillo ST, Daher VN, Salazar SC, Tobella LP. Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile* 2009, 20: 20-7.
- Foresti F, Almeida C, Almeida Toledo LAF. A method of chromosome preparations from large fish specimens using "in vitro" short-term treatment with colchicines. *Experientia* 1993, 49: 810-814.
- Foster R. Female Reproductive System. En: Mc Gavin MP, Zachary JF. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ªed. China, Mosby; 2007. p. 1263-1315.
- Fujinaga T, Yamashita M, Yoshida MC, Mizuno S, Tajima M, Okamoto Y, Otomo K. The banding patterns of normal canine chromosomes. *Nippon juigaku zasshi* 1989, 51 (2): 294-299.
- Fundia A, Larripa I. Participación de los sitios frágiles en cáncer. *Medicina* 1996, 56 (6): 727-732.
- Hatanaka T. Contribución a la citogenética de Caninae. [Tesis de Maestría]. San Carlos: Universidad Federal de San Carlos-SP; 1996.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 1980, 36: 1014-1015.
- Kusewitt DF, Rush LJ. Neoplasia and Tumor Biology. En: Mc Gavin MP; Zachary JF. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4ªed. China, Mosby; 2007. p. 253-298.

- Llambí S, Núñez R. Identificación de fragilidad cromosómica mediante 5'azacitidina en linfocitos de bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2007, 39 (1): 63-66.
- Madewell BR. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation and clinical applications. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2001, 15 (4): 334-340.
- Makino S. Human Chromosomes. Tokyo: Igaku Shoin; 1975.
- Marx J. Learning how to suppress cancer. *Science* 1993, 261: 1385-1387.
- Mayr B, Dressier A, Reifinger M, Feil C. Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1998, 59 (1): 69-78.
- Mayr B, Gilli H, Schleger W, Reifinger M, Burtscher H. Cytogenetic characterization of mammary tumors in two domestic dogs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A* 1991, 38 (2): 141-147.
- Mayr B, Kramberger-Kaplan E, Loupal G, Schleger W. Analysis of complex cytogenetic alterations in three canine mammary sarcomas. *Research in Veterinary Science* 1992, 53 (2): 205-211.
- Mayr B, Loupal G, Schleger W. Genetic alterations in four cases of canine mammary tumours: two trisomies, translocations and one tumor suppressor gene p53 mutation. *Revista Archivos de Zootecnia* 1996, 45: 315-321.
- Mayr B, Reifinger M, Weissenböck H, Schleger W, Eisenmenger E. Cytogenetic analysis of four solid tumors in dogs. *Research in Veterinary Science* 1994, 57 (1): 88-95.
- Mayr B, Schleger W, Kalat M, Schweiger P, Reifinger M, Eisenmenger E. Cytogenetic studies in a canine mammary tumor. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1990, 47 (1): 83-87.

- Mellink CH, Bosma AA, Rutteman GR. Cytogenetic analysis of cell lines derived from metastases of a mammary carcinoma in a dog. *Anticancer Research* 1989, 9 (4): 1241-1244.
- Milne BS, Hoather T, O'Brien PCM, Yang F, Ferguson-Smith MA, Dobson J, Sargan D. Karyotype of canine soft tissue sarcomas: a multi-color, multi-species approach to canine chromosome painting. *Chromosome Research* 2004, 12: 825-835.
- Mitelman F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer, 3<sup>a</sup>ed. New York: Liss; 1988.
- Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. Vol 7. 2<sup>a</sup>ed. Washington DC: The Armed Forces Institute of Pathology with The World Health Organization; 1999. p. 58.
- Muñetón Peña CM, Vázquez Trespalacio EM, Durango Calle NE, Martínez Medina J, Ramírez Castro J. Cytogenetic analyses of eight solid tumors and correlation with histopathologic finding. *Patología Revista Latinoamericana* 2004, 42 (2): 65.
- Muñetón Peña CM, Ramírez Castro JL. Revisión de tema citogenética de tumores sólidos. *lateria* 2002, 15 (2): 86-95.
- Nowell PC. Cytogenetics. En: Becker FF. Cancer: A Comprehensive Treatise. Vol 1. 2<sup>a</sup>ed. New Cork: Plenum; 1982. p. 3-46.
- Ochoa-Amaya JE, Pedraza-Castillo LN, Ciuderis-Aponte KA. Carcinoma complejo de glándula mamaria, acantoma queratnizante infundibular y mastocitoma tipo III en un canino. *Revista MVZ Córdoba* 2009, 14 (3): 1844-1855.
- Pathak S, Van Tuinen P, Merry DE. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris* (Mammalia, Canidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* 1982, 34: 112-118.

- Perez Alenza MD. Influencia de la nutrición: alteraciones genéticas y aspectos clínicos en los tumores de mamaros caninos. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1994.
- Pienkowska A, Switonski M. Chromosomal localization and activity of nuclear organizer regions in the dog (*Canis familiaris*). *Genetics Selection Evolution* 1998, 30: 79-84.
- Rashid F, Ul Haque A. Nuclear morphological and morphometric features of reactive versus neoplastic gastric mucosa. *International Journal of Pathology* 2009, 7 (2): 66-72.
- Ray GN, Shahid M, Husain SA. Status of chromosome breaks and gaps in breast cancer: a follow-up study. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001, 130: 155-159.
- Reimann N, Nolte I, Bonk U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Cytogenetic investigation of canine lipomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1999, 111 (2): 172-174.
- Reimann N, Rogalla P, Kazmierczak B, Bonk U, Nolte I, Grzonka T, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Evidence that metacentric and submetacentric chromosomes in canine tumors can result from telomeric fusions. *Cytogenetic and Genome Research* 1994, 67: 81-85.
- Rosciani AS, Montenegro MA, Merlo WA, Pérez Ganeselli MR, Maccio AO, Sánchez Negrette M. Diagnóstico citológico en diferentes especies animales. EN: XV Sesión de Comunicaciones Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Corrientes. UNNE. 1994.
- Rønne M, Poulsen BS, Shibasaki Y. NOR association in *Canis familiaris*. *Genetic Selection Evolution* 1991, 23 (1): 191s-195s.
- Rutteman GR, Cornelisse CJ, Dijkshoorn NJ, Poortman J, Misdorp W. Flow cytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Research* 1988, 48: 3411-3417.
- Sandberg AA. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. New York: Elsevier Science Publishing; 1979.

- Sandberg AA. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. 2<sup>a</sup>ed. New York: Elsevier Science Publishing; 1990.
- Sandberg AA, Sakurai M. Chromosomes in the Causation and Progression of Cancer and Leukemia. En: Busch H. The Molecular Biology of Cancer. New York: Academic; 1974. p. 81-106.
- Shibasaki Y, Poulsen BS, Johansen B, Rønne M. Banding studies in *Canis familiaris*. II. Nucleolar organizer regions and NOR association. *In Vivo* 1990, 4 (4): 243-246.
- Slota E, Danielak-Czech B, Pietrasszewska J, Kozubska A. Preliminary identification of the fragile X in two crossbred cows. *Veterinární medicína* 2000, 45: 308-310.
- Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. En: Robbins Patología Humana. España: Elsevier. 6<sup>a</sup>ed. 2008. p. 179-230.
- Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 1972, 75 (1): 304-306.
- Sutherland G, Baker E, Richards R. Fragile sites still breaking. *Trends In Genetics* 1998, 14: 501-506.
- Therman E, Susman M. Cromosomas Humanos. Estructura. Comportamiento y Efectos. 3<sup>a</sup>ed. Ribeirao Preto: Revista Brasileira de Genética; 1996. p. 404.
- Willis RA. The Spread of Tumors in the Human Body. London: Butterworth & Co, 1952.
- Yunis JJ, Soreng L. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 1984, 226: 1199-1204.