

Presença da mutação do gene BRCA1 em cadelas com tumores mamários malignos

Presence of BRCA1 Gene Mutation in Bitches with Malignant Mammary Tumors

Camila Calvi Menegassi Ferreira¹, Steffhano Luis Cândido¹, Luciana Maria Curtio Soares²,
Matias Bassinello Stocco², Andresa de Cássia Martini³, Lianna Ghisi Gomes¹,
Luciano Nakazato¹ & Roberto Lopes de Souza¹

ABSTRACT

Background: Mammary tumors (MTs) in bitches are similar to breast cancers in women. Thus, they can be used as a model for human breast cancer and findings can be extrapolated for use in human medicine. BRCA1 is a tumor suppressor gene. When the gene has a mutation, it cannot repair damaged DNA, which causes genetic instability and tumorigenesis. Therefore, we aimed to study the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the BRCA1 gene that are associated with distinct histological types of malignant MT in bitches.

Materials, Methods & Results: The study population consisted of 91 bitches, including a control group of 6 animals with healthy mammary glands and 85 animals with MTs. All animals underwent a presurgery evaluation consisting of a questionnaire administered to the person responsible for the animal, a physical examination, collection of peripheral blood for hematological and serum biochemistry evaluations, an electrocardiogram, and a preanesthesia evaluation. In addition, distant metastasis was studied via chest radiography and abdominal ultrasound. After evaluations were complete, the animals that could undergo surgery were administered general anesthesia and underwent a mastectomy or mammary gland sample collection. Histopathological examination and molecular analysis were performed to identify mutations in the BRCA1 gene. Histopathological examinations found 10 different types of malignant tumors in 36 sick animals. Tumor samples plus samples from the 6 control animals were subjected to DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) analysis, and genetic sequencing. The tumor with the highest incidence (33.33%) was a complex carcinoma, followed by carcinoma in mixed tumor (13.88), tubular carcinoma (13.88) and carcinosarcoma (13.88). Molecular analysis revealed 3 different SNP points in 5 samples (4006G>A, 3619A>G, and 3761C>T). The allelic variant 4006G>A (1/36) resulted in the alteration of the amino acid valine by isoleucine (V1336 I). The mutation 3619A>G (2/36) inserted the amino acid alanine instead of threonine (T1207 A). The mutation 3761C>T (2/36) led to the alteration of the amino acid serine by phenylalanine (S1254 F), a mutation for which there are no published reports. The histological types that showed BRCA1 mutations were complex carcinoma (1/5), carcinoma in mixed tumor (1/5), papillary carcinoma (1/5) and tubular carcinoma (2/5). Software analysis identified the new SNP (nucleotide 3761) in BRCA1 and 2 point mutations in nucleotides 4006 and 3619 and responsible for genetic instability.

Discussion: The development of breast cancer is caused by many endogenous and exogenous factors. The results of our study show that these factors have a greater presence in female, mixed breed, uncastrated, and older dogs, confirming the data in the veterinary literature. In the present study, we found different histological types of malignant breast tumors with mutations in the BRCA1 gene, as other authors have reported. However, we also found the mutation 3761C>T, which, to the best of our knowledge, has not been reported in the literature. This shows the need for studies in veterinary medicine that assess mutations in the BRCA1 gene and the most common histological types. In conclusion, SNPs in the BRCA1 gene cause genetic instability, resulting in additional mutations that lead to the development of breast tumors. They are point mutations that affect transcription, resulting in truncated proteins. These proteins may have a loss of function, leading to carcinogenesis.

Keywords: polymorphism, BRCA1 gene, cancer, dogs.

Descritores: polimorfismo, gene BRCA1, câncer, cães.

DOI: 10.22456/1679-9216.116617

Received: 3 July 2021

Accepted: 15 August 2021

Published: 17 September 2021

¹Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brazil. ²M.V. Autônomo, Cuiabá. ³Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES), Mineiros, GO, Brazil. CORRESPONDENCE: L.G. Gomes [liannaghisi@gmail.com]. Hospital Veterinário - UFMT. Av. Fernando Côrrea da Costa n° 2367. CEP 78060-900 Cuiabá, MT, Brazil.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) em animais de companhia apresenta crescimento contínuo em virtude do aumento na expectativa de vida, à semelhança dos seres humanos [23]. O CM em cadelas apresenta similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas com as neoplasias mamárias da mulher [9,11], sendo considerado um ótimo modelo em estudos comparativos.

Fatores endógenos e exógenos influenciam no desenvolvimento da doença, surgindo devido alterações genéticas que impactam na proliferação celular, promovendo a divisão ou inibindo a morte celular [8]. Consequentemente, o resultado final desses erros genéticos acumulados são células capazes de multiplicarem-se sem restrição invadindo o tecido [17].

O BRCA1 está associado ao desenvolvimento de tumores mamários [1,11,18,19]. Localizado no cromossomo 17q21 e codifica uma proteína nuclear de 220 kDa que participa da regulação do ciclo celular das células epiteliais da glândula mamária [22]. Vários estudos descrevem a expressão da proteína ou mutação do BRCA1 em tumores mamários caninos [2,7,13,15,18,19,24]. No entanto seu papel na patogênese ainda é desconhecida, os níveis de expressão e localização do BRCA1 são diferentes quando comparados entre as glândulas mamárias normais e as com tumores benignos e malignos [6,13].

Estudos demonstram que o BRCA1 está presente em cães com tumores mamários. No entanto, há escassez de literatura de base epidemiológica e molecular sobre tais mutações. Baseado nisto, objetivou-se descrever a frequência de polimorfismos no gene BRCA1 associados a tumores mamários malignos diagnosticados em cadelas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

A população do estudo foi composta por 91 cadelas oriundas da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET/UFMT), campus Cuiabá. O grupo controle, foi composto por animais que possuíam glândulas mamárias saudáveis, sendo formado por 6 cadelas que foram submetidas ao procedimento cirúrgico de ovariosalpingohisterectomia eletiva (OSH), e então coletou-se um fragmento de glândula mamária para análise histológica e molecular. Os animais diagnosticados com tumor mamário, 85 cadelas,

foram submetidos a exames clínico e complementares e então procedeu-se com a mastectomia, após houve a confirmação da doença no resultado histopatológico e posteriormente realizou-se análise molecular para pesquisa de mutações no gene BRCA1.

As pacientes que apresentaram durante os exames pré-operatório presença de metástases em estágio avançado, não foram recomendadas para a realização do procedimento cirúrgico.

Delineamento experimental

Todos os animais foram submetidos a avaliação pré-cirúrgica, composta por questionário dirigido ao responsável que continha diversas informações relacionadas as pacientes. Também foi realizada a colheita de sangue periférico para avaliação hematológica e de bioquímica sérica (perfil hepático e renal), além das avaliações eletrocardiográficas e pré-anestésicas para escolha adequada do protocolo anestésico com o objetivo de oferecer segurança e analgesia cirúrgica. Adicionalmente, a pesquisa de metástase à distância foi realizada por meio de radiografia torácica e ultrassonografia abdominal. A escolha da técnica cirúrgica a ser realizada e a quantidade de tecido mamário a ser extirpado foi dependente do tamanho do tumor, localização e estado geral do paciente [3].

Análise Laboratorial

A cadeia mamária extirpada em procedimento cirúrgico foi enviada, por completo, ao Laboratório de Patologia Animal da UFMT, onde foram retirados fragmentos de todas as glândulas mamárias da cadeia, identificadas e armazenadas em duplicata em eppendorf a -80°C, até posterior utilização. Outra porção das amostras das glândulas mamárias foram fixadas em formalina 10% por um período de 24 h, os tecidos de interesse foram seccionados e processados rotineiramente, incluídos em blocos de parafina, cortados a 5 µm e corados pela técnica de H&E¹, para diagnóstico histopatológico.

Para a análise molecular, as amostras de tecido mamário foram submetidas à extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio [21]. As padronizações na reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas segundo protocolo já descrito na literatura [15]. As reações foram realizadas em Termociclador ProFlex PCR System² em um volume final de 25 µL (2 µL de DNA, 0.5 µL Platinum[®] Taq DNA polimerase³, 5.0 µL dNTP, 0.5 µL MgCl₂, 2.5 µL tampão PCR 10x [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl], 1 µL de primer e 13.5 µL de H₂O).

As reações foram submetidas a temperatura de 95°C por 4 min para desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos incluindo 94°C por 30 s, temperatura de anelamento 55°C por 30 s, finalizando com 72°C durante 1 min e uma fase de extensão final de 72°C durante 10 min. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo das reações, e DNA confirmado por sequenciamento, como controle positivo. O marcador de massa molecular utilizado foi o Ladder 100pb⁴.

Os produtos obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.0%, corados com GelRedTM⁵ a 10 V/cm e visualizados em fotodocumentador ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image Lab™ e posteriormente purificados com enzimas ExoStar1step⁶, conforme instruções do fabricante.

O sequenciamento genético foi realizado conforme instruções do próprio fabricante, no equipamento ABI35002. As sequências obtidas foram confrontadas com o banco de dados de DNA presente no algoritmo BLAST a partir do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia na Biblioteca Nacional de Medicina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Os primers utilizados para amplificação e sequenciamento do DNA (Acesso GenBank N°: NC_006591 e NM_001013416) estão codificados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de Primer utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético para pesquisa da presença da mutação do gene BRCA1 em cadelas com tumores mamários malignos.

Sequência do Primer	Tamanho	Região
F: CTCTCCATGTCTGATTTTCAG	782 bp	éxon 9
R: AGGCATCAACAGTTAGCTC		

RESULTADOS

Foram atendidas e submetidas à cirurgia 85 cadelas doentes e 6 saudáveis. Destas, 36 pacientes doentes apresentaram no exame histopatológico 10 tipos diferentes de tumores malignos (Tabela 2).

Entre as 36 cadelas diagnosticadas com tumores mamários malignos, foram encontradas 8 raças diferentes. Os cães mais acometidos nesse estudo foram os sem raça definida (41,66%), seguido dos Poodles (22,22%) e Pinscher (13,88%). Outras raças, Pitbull (8,33%), Rottweiler (5,55%), Dachshund (2,77%), Pastor Alemão (2,77%) e Dálmata (2,77%), com menor incidência também foram acometidas. A idade média das pacientes foi de 9,71 anos (variando entre 3 a 16 anos de vida).

Das pacientes que apresentaram neoplasia mamária, 78% eram inteiras, ou seja, apenas 22% das cadelas eram castradas. Não foi possível formular dados sobre qual período da vida da paciente ela foi submetida à castração, uma vez que, a maioria dos responsáveis pelos animais não souberam informar com precisão. Segundo o questionário, 16% das cadelas fizeram uso de contraceptivos em algum período de sua vida.

Foram realizadas 42 extrações de DNA, PCR e sequenciamento genético, sendo 36 amostras de cadelas com tumores mamários malignos e 6 do grupo controle. As 6 amostras do grupo controle não apresentaram nenhum ponto de mutação no gene BRCA1.

Das 36 amostras de cadelas com tumores mamários malignos submetidos ao sequenciamento genético, foram encontrados 3 pontos distintos (Tabela 3) de mutações (4006G > A, 3619A > G e 3761C > T), em 5 pacientes. O polimorfismo no nucleotídeo 4006G > A (1/36) teve como consequência a alteração do aminoácido valina por isoleucina (V1336 I). A mutação do nucleotídeo 3619A > G (2/36) inseriu o aminoácido alanina, ao invés de treonina (T1207 A). E a mutação no nucleotídeo 3761C > T (2/36), levou a alteração do aminoácido serina por fenilalanina (S1254 F), mutação a qual, não há relatos ainda na literatura.

Os tipos histológicos que apresentaram mutações no BRCA1 foram carcinoma complexo (1/5), carcinoma mamário em tumor misto (1/5), carcinoma mamário papilífero (1/5) e carcinoma mamário tubular (2/5).

Tabela 2. Diagnóstico histopatológico de distintos tumores malignos encontrados em 36 pacientes submetidas à procedimento cirúrgico de mastectomia, para posterior análise e pesquisa da presença da mutação do gene BRCA1.

Tipo de Tumor	N
Carcinoma Mamário Complexo	12
Carcinoma mamário em Tumor Misto	5
Carcinoma Mamário Tubular	5
Carcinossarcoma	5
Carcinoma Mamário Papilífero	3
Carcinoma Mamário Tubulopapilífero	2
Carcinoma mamário Ductal	1
Carcinoma Anaplásico	1
Carcinoma Mamário Sólido	1
Fibrossarcoma Mamário	1
Total	36

Tabela 3. Alterações causadas pelas mutações do gene BRCA1 em cadelas com tumores mamários malignos.

Posição do Nucleotídeo	Alteração do Aminoácido	Avaliação PolyPhen
3761	S1254 F	Prejudicial
4006	V1336 I	Prejudicial
3619	T1207 A	Benigna

DISCUSSÃO

O desenvolvimento do câncer de mama possui aspectos multifatoriais, assim algumas raças de cães apresentam uma maior incidência devido aspectos genéticos [1]. Diversos estudos epidemiológicos de CM em cadelas realizados fora do Brasil, apontam os cães de raças puras com maior incidência de tumores malignos quando comparado com cães sem raça definida [2,24,25], assim como descrito na população de English Springer Spaniels da Suécia, que possui um desequilíbrio genético acarretando no desenvolvimento de tumores mamários em 36% da população [18,19,25]. Tais dados diferem do presente estudo, pois evidenciamos maior diagnóstico de neoplasias mamárias malignas em pacientes sem raça definida; no entanto devemos considerar que os cães sem raça definida correspondem em grande parte da casuística atendida no HOVET/UFMT, devido ao padrão socioeconômico da população atendida e consequente predisposição da mistura de raças existentes desta região.

Estudos epidemiológicos brasileiros [14,16] apontam as raças Dachshund, Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel e Pinscher como as mais prevalentes para o desenvolvimento de CM, o que discorda dos dados encontrados e reforça a ideia de que o fator regional reflete apenas a população estudada, justificando a maior ocorrência de cães sem raça definida no presente estudo.

A idade das cadelas acometidas apresentou média de 9,71 anos, corroborando com o descrito na literatura [2,14,16,18,25], onde já se tem dados concretos de que é uma doença que acomete cães adultos e idosos, exceto raças com predisposição genéticas, como a população de cadelas suecas English Springer Spaniel, que desenvolvem de forma precoce a doença, a partir dos 7 anos de idade [18,25].

Todos pacientes incluídos no estudo, foram do sexo feminino, resultado já esperado; uma vez que diversos autores relatam que a incidência de CM

em machos é inferior a 1%, e quando ocorrem estão associados a alterações hormonais [12,20].

A literatura relata que o CM ocorre com maior incidência em cadelas não castradas [2,18,25], pois apresenta alta correlação com a exposição hormonal [14], particularmente o estrógeno e a progesterona, achados que corroboram os resultados obtidos no presente estudo, que observou incidência de 78% de CM em fêmeas inteiras.

O procedimento de OSH realizado antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento de tumores mamários para 0,5%, sendo que este risco aumenta significativamente de 8% a 26% nas fêmeas castradas após o primeiro e o segundo ciclos estrais, consecutivamente [20]. Nosso estudo apresentou um viés, pois os responsáveis pelas pacientes não souberam informar qual a idade em que o procedimento foi realizado.

No presente estudo foram diagnosticados diferentes tipos histológicos de tumores mamários malignos que apresentaram mutações no gene BRCA1. Uma pesquisa realizada na Coreia com 139 tumores mamários de origem maligna também verificou alterações na expressão de BRCA1 [5]. Portanto, é importante destacar a carência de estudos na medicina veterinária que avaliam mutações no gene BRCA1 e os tipos histológicos mais encontrados.

O BRCA1 é considerado um gene supressor tumoral porque mutações nele levam a um defeito no reparo de danos ao DNA e uma instabilidade genética que favorece a tumorigênese. De todos os casos de CM em mulheres, 3 a 5% estão associados com mutações no gene BRCA1 [4,26]. Adicionalmente, em humanos tais mutações apresentaram perfil fenotípico característico, tipicamente carcinomas pouco diferenciados, com alta taxa proliferativa [10,26]. Já foi relatada uma incidência de 86% de carcinomas ductais em mulheres com mutações no gene BRCA1 [26], situação que difere dos dados do presente estudo, pois a paciente que apresentou carcinoma mamário ductal não exibiu mutações na análise molecular.

Entre as 36 amostras submetidas ao sequenciamento genético, foram encontrados 3 pontos de mutações não sinônimas, em 5 cadelas. Essas variações genéticas possuem efeitos no desenvolvimento de tumores. A alteração de um códon pode causar alteração na estrutura da proteína ou até mesmo de sua função, como nas mutações não sinônimas analisadas neste trabalho, que causam efeitos sobre a transcrição.

Corroborando com outra pesquisa [2] que encontrou mutação na região codificadora no éxon 9 do gene BRCA1 em tipos histológicos distintos de carcinomas em cães, entre eles carcinomas mamários complexo, tubulopapilífero e simples.

Na literatura há relatos de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), nos nucleotídeos 4006 (G>C) e 3619 (A>G), em uma amostra de cadela com tumor mamário maligno dentre 15 avaliadas [15]. Neste trabalho também foi encontrado SNP em nucleotídeo 4006 (G>C), que teve como consequência alteração do aminoácido valina por leucina, sendo ambos os aminoácidos hidrofóbicos, com pesos moleculares semelhantes, e sendo esta substituição responsável pela perda da estrutura da proteína, e classificada pelo software Polyphen como prejudicial.

Em 2 amostras de tecido mamário maligno foi identificado polimorfismo no nucleotídeo 3619 (A>G), que causou alteração do aminoácido treonina por alanina. Treonina é um aminoácido hidrofílico, e alanina hidrofóbico. Pela análise do software PolyPhen esta substituição não causa perda da função proteica de BRCA1, sendo classificado pelo mesmo, como benigna, como observado anteriormente [15].

Em outras 2 amostras de tecido mamário maligno, houve polimorfismo de nucleotídeo simples em 3761 (C>T), substituindo o aminoácido serina por fenilalanina, causando perda da função da proteína e permitindo a tumorigênese. Polimorfismo classificado como prejudicial, que até então, possui descrição inédita na literatura.

CONCLUSÃO

A identificação de 1 novo SNP (nucleotídeo 3761) em BRCA1, e 2 pontos de mutações nos nucleotídeos 4006 e 3619 foram responsáveis por causarem instabilidade genética. Contudo, vale ressaltar que a inativação de um gene BRCA1 não promove o início do tumor diretamente, mas que a instabilidade genética resulta no acúmulo de mutações adicionais em vários outros genes. Adicionalmente, os pontos encontrados de SNPs no presente trabalho favorecem o aparecimento de tumores mamários, uma vez que são mutações pontuais, que vão afetar a transcrição, causando proteínas truncadas, que podem apresentar perda de suas funções, levando ao processo de carcinogênese.

MANUFACTURERS

¹Química Especializada Erich Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

²Life Technologies - Thermo Fisher Scientific®. Carlsbad, CA, USA.

³Invitrogen - Thermo Fisher Scientific®. Waltham, MA, USA.

⁴Ludwig Biotecnologia Ltda. Alvorada, RS, Brazil.

⁵Biotium®. Fremont, CA, USA.

⁶GE Healthcare. Chicago, IL, USA.

Ethical approval. This study was approved by Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of the Federal University (UFMT), under protocol number 23108.059837/2014-76, and consent was obtained from the owners of the patients.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Borge K.S., Borresen-Dale A.L. & Lingaas F. 2011. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*. 9(4): 241-250. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2010.00250.x.
- 2 Enginler S.O., Akis I., Toydemir T.S.F., Oztabak K., Haktanir D., Gündüz M.C., Kirşan I. & Firat I. 2014. Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Veterinary Research Communications*. 38(1): 21-27. DOI: 10.1007/s11259-013-9577-7.
- 3 Fossum T.W. 2008. Cirurgia de Pequenos Animais. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.702-774.
- 4 Gomes M.C.B., Costa M.M., Vieira R., Gomes-Filho F.A., Koifman S., Koifman R.J., Sun P. & Narod S.A. 2011. Prevalência da mutação BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. 8(27): 24-28.
- 5 Im K.S., Kim I.H., Kim N.H., Lim H.Y., Kim J.H. & Sur J.H. 2013. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *The Veterinary Journal*. 195(3): 366-372. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.07.014.
- 6 Kim J.H., Yu C.H., Yhee J.Y., Im K.S. & Sur J.H. 2010. Lymphocyte infiltration, expression of interleukin IL-1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 142(2-3): 177-186. DOI: 10.1016/j.jcpa.2009.10.023.

- 7 Klopffleisch R. & Gruber A.D. 2009. Increased expression of BRCA2 and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. *Veterinary Pathology*. 46(3): 416-422. DOI: 10.1354/vp.08-VP-0212-K-FL.
- 8 Lana S.E, Rutteman G.R. & Withrow S.J. 2007. Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J. & Vail D.M. (Eds). *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. St. Louis: Saunders, pp.619-636.
- 9 Lee C.H., Kim W.H., Lim J.H., Kang M.S., Kim D.Y. & Kweon O.K. 2004. Mutation and overexpression of p53 as prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*. 5(1): 63-69.
- 10 Marafon C.M. 2007. Genética do câncer de mama hereditário. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 6(1): 86-90.
- 11 Melin M., Rivera P., Arendt M., Elvers I., Murén E., Gustafson U., Starkey M., Borge K.S., Lingaas F., Häggström J., Saellström S., Rönnberg H. & Lindblad-Toh K. 2016. Genome-wide Analysis Identifies Germ-line risk factors associated with canine mammary tumours. *PLoS Genetics*. 12(5): e1006029. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006029.
- 12 Misdorp W. 2002. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Ames: Iowa State Press, pp.575-606.
- 13 Nieto A., Péres-Alenza M.D., Del-Castillo N., Tabanera E., Castaño M. & Peña L. 2003. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: Relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology*. 128(4): 260-268. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0631.
- 14 Oliveira J.C.F., Kommers G.D., Masuda E.K., Marques B.M.F.P.P., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2010. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(2): 177-185. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000200014.
- 15 Qiu H. & Lin D. 2016. Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 78(6): 943-949. DOI: 10.1292/jvms.15-0557.
- 16 Ribas C.R., Dornbusch P.T., Faria M.R., Wouk A.F.P.F. & Ciro S.M. 2012. Alterações Clínicas relevantes em cadelas com neoplasias mamárias estadiadas. *Archives of Veterinary Science*. 17(1): 60-68.
- 17 Rieger P.T. 2004. The biology of cancer genetics. *Seminars in Oncology Nursing*. 20(3): 145-154. DOI: 10.1053/j.soncn.2004.04.001.
- 18 Rivera P., Melin M., Biagi T., Fall T., Häggström J., Lindblad-Toh K. & Von-Euler H. 2009. Mammary tumor development in Dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Molecular Biology, Pathobiology and Genetics*. 69(22): 8770-8774. DOI: 10.1158/0008-5472.
- 19 Rivera P. & Von-Euler H. 2011. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology*. 48(1): 132-146. DOI: 10.1177/0300985810387939.
- 20 Rutteman G.R., Withrow S.J. & MacEwen E.G. 2001. Tumors of the mammary gland. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Small Animal Clinical Oncology*. 3rd edn. Philadelphia: Saunders, pp.455-477.
- 21 Sambrook J. & Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp.8.18-8.113.
- 22 Silva A.R., Garcia S.B., Chahud F. & Zucoloto S. 2005. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do BRCA1 nos carcinomas mamários esporádicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41(3): 197-203. DOI: 10.1590/S1676-24442005000300010.
- 23 Thuróczy J., Reisvaag G.J.K., Perge E., Tibold A., Szilágyi J. & Balogh L. 2007. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 137(2-3): 122-129. DOI: 10.1016/j.jcpa.2007.05.005.
- 24 Tsuchida S., Ikemoto S. & Tagawa M. 2001. Microsatellite Polymorphism in Intron 14 of the Canine BRCA1 Gene. *Journal of Veterinary Medical Science*. 63(4): 479-481. DOI: 10.1292/jvms.63.479.
- 25 Vascellari M., Capello K., Carminato A., Zanardello C., Baioni E. & Mutinelli F. 2016. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Preventive Veterinary Medicine*. 1(126): 183-189. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.02.008.
- 26 Walsh E.M., Farrell M.P., Nolan C., Gallagher F., Clarke R., McCaffrey J.A., Kennedy M.J., Barry M., Kell M.R. & Gallagher D.J. 2016. Breast cancer detection among Irish BRCA1 & BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Irish Journal of Medical Science*. 185(1): 189-194. DOI: 10.1007/s11845-015-1267-8.