

## Expresión del gen *BRCA 1* y *2* en neoplasias mamarias de perras (*Canis lupus familiaris*) y su asociación con parámetros clínico-patológicos

*BRCA 1* and *2* gene expression in bitches (*Canis lupus familiaris*) mammary tumors and its association with clinical-pathological parameters

<sup>1</sup>Yaritzza Josefina Salas Araujo, <sup>3</sup>Laura Patricia Romero Romero, <sup>2</sup>Adelys Antonio Márquez Alvarado, <sup>4</sup>Rogelio Alejandro Alonso Morales.

<sup>1</sup>Área de Patología y <sup>2</sup>Área de Fisiología del Decanato de Ciencias Veterinarias Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela. <sup>4</sup>Departamento de Genética y Bioestadística y <sup>3</sup> Departamento de Pathología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Email: \*[ysalas@ucla.edu.ve](mailto:ysalas@ucla.edu.ve), +58-414-0562733, ORCID 0000-0003-2129-3124, [adelism@ucla.edu.ve](mailto:adelism@ucla.edu.ve), ORCID 0000-0002-1717-7596, [lromeror@unam.mx](mailto:lromeror@unam.mx), ORCID 0000-0001-6286-6043, [ralonsom@unam.mx](mailto:ralonsom@unam.mx), ORCID 0000-0002-4159-1682.

### RESUMEN

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mama 1 y 2 (*BRCA 1* y *2*) son genes supresores de tumor, responsables de la reparación del DNA dañado. Investigar los niveles de expresión del *BRCA 1* y *2* y asociarlo a la expresión de proteínas involucradas en el cáncer de mama en perras, será de gran utilidad para los avances en el estudio del cáncer de mama tanto en la mujer como en perras. El objetivo del presente estudio consistió en determinar la expresión, a través de PCR tiempo real en tejido mamario neoplásico, del gen *BRCA 1* y *2* y su asociación con parámetros clínico-patológicos en perras Cocker, Poodle y Mestizas. Se realizó PCR tiempo real y se cuantificó el nivel de expresión del *BRCA 1* y *2* normalizado con  $\beta$ -actina, a través del método 2 Delta Delta CT. Se observó que el *BRCA 1* no se asocia con parámetros clínico-patológicos y no es un indicador de malignidad en perras Cocker, Mestizas y Poodle. El *BRCA 2* se encuentra en baja expresión en los tumores mamarios de perras Cocker y Mestiza, y está asociado con positividad al ER $\alpha$ . Se concluye que la expresión del *BRCA 1* y *2* en el tumor mamario en perras resulta heterogénea por individuo. Teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama, su estudio puede aportar mayor información en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad. **Palabras claves:** *BRCA1*, *BRCA 2*, tumor mamario, perras, qPCR.

### ABSTRACT

Breast cancer susceptibility genes 1 and 2 (*BRCA 1* and *2*) are tumor suppressor genes responsible for repairing damaged DNA. Investigating the expression levels of *BRCA 1* and *2* and associating it with the expression of proteins involved in breast cancer in dogs will be very useful for advances in the study of breast cancer in both women and dogs. The objective of the present study was to determine the expression, through real-time PCR in neoplastic mammary tissue, of the *BRCA 1* and *2* gene and its association with clinical-pathological parameters in Cocker, Poodle and crossbred bitches. Real-time PCR was performed and the level of expression of *BRCA 1* and *2* normalized with  $\beta$ -actin was quantified through the 2 Delta Delta CT method. It was observed that *BRCA 1* is not associated with clinical-pathological parameters and is not an indicator of malignancy in Cocker, Crossbred and Poodle bitches. *BRCA 2* was found in low expression in the mammary tumors of Cocker and Mestiza bitches, and is associated with ER $\alpha$  positivity. It is concluded that the expression of *BRCA 1* and *2* in the mammary tumor is heterogeneous by individual. Taking into account the family inherited nature of the gene in the development of breast cancer, its study can provide more information in those races with a clear predisposition to the disease. **Keywords:** *BRCA 1*, *BRCA 2*, mammary tumor, bitches, qPCR.

## INTRODUCCIÓN

El tumor mamario es considerado un desorden multifactorial causado tanto por elementos genéticos, como no genéticos. Entre los factores genéticos se ha descrito la activación de oncogenes que llevan a sobre-expresión de proteínas que estimulan la proliferación celular, así como a la pérdida de función de genes supresores de tumor, producto de una mutación o una delección. Tanto la sobre-expresión y la pérdida de función de dichos genes trae como consecuencia aumento en la probabilidad de desarrollar un tumor [1].

Los genes de susceptibilidad al cáncer de mamá (*BRCA* en inglés) *1* y *2* son genes supresores de tumor. Mutaciones en estos genes son responsables de fallas en la reparación por procesos de recombinación homóloga (HR) de rupturas del DNA de doble cadena (DSBs), favoreciendo la carcinogénesis [2]. Además participan en puntos de control del crecimiento celular y conservación de la integridad genómica [3]. Se ha establecido que mujeres con mutaciones en el *BRCA1* generalmente presentan tumores de alto grado histológico, RE negativo, expresión de *erbB2* negativo, *p53* positivo y es poco común en carcinoma *in situ*. A diferencia de aquéllas con fenotipo mutacional *BRCA 2* que suelen ser de grado histológico intermedio a alto, RE positivo, *erbB2* negativo, expresión de *p53* positiva y son comunes en carcinomas insipientes [4].

Utilizando SNPs para genotipificar perras Springer Spaniel Inglés (ESS), observaron asociación del tumor mamario (TM) con los *BRCA 1* y *BRCA 2*. Las perras ESS fenotipo *BRCA 1* y *BRCA 2* mostraron mayor riesgo a padecer TM y una asociación importante del TM maligno con el gen *BRCA 1* [5].

Establecer las alteraciones en la expresión del *BRCA* a través de técnicas

diagnósticas disponibles y de rápida respuesta, como puede resultar hoy día una PCR, es una alternativa poco estudiada en Medicina Veterinaria, haciendo necesaria la continua investigación en busca de la expresión del gen y sus posibles mutaciones, así como su interacción con otras proteínas para comprender el mecanismo mediante el cual estos genes influyen en el desarrollo y la malignidad de la enfermedad.

Por lo tanto, investigar los niveles de expresión de *BRCA 1/2* y asociarlo a la expresión de proteínas involucradas en el cáncer de mama en perras, abre una abanico de posibilidades en el estudio del cáncer de mama, tanto en la mujer como en perras; teniendo en cuenta que las perras han demostrado ser un excelente modelo comparativo dado el alto grado de homología entre la secuencia de su genoma con la contraparte humana, así como las similitudes con respecto a la morfología, comportamiento biológico, y curso clínico de los tumores mamarios en ambas especies [6, 7].

La identificación de factores genéticos es fundamental para mejorar la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. Los avances en biología molecular proporcionan herramientas que permiten caracterizar la influencia genética en diversas enfermedades [6]. A partir del TM como modelo animal, los estudios pueden enfocarse en explicar la interacción entre el factor de riesgo ambiental y las causas poligénicas de los tumores de mama en ambas especies, y obtener mejores resultados en su tratamiento.

El presente estudio tuvo como objetivos: Determinar la expresión de *BRCA 1* y *2* por cuantificación relativa a través de PCR tiempo real, en el tejido mamario neoplásico de perras Cocker, Mestizas y Poodle. Asociar la expresión del gen *BRCA 1* y *2* con parámetros clínico-patológicos: A) Comportamiento biológico, tamaño, índice de

proliferación celular ki67, expresión de RE $\alpha$ , erbB2 y sub-tipo molecular del tumor. B) La edad y sobrevida de las pacientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra

La población de estudio consistió en 80 pacientes que fueron sometidas a nodulectomía o mastectomía por neoplasia mamaria, atendidas en el Hospital Veterinario de Especialidades, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), durante el lapso comprendido entre febrero de 2012 y octubre de 2013. Cuyos especímenes quirúrgicos fueron referidos al Departamento de Patología de la Facultad.

En la estadía intrahospitalaria, las pacientes fueron mantenidas de acuerdo a las normas de biética y bioseguridad del Hospital Veterinario de Especialidades de FMVZ de la UNAM.

La muestra estuvo representada por 45 biopsias de los tumores mamarios provenientes de las perras cuya raza son más frecuentemente afectadas por el TM. Consistió en: 15 tumores (10 benignos y 5 malignos) de perras Cocker, 20 tumores (10 benignos y 10 malignos) de Poodle y 10 de perras Mestizas (3 benignos y 7 malignos). Como control se utilizaron 10 fragmentos de tejido mamario sano de perras adultas, no castradas, de las diferentes razas evaluadas.

### Expresión del gen *BRCA 1* y *2* en tumores mamarios

La purificación del RNA, síntesis de cDNA y PCR tiempo real para el *BRCA* de perras, se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de

Genética y Bioestadística de la FMVZ-UNAM. El protocolo seguido consistió en:

**Purificación del RNA:** se realizó a través de columnas de RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN® catálogo 74704), cuyo principio consiste en aislar RNA total mediante la combinación de lisis del tejido con isotiocianato de guanidina y el uso de filtros de sílice, asimismo, integra fases de digestión a través de proteinasa K, DNasa y RNasa con el fin de obtener un mRNA total de alta calidad.

**Síntesis de cDNA y PCR tiempo real:** la síntesis del cDNA se realizó con el Kit RT<sup>2</sup> HT First Strand de QIAGEN® (catálogo 330411), que ofrece un procedimiento rápido y conveniente para una eficiente síntesis de cDNA y la eliminación de DNA genómico de las muestras de RNA. El cDNA sintetizado se utilizó para PCR tiempo real, el cual, con el objetivo de determinar la expresión de *BRCA 2* en los tumores mamarios y tejido normal de las perras en estudio, se llevó a cabo mediante el uso de un Rotor-Geen QIAGEN® con el kit para RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay SYBR QIAGEN® para *BRCA 2* de perro (catálogo PPF00706A). Como gen constitutivo se usó  $\beta$ -actina de perro (Dog, catálogo PPL02472A).

**Cuantificación relativa:** se realizó la cuantificación relativa mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Para este método la cantidad de la expresión génica es igual a  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , definida como el cambio en la expresión de un gen de interés en relación con un grupo de referencia, tales como control no tratado o una muestra de tiempo cero en el estudio. Se requiere seleccionar un control interno y el calibrador; el propósito del control interno es normalizar las PCRs para la cantidad de RNA adicionada en la retrotranscripción. Los datos se presentan como el cambio en la expresión génica normalizada a un gen endógeno de referencia y en relación con la expresión del gen de interés en los casos control. Para este método

de cuantificación relativa se requiere considerar: a) Seleccionar el gen de control interno, b) Validar el control interno para constatar que éste no se afecta por el tratamiento, c) Validar la eficiencia de expresión de ambos genes en estudio, el gen de interés y el control interno [8]. En nuestro estudio se utilizó como control interno o gen endógeno a  $\beta$ -actina, y como control muestras de tejido mamario sano.

Para medir el nivel de expresión del gen *BRCA* en los tumores mamarios de las perras en estudio, se utilizó el software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 (QIAGEN®, 2014), el cual considera para su análisis el cálculo de *Fold Regulation*, *Fold Change*, media del  $\Delta CT$  y el  $2^{-\Delta CT}$ .

El *fold change* es calculado utilizando el método del  $\Delta\Delta CT$  [8], que es la relación de la expresión del gen entre el grupo control y experimental. Números superiores a 1 indican incremento en la expresión, números entre 0 y 1 indican disminución en la expresión y un *Fold Change* de 1 indica que no hay cambio en la expresión del gen. El cálculo se realizó siguiendo las siguientes fórmulas:

$$\Delta CT = CT (BRCA 2) - \text{Promedio CT } (\beta \text{ actina})$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Grupo experimental}) - \Delta CT (\text{Grupo Control})$$

Finalmente el valor del *Fold change* se calculó por la conversión del  $\Delta\Delta CT$  en  $\log_2$ , por la siguiente ecuación:  $Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta CT}$

La significancia estadística dada por el valor de  $p$  se estableció mediante la T de Student sobre los valores del *Fold change* de cada gen, en el grupo control y experimental. Una  $p < 0,05$  indica diferencia estadísticamente significativa. Los *Fold change* fueron graficados con el programa GraphPad Prism 6.0 para Windows.

### **Asociación con parámetros clínico-patológicos**

Se utilizó la base de datos con información referente al comportamiento biológico (CB), tamaño, índice de proliferación celular Ki67, expresión del receptor de estrógeno (RE $\alpha$ ), erbB2 y sub-tipo molecular del tumor, así como la edad y sobrevivida de las pacientes. Con el paquete estadístico PASW Statistics 18 se realizó estadística no paramétrica a través de la construcción de tablas de contingencia y con la Chi-cuadrada de Pearson ( $X^2$ ) se estableció la asociación entre la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras en estudio. Se consideró un valor con significancia estadística para una  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Expresión del *BRCA 1* y *2* en el tumor mamario**

Al analizar la expresión de *BRCA 1* y *BRCA 2* normalizado con  $\beta$ -actina y comparado con el grupo control, se observó que el tumor mamario en las perras Cocker y Mestizas presentan baja expresión (Tabla I y Fig. 1A); de igual forma, al discriminar la expresión en los tumores mamarios según su comportamiento biológico, en benignos (NB) y malignos (NM), se observó una expresión similar a la obtenida al analizarlos de manera conjunta. Se aprecia que los NB y NM de las perras Cocker y Mestizas se encuentran por debajo de la expresión del grupo control (Tabla I y Fig. 1B).

Por otra parte, se observó que el *BRCA 1* y *2* en las perras Poodle se sobre-expresa en el TM, así como al diferenciarlo en benigno y maligno; mientras que el *BRCA 2* en las NB no muestra cambios en su expresión (Tabla I y Fig. 1 A-B).

Adicionalmente se evidenció que el nivel de expresión de ambos genes por individuo es heterogénea, tanto las NB como las NM pueden tener una expresión baja, sin cambios o elevada (Fig. 2 A-C).

### **Asociación de la expresión del *BRCA 1* y *2* con parámetros clínico-patológicos**

Al establecer la asociación entre la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras en estudio. El *BRCA 1* mostró independencia con relación al comportamiento biológico, RE $\alpha$ , erbB2, índice de proliferación celular, clasificación molecular y el tamaño del tumor, así como con la edad y sobrevivida de las pacientes.

Con relación a la expresión de *BRCA 2* se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el comportamiento biológico de los tumores, así como con la expresión de RE $\alpha$ . La mayoría de las NB presentan una baja expresión del gen, mientras que en las NM la mayoría sobre-expresa el gen. Por otra parte, los tumores RE $\alpha$  positivos (+) en su mayoría presentan baja expresión del *BRCA 2* (Tabla II). Sin embargo, no se demostró asociación con las demás variables estudiadas.

## **DISCUSIÓN**

Durante el proceso de reparación, la proteína *BRCA 2* es atraída por *BRCA 1* al lugar del daño y facilita la unión de la proteína RAD51 al DNA monocatenario. *BRCA 2* se une a RAD51 y lo ubica en el sitio del daño del DNA para su reparación [9]. En deficiencia de *BRCA 2/1* este proceso no ocurre y forma parte de los mecanismos por los cuales se presenta el cáncer mamario en perras.

En este estudio se observó que *BRCA 1* y *2* se encuentran en una baja expresión en

el TM analizado en conjunto, así como discriminado según el comportamiento biológico en benignos y malignos, en las perras Cocker y Mestizas. Estos resultados son comparables con lo observado por [10], quienes observaron en el TM una expresión reducida del *BRCA 1* en el 60% de los adenomas simples y sin cambios en el 80% de los adenocarcinomas. Por su parte, Yoshikawa et al. encontraron niveles bajos de mRNA del *BRCA 2* en muestras de tumor mamario, al compararlas con las muestras de glándulas mamarias normales, sugiriendo que la baja expresión de *BRCA 2* contribuye al desarrollo de tumores mamarios en perros [11]. De igual forma, otros estudios, realizados en mujeres con cáncer de mama, han demostrado que tanto la expresión del mRNA del *BRCA 1*, así como, la expresión por inmunohistoquímica de su proteína se encuentra baja en los carcinomas mamarios [12].

También se observó que el *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios de las perras Poodle está por lo general sobre-expresado. Además, la expresión del *BRCA 1* y *2* es particular de cada tumor en cada paciente, por lo tanto resulta heterogénea. Esta variabilidad también fue observada a partir de variantes de splicing del *BRCA 1*, cuyo patrón de expresión relativo fue variado en cada tumor mamario [13].

Adicionalmente el *BRCA 1* se comporta independiente de las variables clínico-patológicas evaluadas. Tal como fue observado por un grupo de investigadores, donde el resultado histopatológico no se relacionó con la cantidad relativa y el patrón de expresión de variantes de mRNA del *BRCA 1* en tejido TM en perras [13]. Tampoco se encontró relación entre cada uno de los parámetros clínicos y los polimorfismos de un sólo nucleótido evaluados entre el grupo problema y el grupo control a partir de muestras de sangre de perras con tumor mamario [14]. Así mismo, se ha indicado que

la expresión de *BRCA 1* en perras no está inequívocamente asociada con criterios histológicos de malignidad, debido a que el *BRCA1* no mostró cambios de expresión en el 90% de los ganglios linfáticos metastásicos, por lo tanto, difiere de la malignidad a la que el *BRCA 1* se ha asociado en la especie humana [10]. También los resultados son similares a lo observado en mujeres mexicanas premenopáusicas, donde el tamaño del tumor, grado histológico, el estadio clínico, el *erbB2* y *p53* no muestran asociación con la expresión del *BRCA 1* y *2*; sólo la edad guarda relación con la baja expresión del *BRCA 1*, considerándose un marcador de enfermedad severa en mujeres muy jóvenes con cáncer de mama [15].

Por otra parte, en el *BRCA 2* la mayoría de las neoplasias benignas y *REα* positivos (+) muestran baja expresión del gen, mientras que las malignas lo sobre-expresan. Esto se explica considerando la sobreexpresión de *BRCA 2* como una respuesta protectora que disminuye la progresión del cáncer, además la inestabilidad génica incrementada en aquellas células tumorales metastásicas en proliferación, también puede ser un posible estímulo para la expresión *BRCA 2* [10]. Así como también puede ejercer efectos positivos sobre la proliferación celular la sobre-expresión del *BRCA 2* [16].

Estos resultados pudieran indicar que la expresión del *BRCA 2* pudiera ser un marcador de malignidad, por lo que se considera necesario continuar sus estudios y así poder revertir lo publicado en la literatura que contraria a esta observación. Klopffleisch y Gruber, observaron que no hay diferencias claras en la expresión del *BRCA 2* observada entre adenomas y el adenocarcinoma primario, a pesar de que en 40% de los adenomas mamarios la expresión génica se encontró disminuida y sólo el 50% de los ganglios metastásicos mostró una regulación positiva, sin embargo, concluyen que el uso de

este gen como un marcador tumoral para diferenciar los tumores benignos y malignos no es determinante [10]. Así mismo, observaron que el *BRCA 2* no es un buen marcador molecular de severidad en mujeres mexicanas premenopáusicas jóvenes, donde no mostro significancia estadística con el tamaño del tumor, características histológicas evaluadas ni expresión del *erbB2* [15]. Y lo publicado por Hedenfalk *et al.* quienes observaron que mujeres fenotipo mutacional *BRCA 2* la expresión del *RE* varía [17].

Basados en las premisas que qRT-PCR reproduce los resultados obtenidos con microarreglos para un perfil de pronóstico en las mujeres con cáncer de mama [18] y que una mutación heredable influye en la expresión del perfil de genes de un tumor [17]. Según este estudio, el cáncer de mama en perras puede tener un mejor enfoque tomando en consideración algunas razas como el Cocker y las Mestizas. Asimismo, correlacionar mutaciones específicas con la expresión del gen puede resultar útil para el pronóstico en pacientes veterinarias, a la vez que puede definir las razas más adecuadas como modelo animal para el estudio del cáncer de mama en mujeres.

## CONCLUSIONES

Se concluye que en el análisis relativo obtenido por PCR tiempo real a partir de tumores mamarios en perras, el *BRCA 1* no se asocia con parámetros clínico-patológicos y no es un indicador de malignidad en perras Cocker, Mestizas, y Poodle. Mientras que el *BRCA 2* se encuentra en baja expresión en los TM de perras Cocker y Mestizas, y su baja expresión se puede asociar con tumores benignos positivos al *REα*. La expresión del *BRCA 1* y *2* en el Tumor Mamario resulta heterogéneo en cada paciente, por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter heredo familiar del gen en el desarrollo del cáncer de mama,

su estudio puede aportar mayor información enfocado en aquellas razas con clara predisposición a la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Narod SA, Rodríguez A. Predisposición genética para el cáncer de mama y genes *BRCA1* y *BRCA2*. Salud Pública Méxic. 2011; 53:420-429.
- [2] Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M. Double-strand breaks and tumorigenesis. Trends Cell Biol 2001; 11:S52-S59.
- [3] Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S et al. *BRCA* genes: *BRCA1* and *BRCA2*. J Balkan Union Oncol. 2018; 23(4): 862-866.
- [4] Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, Hanna WM, Lynch HT, Ghadirian P et al. Estrogen receptor status in *BRCA1* and *BRCA2*-related breast cancer: The Influence of age, grade and histological type. Clin Cancer Res. 2004; 10:2029-2034.
- [5] Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Haggstrom J, Lindblad-Toh K et al. Mammary tumor development in dogs is associated with *BRCA1* and *BRCA2*. Cancer Res. 2009; 69: 8770-8774.
- [6] Rivera E. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. Vet Pathol. 2011; 48:(1) 132-146.
- [7] Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a model for cancer. Annu Rev Anim Biosci. 2016; 4:199-222.
- [8] Livak KJ y Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>DDCT methods. 2001; 25 (4):402-408.
- [9] Ochiai K, Yoshikawa Y, Oonuma T, Tomioka Y, Hashizume K, Morimatsu M. Interactions between canine RAD51 and full length or truncated *BRCA2* BRC repeats. Vet J. 2011; 190(2): 293-295.
- [10] Klopffleisch R, Gruber AD. Increased expression of *BRCA2* and RAD51 in lymph node metastases of canine mammary adenocarcinomas. Vet Pathol. 2009; 46: 416-422.
- [11] Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Wada S, Orino K et al. Reduced canine *BRCA2* expression levels in mammary gland tumors. BMC Vet Res. 2015;11:159.....
- [12] Al-Mulla F, Abdulrahman M, Varadharaj G, Akhter N, Jehoram T. Animal *BRCA1* gene expression in breast cancer: A correlative study between Real-time RT-PCR and immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 2005; <http://www.jhc.org> 53(5):621-629.
- [13] Sugiura T, Matsuyama S, Akiyosi H, Takenaka S, Yamate J, Kuwamura M et al. Expression patterns of the *BRCA1* splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. J Vet Medicin Sc 2007; 69(6): 587-592.
- [14] Decuadro Barboza A. Tumores de mama en caninos. Determinación de polimorfismos en los genes *BRCA1/BRCA2* y correlación entre la presentación clínica y la estadificación histopatológica. [Tesis de maestría. Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.. 2021. [citado: 2022, abril] 113 h. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/28768>
- [15] Loredó-Pozos Ch E, Ocegüera-Villanueva A, Panduro A, Siller-López F, Ramos-Márquez M. Expression profile of *BRCA1* and *BRCA2* genes in premenopausal Mexican women with breast cancer: Clinical and immunohistochemical correlates. Medicin Oncol 2009; 26:269-275.
- [16] Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. Cell 2002; 108:171-182.
- [17] Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer.

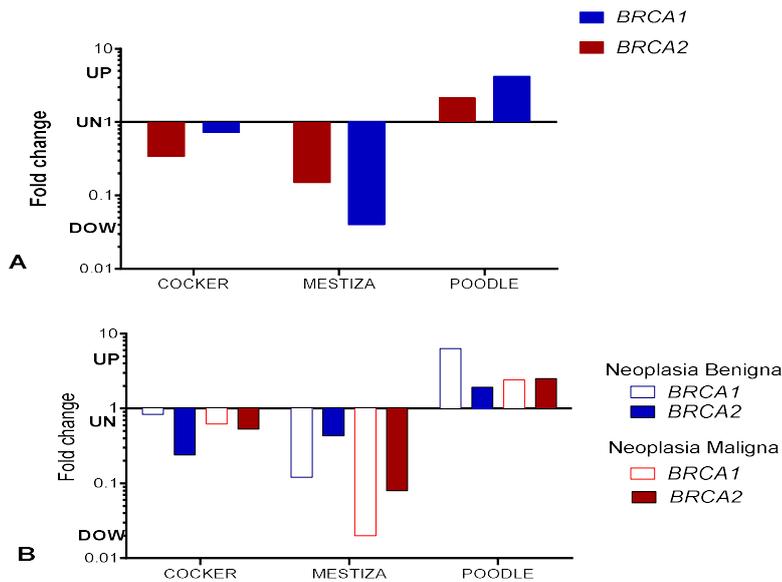
New England J Medicin 2001, 22; 344(8):539-548.

[18] Espinosa E, Fresno JA, Redondo A, Sánchez JJ, Hardisson D, Zamora P et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. J Clin Oncol 2005; 23:7278-7285.

**TABLA I.- Expresión relativa del *BRCA* (*fold change*) en el Tumor Mamario en perras Cocker, Mestizas y Poodle**

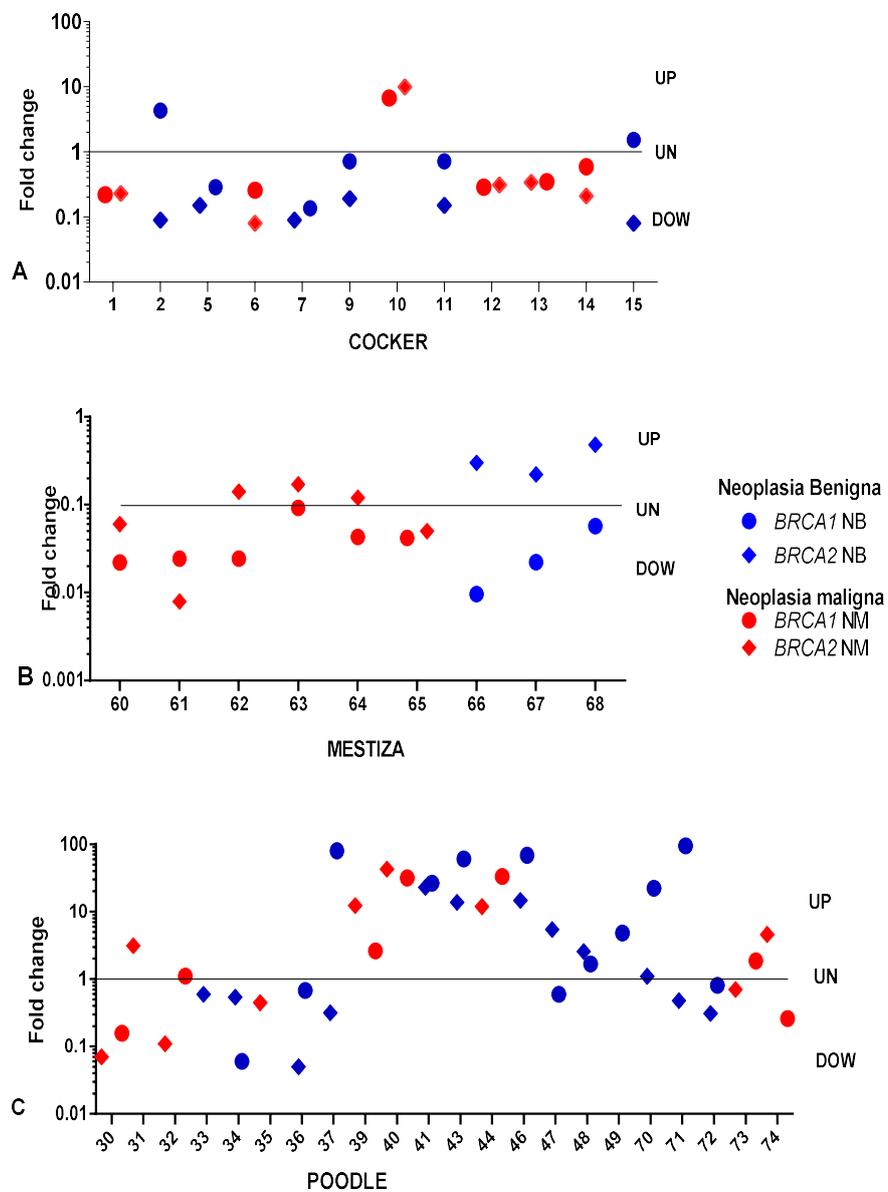
	TM		TM NB		TM NM	
	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2
Cocker	0,72	0,34	0,83	0,24	0,62	0,53
Mestizas	0,04	0,15	0,02	0,43	0,06	0,08
Poodle	4,19	2,15	6,29	1,92	2,39	2,51

TMC: Tumor mamario, NB: Neoplasia benigna, NM: Neoplasia Maligna  
 El color de los números indican nivel de expresión (rojo: baja, negro: sin cambios y azul: sobre-expresión).



**FIGURA 1.- Expresión del *BRCA 1* y *2* en el Tumor Mamario de perras Cocker, Poodle y Mestizas. A. Comparación de la expresión del *BRCA 1* y *2* en los tumores mamarios. B. Expresión del *BRCA 1* y *2* en tumores benignos y malignos**

Expresión del gen *BRCA 1* y *2* en neoplasias mamarias de perras.



**FIGURA II. Nivel de expresión de *BRCA 1* y *2* por individuo en los TB y TM.** A. Expresión en perras Cocker. B. Expresión en perras Mestizas. C. Expresión en perras Poodle. (UP: Sobre-expresión, UN: Sin cambios en la expresión, DOW: baja expresión)

**TABLA II.- Asociación de la expresión del BRCA 1 y 2 con variables clínico-patológicas en el Tumor Mamario.**

	CB (%)	Tamaño	Ki67 (%)		RE (%)		erbB2 (%)		Edad	Muerte
	NB - NM	(%/CM)	B	A	-	+	B	A	(% /años)	(%)
		<3 >3							<8 >8	NO - SI
<b>BRCA 1</b>										
<b>DOW</b>	35.4 – 25	22.2 – 31.3	37.5 – 22.9		14.6 – 45.8		22.9 – 37.5		10.4 – 50	41.1- 18.8
<b>UN</b>	4.2 – 6.3	8.3 – 2.1	6.3 – 4.2		2.1 – 8.3		6.3 – 4.2		2.1 – 8.3	8.3 - 2.1
<b>UP</b>	12.5 – 16.7	16.7 – 12.5	8.3 – 20.8		14.6 – 14.6		14.6 – 14.6		10.4 – 18.8	22.9 – 6.3
<b>χ<sup>2</sup></b>	0.531	0.407	0.112		0.195		.561		0.396	0.745
<b>(p&lt;0,05)</b>										
<b>BRCA 2</b>										
<b>DOW</b>	<b>29.5 –</b> 18.2	37.5 – 43.8	25.5 – 18.2		11.4 – <b>36.4</b>		16.4 – 27.3		10.9 – 32.7	34 – 9.4
<b>UN</b>	11.4 – 0	0 – 3.1	7.3 – 10.9		0 – 11.4		10.9 -7.3		9.1 – 9.1	15.1 – 3.8
<b>UP</b>	9.1 – <b>31.8</b>	6.3 – 9.4	12.7 – 25.5		22.7 – 18.2		20 – 18.2		7.3 – 30.9	20.8 – 14
<b>χ<sup>2</sup></b>	<b>0.003 *</b>	0.648	0.227		<b>0.026*</b>		0.051		0.184	0.187
<b>(p&lt;0,05)</b>										

NB: neoplasia benigna. NM: Neoplasia maligna. B: Bajo. A: Alto DOW: Baja expresión. UN: sin cambios en la expresión. UP: sobre-expresado.