



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

Análisis molecular de los genes *BRCA1*, *BRCA2*

y metilación global en tumores mamarios caninos

Dra. MSc. Alicia Decuadro.

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
AÑO 2025



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

**Análisis molecular de los genes *BRCA1*, *BRCA2*
y metilación global en tumores mamarios caninos**

Dra. MSc. Alicia Decuadro

Director de Tesis

Co-director

PhD. María Montenegro

PhD. Silvia Llambí

URUGUAY
AÑO 2025

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Presidente. PhD MSc. DMV. Paula Pessina.

Unidad de Endocrinología y metabolismo animal, Imagenología y Análisis Clínicos
Facultad de Veterinaria Udelar.

Segundo miembro PhD MSc DMV. Graciela Pedrana

Unidad de Histología y Embriología.
Facultad de Veterinaria Udelar.

Tercer miembro PhD. MSc. Lic. Eugenio Jara

Unidad de Genética y Mejora Animal.
Facultad de Veterinaria. Udelar.

ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

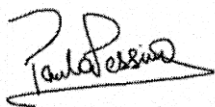
Materia: PHD01 TESIS DE DOCTORADO	Orientación: Salud Animal.	
Período: julio 2025		
Fecha evaluación: 22/07/2025	Hora: 10:00	Lugar: Salon 103

Tribunal:
Presidente: Paula Pessina
2° Integrante: Graciela Pedrana
3 ^{er} Integrante: Eugenio Jara

C.I.	Nombre	Concepto	Nota
3735819 - 5	Alicia Beatriz Decuadro Barboza	Excelente	E

Nota: La calificación mínima para aprobar la defensa es Aceptable (A)

Dra. Paula Pessina

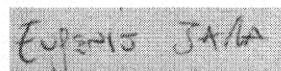


TRIBUNAL

Dra. Graciela Pedrana



Dr. Eugenio Jara



FIRMA

DEDICATORIA:

Querida Rosa Gagliardi. Esta tesis está dedicada a ti.

Te recordaré siempre sonriendo, con una fortaleza enorme, aunque la vida fue tan cobardemente dura contigo. Gracias por ayudarme a creer en mí. Hacías que todo pareciera fácil, sabiendo lo difícil que era para mí, incursionar en el área molecular.

Perdóname por no haber tenido el valor de ir a despedirme de ti, pero quería recordarte como la última vez que te vi. Aunque a veces me arrepiento, pero sé que ya no estabas. Lamento tanto lo que te pasó, no lo merecías. La vida es tan injusta con algunos y tan amable con otros que muchas veces es difícil de entender. Este trabajo como otros que estabas tutorando te lo debía, así que por un lado me quedo tranquila que pudimos terminarlo, junto con María y Silvia que me dieron una ayuda enorme.

Agradezco tanto a la vida haberte conocido, nada te paraba, frente a todas las adversidades que enfrentabas día a día. Gracias por ayudarme a superar mis miedos. Siempre te recordaré con mucho cariño. Fuiste y serás un ejemplo de vida para mí.

Por eso estoy y estaré eternamente agradecida contigo.



Sufrir sin quejarse es la única lección que debemos aprender en esta vida. Vincent Van Gogh.

AGRADECIMIENTOS.

Acá estoy escribiendo otra vez los agradecimientos, culminando un trabajo que me puso a prueba muchas veces, me hizo tropezar y me desafió enormemente, pero con el acompañamiento de las personas indicadas pude culminarlo. Sufrimos una pérdida enorme de una compañera en el transcurso de este trabajo que nos causó mucha tristeza de la cual tuvimos que rearmarnos para seguir avanzando. Uno no termina esto solo, hay un grupo de personas atrás que vienen a la par tuya empujando, conteniendo y guiándonos en cada proceso, que sin ellos sería imposible poder terminarlo.

Quiero agradecerle a María Montenegro por aceptar ser mi tutora ya comenzada la tesis, por las horas de laboratorio y paciencia. Por las correcciones y la ayuda en todo lo referente a este trabajo.

A Silvia Llambí, por la enorme ayuda en todo, en las publicaciones de los artículos con la dificultad que eso tiene. Por sus horas de trabajo y dedicación.

Nunca hubiera podido terminar este trabajo sin la ayuda de ustedes dos.

A Mónica Cappetta que sin conocerme me tendió la mano, formó parte de este equipo y se puso a disposición con una técnica innovadora para los veterinarios.

A Nariné por estar presente en los momentos que la necesitaba ayudándome a procesar muestras en el laboratorio.

A Ana Meikle por su disposición en el momento justo para impulsarme en la última etapa. Gracias por darme el espacio para poder estar tranquila y en silencio algo que en nuestro lugar de trabajo es muy difícil de conseguir.

A mis compañeros del Hospital, que no los voy a nombrar a todos porque son muchos. Mis compañeras de todos los días, que son mucho más que compañeras, cirujanos, personal de enfermería, de cabina y todos los colegas de genética que siempre me aceptaron trabajando en el laboratorio.

A mis estudiantes CIDEA, Micaela y Federico que gracias a sus trabajos pude realizar el mío.

A mi familia que siempre me acompañan, sin entender mucho lo que hago, pero no importa, sé que están felices si me ven bien.

También quiero agradecer a las siguientes instituciones por el apoyo financiero que me permitieron concluir esta tesis: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), y Comisión de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Veterinaria (CIDEA).

La presente Tesis está basada en los siguientes artículos publicados en revistas arbitradas o enviados para su publicación, a los cuales se referirá en el texto por su numeración romana (I-III).

I. Decuadro A, Sosa M, García F, Balemian, N, Montenegro M, Llambí, S. (2025). Analysis of genetic polymorphisms in the intron 9–10/exon 10 region of the BRCA1 gene in a population sample of dogs with mammary cancer from Uruguay. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 35. 6. 10.52973/rcfcv-e35545.

II. Decuadro A, García F, Sosa M, Llambí S Montenegro M. (2025). BRCA1 and BRCA2 Gene Analysis in Dogs with Familial Mammary Tumors (Manuscript Number: JAVAR-2025-03-076). *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*.

III. Decuadro A, Balemian N, Llambí S, Montenegro M, Capetta M. (2025) Global DNA hypomethylation in canine mammary tumors. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*.

El artículo I se reproduce con el permiso de la revista correspondiente.

Al final de la tesis se incluyen artículos completos que están vinculados a la tesis de Doctorado y que fueron llevados adelante por la estudiante de Doctorado. (Anexos).

Vinculado a nuestra línea de trabajo participé como coautora de un artículo científico realizado por el Laboratorio de Patología Comparada de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Asociación Brasileira de Patología Veterinaria, la Asociación Brasileira de Oncología Veterinaria y la Sociedad Latinoamericana de Oncología Veterinaria de la cual formo parte del 2017.

Cassali, G. Nakagaki, K, Jark, P, Horta R, Ariaa A, Tellado M, Lima A, Sueiro F, Reys M, Wronski J, Sierra O, Kristancic E, Decuadro A, Gómez J. (2024). Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement (2023). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 17. 152-163. 10.24070/bjvp.1983-0246.v17i3p152-163.

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ARTICULOS I AL III.....	iii
INDICE	iv
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	vi
RESUMEN.	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades en cáncer de mama	1
Genes involucrados en el desarrollo del cáncer	3
Epigenética del cáncer	5
Metilación y cáncer de mama	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS.....	10
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	10
CAPÍTULO 1 (Artículo 1).....	12
Objetivos específicos.....	12
Materiales y métodos	12
Resultados y discusión	15
CAPÍTULO 2 (Artículo 2).....	19
Objetivos específicos.....	19
Materiales y métodos.....	19
Resultados y discusión	21
CAPÍTULO 3 (Artículo 3).....	24
Objetivos específicos.....	24
Materiales y métodos	24
Resultados y discusión	26
DISCUSIÓN GENERAL	32
CONCLUSIONES	35
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS.....	45

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Descripción de los pacientes, estadificación clínica (según la OMS), diagnóstico histopatológico y clasificación	13
Tabla 2. Frecuencias alélicas: Se presentan las frecuencias alélicas observadas del SNP1 y los resultados del test de Chi-cuadrado (X^2) para EH&W	16
Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados en las secuencias de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en la población P y en la población de referencia	22
Tabla 4. Descripción de los pacientes según la edad, raza, estadio, histopatología y porcentaje de metilación del tejido sano y tejido tumoral	27
Figura 1. Metilación del ADN, donde se sustituye el H del C5 de la citosina por un grupo metilo (CH ₃) formando la 5- metilcitosina.....	5
Figura 2. Alineamiento múltiple parcial de la secuencia amplificada del intrón 9-10/exón 10 del gen <i>BRCA1</i> de las 15 hembras caninas con tumores (T1-T15) y las hembras control (C1-C14).....	15
Figura 3. <i>Vulpes vulpes</i> . Imagen de un zorro rojo	17
Figura 4. <i>Nyctereutes procyonoides</i> . Imagen de un perro mapache	17
Figura 5. <i>Vulpes lagopus</i> . Imagen de un zorro polar	17
Figura 6. <i>Canis lupus dingo</i> Imagen de un perro dingo	17
Figura 7. <i>Canis lupus familiaris</i> . Imagen de un perro doméstico	18
Figura 8. Árbol de distancia genética Neighbor-joining utilizando la secuencia amplificada con el programa de alineamiento múltiple tBlastn en la familia <i>canidae</i>	18
Figura 9. Razas utilizadas en el estudio. Caniche, Gran Danes, Cimarón y Boxer	19
Figura 10. Árbol de distancia genética Neighbor-joining utilizando la secuencia amplificada del exón 10 de <i>BRCA2</i> con el programa de alineamiento múltiple tBlastn en la familia <i>canidae</i>	23
Figura 11. Equipo HPLC y software	26

Figura 12. Comparación de niveles de metilación global entre tejido sano y tumoral...	28
Figura 13. Gráfico comparativo entre los niveles de metilación global en tejido sano y tumoral para cada perra	28
Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación global del ADN entre tejidos mamarios normales y tumores mamarios mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$)...	29
Figura 15. Resultado donde se indica que la diferencia de metilación entre tejido sano y tumoral en las perras no solo es estadísticamente significativa, sino que también tiene una magnitud considerable	30
Figura 16. Tamaño del efecto estimado por perra, mostrando cómo varía la diferencia de metilación estandarizada entre tejido sano y tumoral en cada caso	30

RESUMEN

Esta tesis basada en 3 artículos investigó aspectos moleculares de los tumores de mama en caninos. En el **artículo 1** se estudió la región del intrón 9-10/exón 10 del gen *BRCA1* de muestras de sangre las cuales fueron enviadas para su secuenciación. Se estudió a nivel poblacional y evolutivo, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) localizados en una región de corte y empalme del exón más grande del gen *BRCA1* en una población de perras con distintos tipos histopatológicos de tumores mamarios. Concluimos que las mutaciones en esta región de splicing del mayor exón de *BRCA1* no estarían relacionadas con la aparición de tumores mamarios en caninos en este grupo de animales. En el **artículo 2** se estudió una muestra poblacional emparentada de 4 razas de caninos con antecedentes familiares de tumores de mama. Se extrajo sangre de los animales para análisis moleculares de ADN, para amplificar las regiones de interés en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, identificando mutaciones relevantes. Los productos de PCR fueron confirmados mediante electroforesis en gel y enviados para secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el software BioEdit, comparando los individuos con y sin tumores. Como resultado, se encontraron variantes previamente descritas en Ensembl, pero no se hallaron nuevas variantes en las secuencias analizadas. En el **artículo 3** se comparó el nivel de metilación global del ADN entre tejido tumoral y tejido mamario sano de 11 perras enteras con tumores de mama. Ambos tipos de tejido fueron extraídos durante la cirugía, y se realizó la estadificación clínica y clasificación histopatológica de los mismos. A partir de muestras pareadas de tejido tumoral y tejido mamario sano de cada animal, se extrajo ADN y se determinaron los niveles de metilación genómica global mediante cuantificación relativa de 5-metil 2-desoxicitidina (5mdC) utilizando HPLC. Los resultados revelaron una hipometilación global del ADN en el tejido tumoral en comparación con el tejido mamario sano ($P < 0.05$). Esta diferencia fue más pronunciada en tumores de alto grado histopatológico, caracterizados por un comportamiento clínico agresivo y una elevada tasa de metástasis. Este trabajo resalta la importancia de continuar con esta línea de investigación que a futuro se pueda usar la metilación global del ADN como biomarcador para dar un pronóstico más certero de esta enfermedad.

ABSTRACT

This work, based on three articles, investigated molecular aspects of canine mammary tumors. **Article 1** studied the intron 9-10/exon 10 region of the *BRCA1* gene in blood samples submitted for sequencing. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in a splice region of the largest exon of the *BRCA1* gene were studied at the population and evolutionary level in a population of female dogs with different histopathological types of mammary tumors. We concluded that mutations in this splice region of the largest *BRCA1* exon would not be related to the occurrence of canine mammary tumors in this group of animals. **Article 2** studied a population sample from four families of dogs with a history of mammary tumors. Blood was drawn from the animals for molecular DNA analysis to amplify regions of interest in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, identifying relevant mutations. PCR products were confirmed by gel electrophoresis and sent for sequencing. The sequences obtained were analyzed using BioEdit software, comparing individuals with and without tumors. As a result, variants previously described in Ensembl were identified, but no new variants were found in the analyzed sequences. In **Article 3**, the global DNA methylation level was compared between tumor and healthy mammary tissue from 11 intact female dogs with mammary tumors. Both types of tissue were removed during surgery, and clinical staging and histopathological classification were performed. From paired samples of tumor and healthy mammary tissue from each animal, DNA was extracted, and global genomic methylation levels were determined by relative quantification of 5-methyl 2-deoxycytidine (5mdC) using HPLC. The results revealed global DNA hypomethylation in tumor tissue compared with healthy mammary tissue ($P < 0.05$). This difference was more pronounced in high-grade tumors, characterized by aggressive clinical behavior and a high metastasis rate. This work highlights the importance of continuing this line of research so that global DNA methylation can be used as a biomarker in the future to provide a more accurate prognosis for this disease in dogs.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.
BRCA1 / 2: Genes 1 y 2 del cáncer de mama
CMT: Tumor mamario canino.
DNMT: enzimas ADN-metiltransferasas
H&W: Equilibrio de Hardy-Weinberg
HBC: Tumor mamario en humanos
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HDAC: histona desacetilasa
Indels: inserción o delección
lncRNA: ARN largos no codificantes
miRNAs: microRNAs
OMS: Organización mundial de la Salud.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
RE: receptor de estrógeno.
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.
5mC 5-metilcitosina
5mdC: 5-metil 2-desoxicitidina

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer de mama canino

Los tumores de mama son los más frecuentes en hembras caninas dentro de las consultas oncológicas (Ochiat et al. 2015). Las perras desarrollan tumores mamarios y otros tipos de cáncer espontáneamente con un sistema inmune intacto, con una serie de similitudes clínicas y moleculares con el cáncer de mama en humanos. Al menos el 50% de las perras con neoplasias mamarias tienen masas múltiples, sin embargo, el pronóstico no está influido por su residencia o cantidad (Ogilvie et al. 2008; Withrow & MacEwen 2022). En perras de edad avanzada, la neoplasia mamaria debe ser la primera patología que considerar cuando se observa un nódulo que afecta al tejido mamario. De todas formas, no se puede descartar que se trate de otro tipo de lesiones benignas como mastitis, galactostasis, galactorrea o una neoplasia de los tejidos adyacentes (mastocitoma, lipoma, carcinoma de células escamosas, etc.). En el proceso diagnóstico inicial es importante obtener una historia clínica completa, una exploración física completa y una exploración detallada de todas las glándulas mamarias y linfonodos regionales, así como una analítica sanguínea completa que incluya hemograma y bioquímica sérica, urianálisis, para así determinar el estado general de salud del animal (Borrego, 2016).

La importancia de la estadificación radica en permitir al clínico realizar un pronóstico de la enfermedad y planificar un posible tratamiento. El sistema utilizado es el propuesto por Owen en 1979 para la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta estadificación se realiza mediante el sistema TNM, donde se categoriza a los animales en 5 estadios según el tamaño tumoral y su adhesión a tejido adyacente (T), la afectación de linfonodos regionales (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M).

El diagnóstico histopatológico se realiza luego de la cirugía. La clasificación revisada y establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en un intento por obtener una división pronóstica de peso, es descriptiva y subdivide además los carcinomas en no-infiltrativos, carcinomas simples (túbulo-papilar, sólido, o anaplásico) o complejos. Esta subdivisión se fundamenta en clasificar los tumores por el aumento en su potencial de malignidad (Von Euler, 2014). La clasificación de la OMS sigue el proceso de diferenciación, comenzando por los tumores malignos que más estrechamente se asemejan a la estructura normal de la glándula mamaria y finalizando con los tumores poco diferenciados que no presentan estructura glandular. Esta institución proporcionó un sistema de clasificación histopatológica que pudiera ser útil para alcanzar un pronóstico. Su objetivo es la estandarización internacional de la terminología y la nomenclatura de los tumores mamarios caninos, la cual combina la clasificación morfológica descriptiva con un criterio pronóstico, clasificando los tumores mamarios más frecuentes en grados crecientes de malignidad (Misdorp et al. 1999).

Esta clasificación ha sido posteriormente modificada en el año 2011, proponiendo la clasificación histopatológica y la nomenclatura de las neoplasias y de las displasias de la glándula mamaria en la especie canina (Goldsmith et al. 2011).

Las clasificaciones anteriores no incluían los carcinomas inflamatorios, al considerar que no se trataba de un subtipo histológico específico, refiriéndose únicamente a un nombre genérico dado a un carcinoma de mama con marcada inflamación (Misdorp et al. 2002). En la nueva clasificación de Goldsmith et al. (2011) el carcinoma inflamatorio ya aparece como una entidad específica.

Esta clasificación histológica de los tumores de mama en perras, fue validada en el año 2017 por Rasotto et al. donde durante dos años analizaron una población de 229 hembras caninas, los tiempos de supervivencia específicos de cada subtipo, la tasa de recurrencia local y metástasis a distancia (Rasotto et al. 2017). Recientes consensos realizados en Latinoamérica actualizaron la clasificación histopatológica en caninos y felinos. Con el propósito de actualizar, en este encuentro se discutió y actualizó los criterios que guían el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las neoplasias caninas y felinas. Dicho trabajo fue realizado por el Laboratorio de Patología Comparada de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Asociación Brasileira de Patología Veterinaria, la Asociación Brasileira de Oncología Veterinaria y la Sociedad Latinoamericana de Oncología Veterinaria. El objetivo principal de este encuentro fue reunir académicos y profesionales de la oncología mamaria veterinaria para debatir la morfología, los criterios de diagnóstico y el pronóstico de los tumores mamarios sólidos en perras y gatas, así como para brindar información actualizada sobre las pautas de tratamiento para estos tumores. (Cassali et al. 2024).

En cuanto al pronóstico, el tamaño tumoral mayor a 3 cm, la afectación de linfonodos, los signos histológicos de invasión linfática y vascular, la ulceración y las metástasis a distancia son factores de mal pronóstico. En estudios recientes se vio que el tamaño tumoral en lo referente al pronóstico, el tipo histopatológico fue importante incluso en tumores pequeños. Tumores menores de 3 cm. tuvieron un alto grado histopatológico y se observaron tumores benignos mayores a 5 cm. (Burrai et al. 2020; Decuadro et al 2021) Los tumores mamarios caninos de < 1,5 cm y > 1,5 cm presentaron diferencias significativas en el pronóstico en un estudio, lo que resalta la necesidad de revisar el tamaño tumoral mínimo establecido en la estadificación TNM por lo que el pronóstico estaría estrechamente correlacionado con el nivel de diferenciación histopatológica (Vieira et al. 2025). Las metástasis en linfonodos regionales se asocian con mayor riesgo de recurrencia y disminución del tiempo de supervivencia. Las perras sin metástasis tuvieron 3 veces más probabilidad de sobrevivir un año desde el diagnóstico que aquellas con enfermedad metastásica (Ruthane et al. 2007).

El tratamiento es quirúrgico y se define mediante el estadio clínico y el consenso con el propietario. No se recomienda la escisión incompleta o los procedimientos citorreductores. La quimioterapia se administra en perras con tumores de alto grado histopatológico con riesgo de metástasis o recidiva, aunque la mayor parte de la evidencia con respecto a la eficacia de la quimioterapia adyuvante es débil, algunos estudios han

demostrado beneficios con su uso sola o combinada con antiinflamatorios no esteroideos. (Withrow & MacEwen 2022).

Además de la presentación espontánea del tumor, las similitudes clínicas entre los tumores mamarios humanos (HBC) y caninos (CMT) incluyen la edad de inicio, la etiología hormonal y el curso de la enfermedad. Así mismo, los factores que afectan el resultado de la enfermedad, incluido el tamaño del tumor, la etapa y la invasión de los linfonodos, son similares en HBC y CMT. Del mismo modo, las características moleculares del receptor de esteroides, el factor de crecimiento epidérmico, el marcador de proliferación, la expresión de metaloproteinasa y ciclooxygenasa, y la mutación del gen supresor de tumores p53 en CMT, imitan al HBC. Los carcinomas ductales in situ en las glándulas mamarias humanas y caninas son particularmente similares en sus características patológicas, moleculares y visuales. Las características de los CMT y sus similitudes con los HBC indican que la perra podría ser un buen modelo para el estudio de la enfermedad en humanos (Somaia et al. 2018).

Esta necesidad de modelos animales más apropiados en la investigación del cáncer ha llevado durante los últimos 20 años a considerar a las perras con neoplasias de aparición espontánea, como un recurso valioso, pero aún no suficientemente utilizado. El papel de los animales de compañía en la lucha por erradicar el cáncer puede ser múltiple: pueden actuar como centinelas ambientales, ayudar a obtener conocimientos sobre la biología tumoral y, finalmente, participar en ensayos terapéuticos que podrían actuar como un puente hacia las aplicaciones clínicas (Porello et al. 2006).

Genes involucrados en el desarrollo del cáncer.

Con respecto al estudio molecular, los genes *BRCA1* y *BRCA2* son genes de reparación genómica, cumpliendo la función de regulación del ciclo celular. Codifican proteínas involucradas en la respuesta al daño del ADN, por lo tanto, funcionan como genes supresores de tumores. Están involucrados en la síntesis de complejos proteicos que aseguran la transcripción y regulación de la síntesis de ADN, así como el reconocimiento y corrección de roturas de la doble cadena del ADN. Tienen un papel importante en el control del crecimiento celular y conservación de la integridad genómica (Varol et al. 2018). Una vez que *BRCA* detecta el daño en el ADN, activa al gen *Rb1* para que detenga el ciclo celular. Cuando se ve imposibilitada la reparación del ADN, se activa, promoviendo la apoptosis. Las deficiencias funcionales debidas a las mutaciones en estos genes perjudican la reparación y causan irregularidades en la síntesis de ADN, generando mayor sensibilidad a la exposición de factores promotores de cáncer. Estas mutaciones en su mayoría (80%) ocurren como mutaciones puntuales o mutaciones de delección/inserción (INDEL) (Jasin, 2002), llevando a mutaciones por desplazamiento en el marco de lectura, y mutaciones que afectan la regulación de la transcripción, dando como resultado truncamientos de proteínas, que generan alteraciones en la función. Existen muchas variantes en las secuencias de estos genes, cuyos efectos aún no se han identificado (Enginler et al. 2014). A su vez, *BRCA1* y *BRCA2*, están significativamente asociados con tumores mamarios en perras (Rivera et al. 2009).

Los tumores de mama en humanos y caninos comparten patrones similares en cuanto a su progresión y epidemiología. (Vail & MacEwen, 2000). Las mujeres que tienen mutaciones heredables en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, presentan un riesgo mayor de desarrollar en su vida tumores mamarios (56% a 84%) (Rivera et al. 2009). El análisis de la secuencia de este gen demuestra que la secuencia de aminoácidos de *BRCA1* en humanos y caninos es altamente homóloga (Szabo et al. 1996) y a partir del análisis de estructura, que comparten un dominio proteico similar, lo que implicaría que *BRCA1* podría cumplir funciones similares en CMT (Qiu et al. 2016). Existen muchos reportes del rol de *BRCA1* en la tumorigénesis de HBC, y pocos estudios realizados en CMT. En 1996, se realizó la secuenciación del gen *BRCA1* canino (Szabo et al. 1996), y en 1997, se localizó el gen en el cromosoma 9 de caninos (Werner et al. 1997). Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en nuestro país, evaluando mutaciones ocurridas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (genes supresores de tumores) en caninos y su relación con la histopatología tumoral observando que la correlación entre la clínica y la histopatología fue moderada pero representativa y observando 15 marcadores moleculares (SNPs, indels) de los cuales 6 fueron polimórficos, todos del tipo SNPs (Decuadro et al. 2021).

El gen *BRCA2* es un gen grande ubicado dentro del cromosoma 25 de los perros, con 28 exones, y codifica una proteína de 3418 aminoácidos de longitud. Este gen está fuertemente implicado en el desarrollo de tumores mamarios hereditarios. También se trata de un gen supresor de tumores. Teniendo en cuenta esta actividad, *BRCA2* participa principalmente en los mecanismos de reparación del ADN (Gopal et al. 2020). Su producto, la proteína *BRCA2*, tiene un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad genómica en la recombinación del ADN y la reparación de rotura de doble cadena, a través de la interacción con la recombinasa Rad51. La inestabilidad genómica de las células deficientes en *BRCA2* apunta a la función supresora de tumores (Scully & Livingston 2000; Ventikaraman 2002).

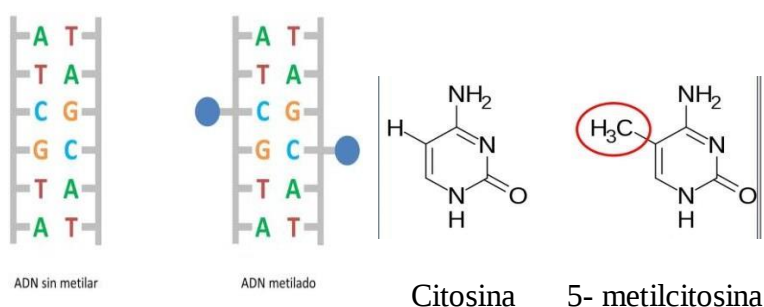
Está claramente establecido a nivel internacional que el cáncer tiene un origen genético (Vogelstein & Kinzler, 2004), lo que no significa que sea hereditario. En humanos se ha descrito que el 10% de los tumores mamarios malignos tienen un componente hereditario, mientras que la gran mayoría lo tienen genético (Klug et al. 2013). Debido a que algunas razas presentan mayor riesgo de desarrollar tumores mamarios que otras, se ha postulado la acción de factores genéticos involucrados. Pese a esto, hasta el momento no se ha logrado determinar una mutación genética común (Torres et al. 2017).

Actualmente existen más de 400 razas reconocidas internacionalmente en caninos (<http://www.fci.be/es/>). De éstas, la raza Caniche está muy difundida en nuestro país, particularmente en la zona metropolitana. Los perros Cimarrones son la única raza autóctona en Uruguay, mientras que la raza Bóxer suele tener diversas patologías oncológicas (<https://www.kcu.com.uy/>, Rivera et al. 2009). No se cuentan con antecedentes respecto a la presencia de alteraciones del ADN en el gen *BRCA1* en estas razas, por eso fueron incluidas en el artículo I y II para su estudio molecular.

Epigenética del cáncer

El término epigenética hace referencia a los cambios en la expresión génica que afectan al fenotipo y que ocurren sin modificaciones en la secuencia del ADN (Karsli-Ceppioglu et al. 2014; Zhou et al. 2021). Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas, el reclutamiento de factores remodeladores de la cromatina, y la expresión de microRNAs (miRNAs) y RNAs largos no codificantes (lncRNA) (Baylin & Jones 2011). La regulación mediante mecanismos epigenéticos es esencial para el crecimiento y el desarrollo normal, y condiciona el potencial transcripcional de los genes. De igual manera, estos mecanismos están fuertemente implicados en diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Jovanovic et al. 2010; Brookes & Shi 2014). Entre los procesos epigenéticos frecuentemente alterados en el cáncer se encuentra la metilación del ADN (Skvortsova et al. 2019).

La metilación del ADN es una modificación química covalente que consiste en la adición de un grupo metilo (CH_3) al quinto carbono del anillo de pirimidina de la citosina, resultando en la formación de 5-metil-citosina (5-me-C) (**Figura 1**). Esta reacción es catalizada por una familia de enzimas denominadas ADN-metiltransferasas (DNMT), las cuales llevan a cabo la metilación de novo o establecen la metilación en el ADN hemimetilado (Karsli-Ceppioglu et al. 2014). La metilación del ADN ocurre después de la replicación y en eucariotas se da con mayor frecuencia en las citosinas ubicadas dentro de los dinucleótidos de citosina-fosfato-guanina (CpG), que suelen encontrarse en regiones denominadas islas CpG. Aproximadamente el 70% de los promotores de genes conocidos están asociados con islas CpG y el estado de metilación de estas generalmente se correlacionan con la actividad transcripcional (Jovanovic et al. 2010; Pasculli et al. 2018).



<https://gentaur.es/conocimiento/metilacion-de-adn>.

Figura 1. Metilación del ADN, donde se sustituye el hidrógeno (H) del carbono 5 (C5) de la citosina por un grupo metilo (CH_3), formando la 5- metilcitosina.

La hipometilación global del genoma y la hipermetilación locus específica son procesos bien establecidos como mecanismos a través de los cuales las células tumorales pueden adquirir características críticas en su camino hacia la transformación (Biondi et al. 2021). La hipometilación generalmente se asocia con una disminución en la represión de genes

silenciados y su consecuente reactivación, como por ejemplo los oncogenes o los retrotransposones, situación que se relaciona con la inestabilidad cromosómica. En cambio, la hipermetilación del ADN en islas CpG de los promotores se asocia frecuentemente con la represión génica e inestabilidad genómica mediante el silenciamiento de genes supresores de tumores (Brookes & Shi, 2014).

Las metilaciones aberrantes en el ADN pueden interrumpir la regulación y la expresión génica normal (Severi et al. 2014). La metilación afecta la expresión génica porque las proteínas reguladoras de la transcripción que se unen al ADN metilado son diferentes a aquellas que se unen al ADN sin metilar. Se ha encontrado hipermetilación en muchos genes supresores de tumores y otros genes relacionados con el cáncer en células tumorales humanas y tumores primarios (Brookes & Shi, 2014; Wu et al. 2015). En lo que se refiere a la metilación del ADN, tanto en genes específicos como en el genoma, han sido reconocidas como una de las alteraciones moleculares más importantes en el tejido tumoral (Widschwendter & Jones, 2002). La hipometilación global y la hipermetilación regional parecen ser características distintivas de los tumores humanos, aunque la hipermetilación regional se observa claramente en múltiples regiones genómicas distintas que albergan genes supresores de tumores. Se sabe que la hipometilación global causa inestabilidad genómica, reactivación de elementos transponibles y pérdida de impronta, contribuyendo así al desarrollo del cáncer (Esteller, 2008; Qiu et al. 2016). En mujeres se ha demostrado que el ADN de los tejidos del cáncer de mama está hipometilados en comparación con el de los tejidos normales (Soares et al. 1999). Sin embargo, existe poca información de lo que ocurre en caninos vinculado a cambios de secuencia de los genes *BRCA1*, *BRCA2* y la metilación global del ADN. Algunos trabajos han encontrado variaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* en caninos con tumores de mama (Borge et al. 2011; Qiu et al. 2016; Ozmen et al. 2017; Thumser et al. 2020). Otros autores han estudiado perfiles de metilación de todo el genoma en tumores mamarios caninos observando cambios de metilación significativos (Jeong et al., 2019). Los carcinomas complejos presentan el tipo más común de tumor de mama canino. Estos tipos de tumores parecen estar influenciados por el panorama epigenético, y se sugiere que podrían originarse a partir de alteraciones epigenómicas más que genómicas. (Xavier et al. 2020).

Metilación y cáncer de mama

En el cáncer de mama, las modificaciones epigenéticas son fundamentales en su desarrollo y progresión. En etapas tempranas de la carcinogénesis y como resultado de lesiones genéticas o impactos ambientales, se producen alteraciones en la estructura de la cromatina a través de la metilación del ADN y de modificaciones postraduccionales de proteínas unidas al ADN. Estas alteraciones afectan la plasticidad celular y favorecen la reprogramación oncogénica de las células tumorales progenitoras, promoviendo la adquisición de propiedades de autorrenovación incontroladas (Pasculli et al. 2018). En etapas posteriores del crecimiento del cáncer, modificaciones epigenéticas adicionales junto con mutaciones subclonales y señales del microambiente, modulan el fenotipo de las células tumorales y afectan la propensión metastásica del tumor (Pasculli et al. 2018).

Respecto a la metilación del ADN en el cáncer de mama, al igual que en el cáncer en general, se ha demostrado la hipometilación a nivel genómico y la hipermetilación de ciertos genes, especialmente en islas CpG que normalmente no se encuentran metiladas (Karsli-Ceppioglu et al. 2014). Se han identificado más de 100 genes con hipermetilación en sus promotores, muchos de los cuales cumplen funciones críticas en la supresión de tumores, regulación del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, invasión de tejidos y metástasis (Wu et al. 2015). Por otro lado, la metilación del ADN se ha asociado con características clínico-patológicas de los pacientes con HBC, como por ejemplo el estadio y grado del tumor. Asimismo, se han identificado perfiles de metilación específicos asociados con diferentes subtipos de HBC, lo cual sugiere que podrían desempeñar un importante papel en el desarrollo y progresión de estos (Györffy et al. 2016).

El cáncer es la enfermedad humana compleja asociada con defectos epigenéticos mejor caracterizada (Berdasco & Esteller, 2010). El canino es un gran modelo de estudio ya que comparte el ambiente con los humanos (Xavier et al. 2020). Los aspectos similares de la enfermedad entre humanos y perros son el desarrollo espontáneo del tumor, el componente hormonal, la edad de incidencia y la progresión de la enfermedad. El tamaño de los tumores y la invasión hacia los linfonodos no presenta diferencias entre ambas especies. Asimismo, la expresión de ciertos factores como receptores de esteroides, factores de crecimiento epidérmico, de proliferación y mutaciones en p53 son comunes en humanos y perros (Abdelmegeed & Mohammed, 2018).

En caninos, las investigaciones en epigenética de CMT incluyen el análisis del perfil de metilación a nivel genómico (metiloma) (Jeong et al. 2019) y la cuantificación de la metilación global de ADN (Biondi et al. 2021). Este último trabajo de metilación global en CMT, realizado mediante inmunotinción de 5-metilcitosina, reveló diferencias significativas entre los patrones globales de metilación del ADN en animales con tumores mamarios, con patrones hipometilados más prevalentes en tumores malignos y aquellos con mayor comportamiento de recaída.

Sin embargo, los estudios de metilación en la región promotora de genes vinculados al desarrollo de CMT son escasos y se han realizado para los genes *BRCA1* (Qiu et al. 2016) y *ESR* (Brandão et al. 2018).

En tumores mamarios caninos, la sobreexpresión de los oncogenes miR-18a y miR-18b se asocia con una disminución de la expresión del ARNm diana de *ESR1* y una disminución de la inmunoexpresión del RE (receptor de estrógeno), especialmente en carcinomas altamente proliferativos. Esto sugiere un posible mecanismo epigenético donde miR-18a y miR-18b contribuyen a la desregulación del RE, lo cual podría ser importante en la progresión y el tratamiento del cáncer mamario canino (Abbate et al. 2023).

La investigación en carcinomas mamarios simples de perras ha demostrado que la expresión de histonas acetiladas H3 y H4, así como las enzimas histonas desacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC6, se encuentra alterada. Estas alteraciones están relacionadas

con la regulación de la transcripción y la remodelación de la cromatina, procesos que son fundamentales en la génesis y progresión del cáncer. (Senhorello et al. 2023).

Estudios en humanos, se observó que la mayor variación en la metilación del ADN se observa entre tejidos, las diferencias interindividuales en la metilación del ADN de los tejidos internos se correlacionan con las células sanguíneas para un grupo de sitios CpG. Esto refuerza la hipótesis de que la variación en la metilación del ADN a nivel sistémico en muchos tejidos podría estar asociada con la predisposición a ciertas enfermedades, permitiendo detectar la metilación diferencial del ADN en sangre asociada con el cáncer de mama varios años antes del diagnóstico (Severi et al 2014; van Veldhoven et al. 2015). En medicina humana existe una lista de terapias epigenéticas contra el cáncer en desarrollo. A pesar de los avances en la epigenética del cáncer, actualmente solo dos terapias epigenéticas contra el cáncer son recomendadas para el tratamiento de pacientes con cáncer por el Instituto Nacional de Salud y Excelencia en la Atención en el Reino Unido. Estas incluyen el inhibidor del ADN metiltransferasa (DNMT), 5'-azacitidina, para el síndrome mielodisplásico y ciertos tipos de leucemia, y el inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC), para el mieloma múltiple. Además, el inhibidor del potenciador del homólogo 2 de zeste (EZH2), ha recibido la aprobación en Europa para el linfoma de células B grandes por parte de la Agencia Europea de Medicamentos. Sin embargo, en Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ha aprobado nueve terapias epigenéticas, incluidos dos inhibidores de DNMT (DNMTI), cuatro inhibidores de HDAC, dos inhibidores de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y, recientemente, el inhibidor de EZH2 tazemetostat. (Hillyar et al 2020).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es la primera causa de muerte en perros, siendo responsable de un 27-30% de las muertes, aumentando hasta el 50% en algunas razas como el Golden Retriever o el Boyero de Berna (Adams et al. 2010; Fleming et al. 2011). Un estudio realizado entre 1985 y 2002 en Uruguay indicó que la incidencia de cáncer fue 3 veces mayor en hembras que en machos, diferencia que se explica por la alta tasa de cáncer de mama observado en perras (Elgue et al. 2012). Los tumores de mama son los más frecuentes en hembras caninas dentro de las consultas oncológicas. También se debe considerar que la especie canina es un buen modelo en humanos entre otras cosas por compartir su ambiente (Liu et al. 2014). Es interesante considerar este último punto a la hora de realizar estudios comparativos entre ambas especies. Se debe considerar el enfoque de “una sola salud” usado ya desde hace unos años a nivel mundial, dados los puntos en común que esta patología tiene con su contraparte en humanos.

El cáncer de mama es una neoplasia de origen multifactorial y los agentes causales pueden diferir dependiendo de la población de estudio, dada la variabilidad de causas genéticas, no genéticas y de las interacciones entre ellas. Los avances en la investigación clínica molecular y genética aumentaron notablemente nuestro conocimiento de la biología básica del cáncer. El cáncer se reconoce claramente como una enfermedad compleja, que implica cambios en la secuencia genética, epigenética y fenotípica. Investigación exhaustiva en genética molecular aplicada a la oncología, ha llevado a la identificación de perfiles genéticos asociados con características de las neoplasias en la clínica y patología en el comportamiento biológico de los tumores y con su respuesta al tratamiento. En humanos hay numerosos estudios que identifican genes asociados al cáncer de mama entre ellos *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, los reportes respecto a cambios en genes *BRCA1/BRCA2* en la especie canina con cáncer de mama a nivel poblacional y evolutivo son escasos en el mundo. Más aún, se desconoce la asociación respecto del análisis de secuencias de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en muestras emparentadas de razas caninas, en especial, la raza Cimarrón que es propia de nuestro país.

Por otro lado, como fuera mencionado existe suficiente evidencia que las alteraciones epigenéticas y sus variaciones interindividuales influyen sobre el riesgo a padecer cáncer y pueden emplearse como biomarcadores potenciales. Los estudios son escasos, y algunos de ellos no cuentan con el óptimo control (mama sana en el mismo animal).

Por lo tanto, esta tesis doctoral nos permitirá profundizar en el conocimiento de las secuencias de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en una muestra de perras en nuestro país, e implementar por primera vez una técnica nueva en medicina veterinaria como es la metilación global en tumores mamarios caninos. Esta técnica además de ser de utilidad nos va a servir para el estudio de tumores de mama y también puede brindar información de otros tipos tumorales. Este enfoque ofrece nuevas oportunidades para los pacientes con cáncer humanos y especies animales actuales y futuros.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Las perras que desarrollan tumores de mama presentan alteraciones del ADN en el intrón 9/exón 10 del gen *BRCA1* y del exón 10 de *BRCA2*. Capítulos I y II.

Las perras con tumores de mama presentan cambios epigenéticos que se verán reflejados en la hipometilación global de dicho tejido en comparación con el tejido mamario sano del mismo animal. Capítulo III.

Objetivos generales

Contribuir al conocimiento sobre la genética molecular de los genes *BRCA1*, *BRCA2* en perras con tumores de mama y en razas emparentadas con cáncer de mama.

Determinar si existen diferencias en la metilación global del ADN entre tejido tumoral y tejido sano mamario.

Objetivos específicos

- I) Determinar polimorfismos genéticos en la región del intrón 9-10/exón 10 del gen *BRCA1* de caninos de Uruguay con cáncer de mama a nivel poblacional y evolutivo (Artículo I).
- II) Análisis de secuencias en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de muestras emparentadas de caninos con antecedentes de tumores mamarios (Artículo II).
- III) Identificar metilación genómica global entre tejido tumoral, tejido mamario sano del mismo animal en un grupo de perras con cáncer de mama (Artículo III).

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Esta tesis se planificó con tres diseños experimentales para alcanzar los objetivos específicos planteados.

En el capítulo I (**Artículo I**), se seleccionaron 15 hembras enteras (n=15), de edad mediana a geronte (6 a 12 años), ya que es la edad con mayor aparición de tumores mamarios. Dada la relevancia de los estadios, se realizó la descripción completa de los mismos y el estudio histopatológico. Los casos fueron seleccionados según las características clínicas de la especie; nódulos/tumores en la región mamaria con características clínicas compatibles con tumores mamarios. La selección del gen *BRCA1* fue previamente detallada en la introducción de la tesis. El grupo control fueron hembras clínicamente sanas sin patologías oncológicas con el mismo rango de edad. En el presente

trabajo nos propusimos estudiar a nivel poblacional y evolutivo, polimorfismos localizados en una región de corte y empalme del exón más grande del gen *BRCA1*, en una población de perras con distintos tipos histopatológicos de tumores mamarios.

En el capítulo II (**Artículo II**) se seleccionaron una población de 15 caninos (n=15) emparentados de 4 razas diferentes (Caniche, Cimarrón, Bóxer y Gran Danés) con antecedentes familiares de cáncer de mama. Se eligieron estas razas por ser en las que hay descritos mayor incidencia de patologías oncológicas entre ellas el cáncer de mama. El Cimarrón es una raza autóctona del Uruguay de la cual contamos con muchos ejemplares, y nos pareció pertinente integrarlo dentro del grupo seleccionado. Hay muy pocos trabajos que estudien familias de perras con esta patología. Se trabajaron regiones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en las que se han descrito diferentes mutaciones, según la base de datos Ensembl.

En el capítulo III (**Artículo III**) se seleccionaron 29 caninos hembras (n=29) enteras entre 6 y 12 años con tumores de mama que fueron derivadas a cirugía. Todas ellas fueron estadificadas previamente y presentaban chequeos prequirúrgicos dentro de los rangos de referencia. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de metilación genómica global en tumores de mama y para ello, el grupo control fue el tejido mamario sano del mismo animal en una población de perras con cáncer de mama. Como punto de gran importancia, se buscará estandarizar la técnica descrita, en perras con tumores mamarios, por primera vez en nuestro país.

CAPITULO I

Objetivo específico

Determinar polimorfismos genéticos en la región del intrón 9-10/exón 10 del gen *BRCA1* de caninos de Uruguay con cáncer de mama a nivel poblacional y evolutivo (**Artículo I**).

Materiales y Métodos

Se seleccionaron 15 perras (n=15) de 6 razas diferentes y cruzas con tumores de mama con edad de 6 a 12 años por ser la edad de mayor incidencia de estos tumores. Se realizó la estadificación clínica TNM según la OMS. Los casos fueron seleccionados según las características clínicas de la especie; nódulos/tumores en la región mamaria con características clínicas compatibles con tumores mamarios y la clasificación histopatológica se realizó según Goldshmidt et al. (2011) luego de la cirugía.

Para el grupo control se seleccionaron 14 perras con edad de 6 a 12 años, de diversas razas con otras patologías que no fueran oncológicas para que los dos grupos fueran homogéneos. Se descartó cualquier patología oncológica mediante la revisión clínica, radiografía de tórax (triple incidencia) y ecografía de abdomen.

En el presente trabajo se propuso estudiar a nivel poblacional y evolutivo, polimorfismos localizados en una región corte y empalme del exón más grande del gen *BRCA1*. En particular estudiar al SNP1 y su efecto sobre el cambio aminoacídico en la proteína codificada, en una población de perras con distintos tipos histopatológicos de tumores mamarios.

El trabajo se realizó en el Hospital y en el área de Genética de la Facultad de Veterinaria. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Uso de Animales (CEUA) con el N° 518.

Los datos de las perras con tumores mamarios y los resultados histopatológicos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Descripción de los pacientes, estadificación clínica (según la OMS), diagnóstico histopatológico y clasificación.

Caso	Edad (años)	Raza	Estadio	Grado histopatológico	Histopatología
1	6	Caniche	I	II	Carcinoma mixto
2	8	Rottweiler	III	III	Carcinoma tubular simple
3	12	American Staffordshire terrier	III	III	Carcinoma túbulo papilar
4	6	Cocker	III	II	Carcinoma tubular simple
5	10	Cruza	II	Benigno	Adenoma complejo
6	12	Cruza	V	III	Carcinoma complejo muy indiferenciado
7	10	Cimarrón	III	III	Carcinoma anaplásico
8	8	Cocker	I	III	Carcinoma sólido
9	12	cruza	V	III	Mioepitelioma maligno
10	12	Cimarrón	III	II	Carcinoma túbulo papilar
11	6	Caniche	I	Benigno	Adenoma complejo con hiperplasia lobulillar intraductal
12	12	Caniche	I	Benigno	Tumor mixto benigno
13	12	Cimarrón	III	II	Carcinoma túbulo papilar
14	12	Bóxer	II	II	Carcinoma complejo
15	11	Pitbull	I	Benigno	Adenoma complejo

Estudios moleculares de ADN

A los animales seleccionados se les extrajo sangre periférica de la vena radial (2 a 5 ml) en las condiciones de asepsia correspondientes, considerando el protocolo de bienestar animal. Se utilizaron tubos con anticoagulante y se conservaron a -18 °C. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Quick DNATM Miniprep Plus Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cuantificaron las muestras de ADN empleando espectrofotómetro Nanodrop ND 1000, con espectro total (220-750 nm).

Se amplificó por PCR a tiempo final en un equipo Multigene II (Labnet International, Inc., USA) un fragmento de pb 281 pb, correspondiente a la región intrón 9-10/exón 10 del gen *BRCA1* (ENSCAFE00845051080). Se utilizó el siguiente juego de primers: F 5' → 3' AGGTGCTTTATTTCCACTCCCC y R 5' → 3' TCATGCTGTAATGAGCTGGCA diseñados con el programa de dominio público Primer-Blast (Ye et al. 2012).

Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 1) desnaturalización a 95°C - 30 segundos, 2) hibridación a 56°C - 30 segundos y extensión a 72°C - 30 segundos. La extensión final fue de 72°C durante 5 minutos. Se confirmaron los resultados del PCR a través de electroforesis en geles de Agarosa al 1% en buffer TBE 1x. La electroforesis se realizó utilizando un sistema de electroforesis en gel horizontal HU13 MIDI (Scie-plas, Gran Bretaña) y una fuente de alimentación POWER PAC 3000 (Bio-Rad, EE. UU.). Las bandas resultantes se visualizaron bajo luz ultravioleta utilizando un instrumento BIOSENS SC805-BIOTOP (Shanghai Bio-Tech Co., Ltd., China). Los productos de PCR (cadenas F y R) fueron enviados para su secuenciación Sanger en un equipo ABI 3500 (Thermofisher, USA), en la empresa GENEXA de Uruguay con el fin de estudiar los polimorfismos identificados en dicha región.

Análisis estadístico e in silico

Utilizando el programa Bioedit de distribución libre (Hall 1999) se realizó el alineamiento de las 29 secuencias para identificación de polimorfismos SNP en el fragmento amplificado y compararlo con la secuencia de referencia de genoma canino (Ensembl Dog, ROS_Cfam_1.0).

Los cálculos de variabilidad genética, test de Chi cuadrado para frecuencias alélicas de polimorfismos y equilibrio de Hardy-Weinberg (EH&W) se realizaron con el programa de distribución libre POPGENE versión 1.32 (Yeh et al. 1999).

Para el estudio del efecto del cambio de aminoácido producido por el SNP1 en la proteína *brc1*, se utilizaron herramientas de aplicación en bioinformática on line de distribución libre: **a)** programa SIFT Sorting Intolerant From Tolerant, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>, (Sim et al., 2012), y **b)** programa PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2 (Adzhubei et al 2010). Utilizando el algoritmo on line BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se realizó un alineamiento y árbol de distancia genética Neighbor-joining de la secuencia

amplificada con información genómica disponible de especies de la familia Canidae (Adzhubei et al. 2010; Boratyn et al.2013). Por otra parte, de la base Ensembl Dog, ROS_Cfam_1.0 se descargó la información de una población de referencia de 216 genotipos de caninos reportados para el SNP1 (204 homocigotas G/G, 10 heterocigotas G/A y 2 homocigotas A/A) para realizar análisis comparativos de frecuencias alélicas y EH&W con nuestras dos poblaciones.

Resultados y discusión

Mediante la técnica de PCR-secuenciación y posterior alineamiento de las secuencias se identificó la presencia del polimorfismo bialélico SNP1 en ambas poblaciones de caninos hembras (grupo tumor y grupo control). En el grupo tumor, 2 hembras presentaron el genotipo heterocigoto GA, siendo los 13 restantes homocigotas GG. En el grupo control, 3 hembras presentaron genotipo heterocigoto GA, siendo los 11 restantes homocigotas GG. En ninguno de los dos grupos se evidenció la presencia de homocigotas AA para el alelo mutante (**Figura 2**).

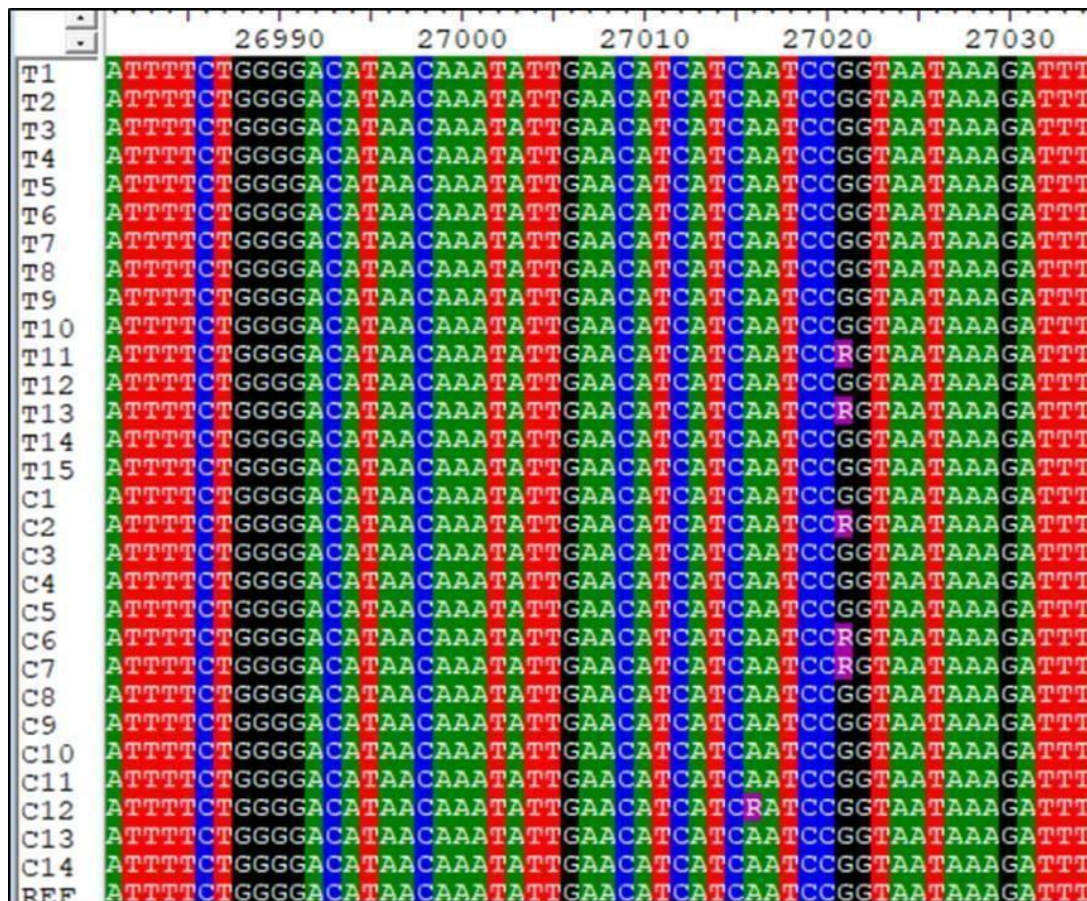


Figura 2. Alineamiento múltiple parcial de la secuencia amplificada del intrón 9-10/exón 10 del gen *BRCA1* de las 15 hembras caninas con tumores (T1-T15) y las 14 hembras control (C1-C14), la muestra REF corresponde a la secuencia de referencia ENSCAFG00845006070 del Ensembl (*Canis Lupus familiaris*). En la posición 27021 se observa el polimorfismo SNP1 (Letra R, en color violeta).

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas en ambas poblaciones (Chi cuadrado 0.33, $p > 0.5$), por lo tanto, este SNP1 no estaría vinculado con los tumores mamarios en los animales estudiados. Por otro lado, ambas poblaciones se encontraron en EH&W mientras que la población de referencia no se encontró en EH&W (**Tabla 2**).

Tabla 2. Frecuencias alélicas: Se presentan las frecuencias alélicas observadas del SNP1 y los resultados del test de Chi-cuadrado (X^2) para EH&W.

Exón10-SNP1c.715G>A Frecuencias alélicas y X^2 para EH&W	Con tumores (CMT)	Controles (C)	Población de referencia
Alelo G	0.933	0.893	0.968
Alelo A	0.067	0.107	0.031
X^2 y P (EH&W)	0.0765 $P \geq 0.70$	0.202 $P \geq 0.50$	16.03 $P < 0.001$

Esta desviación del EH&W observada en la población de referencia podría explicarse por el desconocimiento del método de genotipificación utilizado, ya que, según Iniesta et al. (2005), esto es plausible de generar sesgos al interpretar los resultados de los distintos genotipos. Estos autores también plantean la posibilidad a nivel biológico de que exista consanguinidad en la población o que se esté ejerciendo selección para algún alelo. En referencia al SNP2 (variante sinónima, W, A/T) c.738T>A), en los grupos estudiados (CMT y C), no fue identificada la mutación siendo monomórfico. Si bien este SNP2 se encuentra descrito en la base Ensembl, no existen datos de genotipado en poblaciones de referencia. Di Giacomo et al. (2022), utilizando un panel AmpliSeq para la identificación de variantes de *BRCA1* en una muestra poblacional de 22 perras, identificaron 12 SNP (10 de ellos con cambio no sinónimo). Estos autores identifican 2 SNP en el exón 10 siendo diferentes al identificado en este trabajo.

Con respecto al efecto del cambio de aminoácido producido por el SNP1 en la proteína brc1 (Gly/Ser en posición 239), con el programa SIFT se obtuvo una puntuación de 0.08 (cambio de aminoácido “tolerado”), mientras que sustituciones con puntuaciones < 0.05 se consideran “perjudiciales” (se alteraría la función de la proteína). Del mismo modo con el programa PolyPhen-2 se obtuvo un resultado similar siendo una sustitución de tipo “benigna” con un score de 0.007 (sensibilidad 0.96, especificidad 0.75). En este programa los valores más cercanos a 1 se predicen con mayor confianza como “perjudiciales” (opuesto a la escala del programa SIFT).

A nivel filogenético, la secuencia amplificada por nosotros presentó mayor homología con *Canis lupus dingo* y con *Canis lupus familiaris* presentando separación evolutiva con los géneros *Vulpes* y *Nyctereutes* como era de esperar (**Figuras, 3,4,5,6,7,8**). Recientes revisiones taxonómicas consideran que el cánido Dingo debería considerarse un *Canis familiaris* siendo esta la denominación taxonómica apropiada para razas de perros antiguos, modernos y sus híbridos (Jackson et al. 2021). En primates hay evidencia que *BRCA1* evoluciona por selección positiva (mutaciones generan ventajas en la resistencia a virus por parte de las células). Esto estaría explicando la evolución del mismo y transmisión de mutaciones relacionadas al cáncer (Lou et al. 2014).

En este trabajo pudimos comprobar que la región de inicio de corte y empalme del exón más grande de *BRCA1* en caninos, si bien presenta polimorfismos de tipo SNP, estos no afectarían la funcionalidad de la proteína codificante y no estarían relacionados con la presencia de tumores en este grupo de animales.



Figura 3.
Vulpes vulpes (zorro rojo).



Figura 4.
Nyctereutes procyonoides (Perro mapache)



Figura 5.
Vulpes lagopus (zorro polar).



Figura 6.
Canis lupus dingo



Figura 7

Canis lupus familiaris (perro doméstico).

Fuente de la autora.

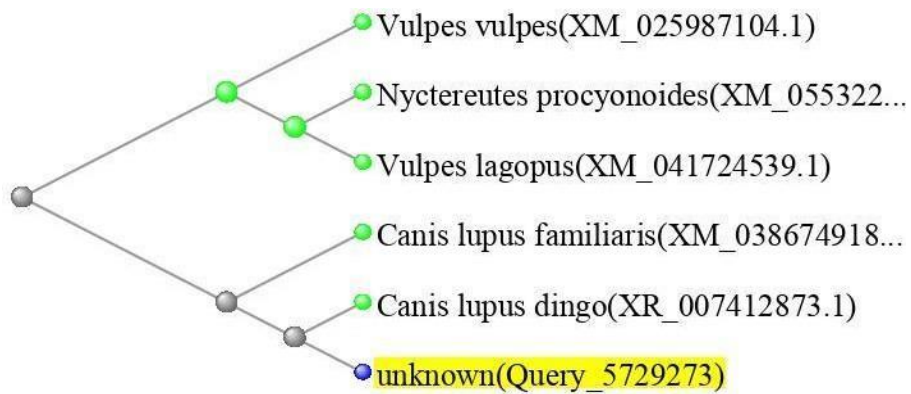


Figura 8. Árbol de distancia genética Neighbor-joining utilizando la secuencia amplificada con el programa de alineamiento múltiple tBlastn en la familia *canidae*. El círculo azul pertenece a la secuencia consenso amplificada en este trabajo. El soporte de bootstrap, basado en 1000 réplicas, indica un valor alto superior al 95%.

CAPITULO II

Objetivo específico

Análisis de secuencias en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de muestras emparentadas de 4 razas de caninos con antecedentes de tumores mamarios (**Artículo II**).

Materiales y Métodos

Se trabajó con una muestra total de 15 caninos (n=15) (Población P), de 4 razas diferentes 6 caninos de la raza Gran danés (4 hembras y 2 machos) hijos de una hembra con diagnóstico histopatológico de carcinoma tubular simple, 3 caninos de la raza Bóxer (hembras hermanas) hijas de una hembra con diagnóstico histopatológico de carcinoma quístico papilar, 4 caninos (3 hembras y 1 macho) de la raza local Cimarrón Uruguayo (Standard Federation Cynologique Internationale CI N° 353), con antecedente familiar por parte de la madre con diagnóstico histopatológico de carcinoma simple y dos caninos de la raza caniche (hembras) con antecedente por parte de la madre con diagnóstico histopatológico de carcinoma complejo.

En el caso de los animales de las razas Gran danés y Bóxer, la madre de los mismos fue diagnosticada con cáncer de mama, pero no participaron del trabajo por falta de disponibilidad en ambos casos. En las razas Cimarrón y Caniche, las madres de los animales en estudio fueron diagnosticadas con cáncer de mama y formaron parte del muestreo.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética y Uso de Animales (CEUA) con el número 2157.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Unidad de Genética y Mejora Animal y en el Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República Las razas que formaron parte de este trabajo fueron el Caniche, Gran Danés, Cimarrón y Boxer. (**Figura 9**).



<https://es.wikipedia.org/wiki/>

Figura 9. Razas utilizadas en el estudio. Caniche, Gran Danés, Cimarrón y Bóxer.

Estudios moleculares de ADN

A los animales seleccionados se les extrajo sangre periférica de la vena radial (2 a 5 ml) en las condiciones de asepsia correspondientes, considerando el protocolo de bienestar animal realizado por veterinarios particulares que nos proporcionaron las muestras para este estudio. Se utilizaron tubos con anticoagulante (EDTA) que fueron conservados a -18 °C. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Quick_DNATM Miniprep Plus Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 µl de muestra para cuantificar la concentración y pureza del ADN empleando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) con espectro completo (220-750 nm). El software calcula automáticamente la concentración de los ácidos nucleicos. Posteriormente se procedió a las amplificaciones por PCR; se trabajaron regiones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en las que se han descrito diferentes mutaciones, según la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Se amplificó por PCR a tiempo final en un equipo Multigene II (Labnet International, Inc., USA). A continuación, se presentan los juegos de primers utilizados:

Primers de *BRCA1* utilizados para la amplificación de la región intrón 9-10/exón 10 (tamaño del amplicón 281 pb) (Decuadro et al. 2025):

BRCA1 F: AGGTGCTTTATTTCCACTCCCC

BRCA1 R: TCATGCTGTAATGAGCTGGCA

Primers de *BRCA2* utilizados para la amplificación de una región del exón 10 (tamaño del amplicón de 301 pb) diseñados con el programa de dominio público Primer-Blast (Ye et al. 2012):

BRCA2 F: AGCCCTTTGGGAATGGAACT

BRCA2 R: TCAAGACACTGCCCTTCGTT

Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 1) desnaturalización a 95°C - 30 segundos, 2) hibridación a 56°C - 30 segundos y extensión a 72°C - 30 segundos. La extensión final fue de 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR de las 15 muestras analizadas fueron enviados para su secuenciación por método automatizado de Sanger (secuenciación de cadenas forward y reverse) en un equipo ABI 3500 (ThermoFisher, USA de la empresa GENEXA, Uruguay) para identificación de SNPs.

Análisis in silico y estadístico

Mediante el programa Bioedit de libre distribución (Hall, 1999) se realizó el alineamiento de las 15 secuencias amplificadas para el gen *BRCA1* y el gen *BRCA2*, y se comparó con las secuencias de referencias del genoma canino y de las razas que se encuentran en la base de datos Ensembl Dog ROS_Cfam_1.0 (Boxer, Gran Danés, Basenji, Ovejero Alemán). Los cálculos de variabilidad genética y test de Chi cuadrado para comparación de frecuencias alélicas entre la población P con la población de referencia (PR), se realizaron con el programa de libre distribución POPGENE versión 1.32 (Yeh et al., 1999). Los datos de las poblaciones de referencia fueron descargados de la base Ensembl Dog, ROS_Cfam_1.0. Para el SNP1 (c.715G>A *BRCA1*) la población de referencia reportada fue de 216 animales con los siguientes genotipos: 204 homocigotas G/G, 10

heterocigotas G/A y 2 homocigotas A/A. Para el SNP2 (c. 1341 G>A *BRCA2*) la población de referencia reportada fue de 218 animales con los siguientes genotipos: 209 homocigotas G/G, 8 heterocigotas G/A y 1 homocigotas A/A. Mediante el algoritmo on line BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando la secuencia consenso de las 15 muestras analizadas en la población P se realizó un árbol de distancia genética Neighbor-joining de la secuencia amplificada del Exón 10 de *BRCA2* con información genómica disponible de especies de la familia Canidae (Boratyn et al. 2013).

Resultados y Discusión

La selección de razas para este estudio se realizó en base a los diferentes estudios donde se observó mayor incidencia de CMT en razas de diferente porte, tanto en animales de pequeño y también de gran porte. (Rivera et al. 2009; Cassali et al. 2024). En nuestro país tenemos un alto número de Caniches y Cimarrones por lo que se decidió su inclusión en este trabajo por tratarse de las razas mas representativas. El Bóxer es una raza donde está estudiada su alta prevalencia de patologías oncológicas (Brønden et al. 2010), y el Gran Danés está dentro de las razas de gran porte y poco estudiada hasta el momento a nivel molecular. Se sabe poco sobre la neoplasia canina familiar, aunque diversos autores han mencionado una mayor incidencia en animales cruza que en razas puras (Nieto et al. 2003).

A partir del alineamiento mediante el software Bioedit de las secuencias analizadas para los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y su comparación con las secuencias de referencias disponibles en el Ensembl (Bóxer, Gran Danés, Basenji, Ovejero Alemán), no se encontraron nuevas variantes. Para el SNP2c. 1341 G>A en el exón 10 de *BRCA2*, se observó que en las razas Bóxer y Basenji se distingue una base Adenina (A), mientras que en el Gran Danés y Ovejero Alemán la base en esa posición es una Guanina (G). Si bien en la actualidad en la base de datos genómicos existen numerosos datos de individuos de diferentes razas, generadas principalmente por el proyecto Dog10K (Meadows et al. 2023), los estudios de variación genética en perros utilizaron durante mucho tiempo como referencia al individuo de raza Bóxer llamada Tasha. En este sentido Nguyen et al. (2024) mencionan que aún no es claro como el uso de una única referencia puede afectar a los estudios de variación genética basados en la secuenciación. Estos autores señalan que, debido a la endogamia presente en el desarrollo de las razas modernas de perros, utilizar un único genoma de referencia derivado de una raza particular puede sesgar el análisis de la variabilidad genética dentro y entre caninos.

En la secuencia analizada del intrón 9-10/exón 10 de *BRCA1* se identificó en un animal de la raza Bóxer el SNP1 c.715G>A con genotipo heterocigota (G/A), mientras que los restantes 14 animales fueron todos homocigotas G/G. Al realizar el test de chi cuadrado no se encontraron diferencias significativas de las frecuencias alélicas entre la población analizada P y la población de referencia (Valor de Chi-cuadrado de 0.0008, Valor $p=0.999>0.05$) (**Tabla 3**).

En el capítulo I analizando este polimorfismo en dos poblaciones de caninos hembras con tumores mamarios y grupo control de perras sanas tampoco encontramos diferencias significativas para poder generar indicios de asociación de esta variante con el cáncer

mamario. Por otra parte, se demostró que a pesar de que el SNP1c.715G>A produce un cambio aminoacídico Gly/Ser en posición 239 de la proteína, este sería “tolerado” y no estaría afectando la función de esta. El interés en estudiar efectos de mutaciones (SNP) en este tipo de regiones se basa en que su conservación es fundamental para la función normal del gen, mientras que la desregulación de las transcripciones podría contribuir a la patogénesis del cáncer mamario en humanos (Dan Li et al. 2019).

En cuanto al análisis de la secuencia del exón 10 de *BRCA2* (siendo en cuanto a tamaño en pb el segundo exón codificante más grande del gen) no se encuentra variabilidad genética en el SNP2c. 1341 G>A siendo todos los animales de la población P, homocigotas G/G (monomórficos). Al realizar el test de chi cuadrado no se encontró diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de la población analizada P y la población de referencia (valor de Chi-cuadrado de 0.703, $p = 0.872 > 0.05$) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos identificados en las secuencias de *BRCA1* y *BRCA2* en la población P y en la población de referencia.

<i>BRCA1</i>-Exón10-SNP1c.715G>A Frecuencias Alélicas y genotípicas	P Población	PR Población de referencia
Alelo G	0.966	0.968
Alelo A	0.033	0.031
G/G	0.9333	0.9444
G/A	0.0667	0.0463
A/A	0.0000	0.0093
<i>BRCA2</i>-Exón 10-SNP2c.1341G>A Frecuencias alélicas y genotípicas	P Población	Población de referencia
Alelo G	1	0.977
Alelo A	0	0.023
G/G	1.00	0.9587
G/A	0.00	0.0367
A/A	0.00	0.0046

Este SNP2c. 1341 G>A en *BRCA2* produce una variante de tipo sinónimo (aminoácido Lys, K/K) no afectando la estructura de la proteína. (Dyer et al. 2025). Por otra parte, variaciones genéticas (SNP codificantes o no codificantes, inserciones/delecciones) del *BRCA2* en caninos podrían estar implicadas en la tumorigénesis afectando a nivel de la función de la proteína como de la transcripción (Thumser-Henner et al. 2020). En nuestro

país, hay estudios recientes realizados en estos genes donde se evaluaron mutaciones ocurridas en otras regiones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* y su relación con la histopatología tumoral observando que la correlación entre la clínica y la histopatología fue moderada pero representativa y observando 15 marcadores moleculares (SNPs, indels) de los cuales 6 de ellos fueron polimórficos, todos del tipo SNPs (Decuadro et al. 2022).

Huskey et al. (2020) mediante estudios de Whole genome sequencing identifican variantes en *BRCA2* potencialmente asociadas con el riesgo de cáncer mamario en distintas razas caninas y con distintos niveles de prevalencia según la raza, aunque advierten sobre la necesidad de validación de sus resultados. Siguiendo una estrategia similar a la utilizada para el gen *BRCA1* por Decuadro et al. (2025); el estudio filogenético de la secuencia amplificada del exón 10 de *BRCA2* presentó una cercanía en cuanto a mayor homología con el *Canis lupus dingo* y con *Canis lupus familiaris* y mayor separación los géneros *Nyctereutes* y *Vulpes* y **(Figura 10)**. El *Canis lupus dingo* conserva rasgos lupinos siendo el principal depredador en Australia después del ser humano y conservando aspectos reproductivos y comportamentales independientes cuando se los compara con el perro doméstico (Shipman, 2020). Genéticamente ocupan un mismo clado junto al 71% de las razas de perros y lobos siendo de esperar que al no estar completamente domesticado comparta rasgos similares a estos últimos (Larson & Fuller 2014). Trabajos recientes utilizando herramientas bioinformáticas “in silico” y el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) han podido dar un marco evolutivo comparativo entre secuencias de los genes *BRCA1/BRCA2* de humanos y 20.000 secuencias de diversos organismos, observando que determinados alelos asociados al cáncer en humanos pueden ser alelos “salvajes” en otras especies (Lai J & Sarkar 2021).

Profundizar en el conocimiento de las secuencias de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en perras con tumores mamarios, y su comparación con otras especies, aportarían datos de relevancia tanto desde el punto de vista evolutivo como a nivel de medicina veterinaria, contribuyendo al conocimiento de esta compleja patología.

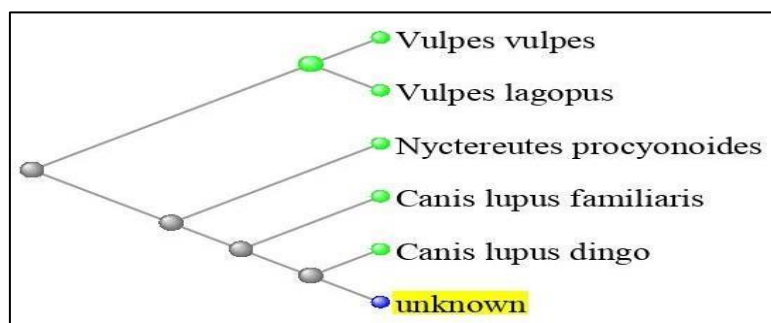


Figura 10. Árbol de distancia genética Neighbor-joining utilizando la secuencia amplificada del exón 10 de *BRCA2* con el programa de alineamiento múltiple tBlastn en la familia *canidae*. El círculo azul pertenece a la secuencia consenso amplificada en este trabajo. El soporte de bootstrap, basado en 1000 réplicas, indica un valor alto superior al 95%.

CAPITULO III

Objetivo específico

Identificar metilación genómica global entre tejido tumoral, tejido mamario sano en un grupo de perras con cáncer de mama (**Artículo III**).

Materiales y Métodos

El diseño experimental del protocolo III se llevó a cabo en el Hospital de Facultad de Veterinaria, en la Unidad de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria y las muestras fueron procesadas y analizadas en el área de Genética la Facultad de Medicina. (UdelaR) y fue aprobado por la Chea con el número 1383.

Se seleccionaron 29 hembras caninas enteras que ingresaron a consulta al Hospital con tumores de mama, con edades entre 6 y 12 años. Los casos de tumores de mama fueron elegidos atendiendo las características clínicas descritas previamente en la especie, seleccionando animales con características clínicas compatibles con la patología en estudio. Dichos animales presentaban un examen clínico general aceptable y estudios pre quirúrgicos (bioquímica sanguínea, análisis de orina) dentro de los rangos de referencia, cuya estadificación de la enfermedad permitiera la realización de una técnica quirúrgica adecuada (riesgo anestésico según la sociedad americana de anestesiólogos: ASA I o II). Se realizó la estadificación clínica de los pacientes con tumores mamarios TNM según la OMS lo cual se hace de rutina realizando radiografía de tórax (triple incidencia) y ecografía de abdomen. Las muestras de tejido (mamario sano y tumoral) fueron obtenidas el día de la cirugía.

Para las muestras de tejido para epigenética se tomaron dos muestras diferentes de tejido mamario (tejido sano y tumoral) que fueron guardadas en tubos eppendorf sin ninguna solución almacenadas a -80°C.

Las muestras de tejido mamario tumoral se obtuvieron al momento de la cirugía terapéutica, (uno para epigenética y otro para su estudio histopatológico).

Para las muestras de tejido mamario sano se unificó el criterio de donde tomarlas. Se extrajo de la mama contigua ya que generalmente se realizan cirugías regionales o mastectomías radicales donde varias mamas sanas son extirpadas en el mismo acto quirúrgico. Por este motivo no fue necesario biopsias de tejido mamario sano de la mama contigua que sería la otra forma de obtención de la muestra.

Se llevó a cabo la extracción de ADN de los 29 animales con tumor de mama (muestras de tejido tumoral y tejido mamario sano) utilizando un kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Se midió la concentración y pureza del ADN extraído en un equipo DeNovix DS-11. Las muestras de ADN se diluyeron con volúmenes de 80 ngr/ul.

Las determinaciones de los niveles de metilación genómica global se realizaron mediante la cuantificación relativa de 5-metil 2-desoxicitidina (5mdC) utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo a Berdasco et al., (2009) y Cappetta et al., (2015). En esta metodología el ADN se hidroliza previamente con nucleasa P1 (NEB) y fosfatasa alcalina (Invitrogen™) para producir 2'-desoximononucleósidos. La separación de los nucleósidos posterior a la hidrólisis genómica se realiza mediante HPLC y se detectan mediante UV. 1 µg de ADN genómico (en 10 µl de agua ultra pura) de cada muestra fue desnaturalizado a 94°C durante 10 min y rápidamente enfriado en hielo por 5 min. Luego se adicionó 1 µl de ZnSO₄ 10 mM y 1,5 µl de nucleasa P1 (Sigma-Aldrich, 200 U/ml en C₂H₃O₂Na 30 mM) y se incubó a 37 °C durante 16 hs. El ADN hidrolizado se incubó con FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) durante 1 hora adicional a 37°C y 10 minutos a 75°C según indicaciones del proveedor, en una reacción de 50 µl de volumen final.

Para la separación de los nucleósidos tras la hidrólisis genómica se utilizó HPLC (Agilent serie 1100 HPLC system). 50 µl de ADN hidrolizado fueron inyectado en una columna dC18 Atlantis (Waters) de fase reversa (2.1 x 20 mm; 5 mm de tamaño de partícula) protegida por una precolumna (2.1 x 20 mm; 5 mm de tamaño de partícula; Agilent) a un flujo constante de 0.150 ml/min. Se utilizaron 2 buffers: ácido fórmico 0.1% en agua (solvente A) y ácido fórmico 0.1% en agua: metanol (40%) (solvente B); en un gradiente isocrático de 95% del solvente A y 5 % del solvente B durante 25 minutos. Se utilizaron como estándares una mezcla a 5mM de los mononucleósidos siguientes: deoxiadenuína (dA), deoxitimidina (dT), deoxiguanosina (dG), deoxicitidina (dC), 5-metil-2'-deoxicitidina (5mdC) y deoxiuridina (dU) (Sigma-Aldrich).

El porcentaje de metilación global del ADN genómico se determina por integración del área del pico de 5mdC visualizado en el HPLC. Las muestras se analizaron por duplicado y se eliminaron aquellas cuya diferencia en contenido 5mdC entre los duplicados fue mayor al 3%. (Cappetta et al. 2015).

La cuantificación de 5mdC y dC se obtiene directamente del área de los picos visualizados en el HPLC. El nivel de metilación global del ADN genómico se expresa como la cantidad relativa de 5mdC en el total de residuos citidinas, es decir que, el porcentaje de metilación global del ADN genómico es: $[\text{mdC} / (\text{mdC} + \text{dC})] \times 100$. **Figura 11.**

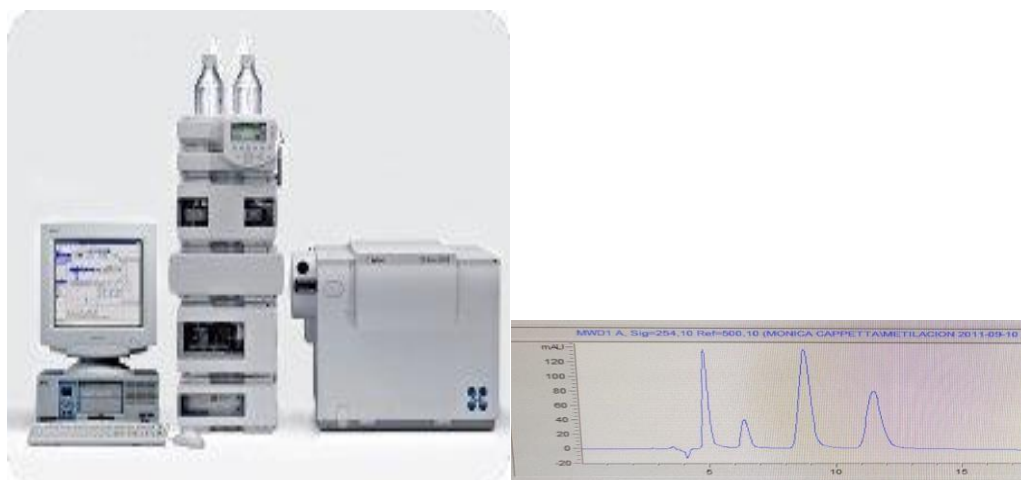


Figura 11. Equipo HPLC 21 Agilent Technologies serie 1200 con detección UV del laboratorio de la Facultad de Medicina y software donde se observa en el primer pico el porcentaje de citosina luego de la separación de los nucleósidos y en el segundo pico el porcentaje de citosina metilada.

Análisis Estadístico

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si se cumplía con la normalidad. Al cumplirse la normalidad se realizó la prueba t de student para muestras pareadas la cual determina si hay diferencia significativa entre dos conjuntos de datos tomados de los mismos sujetos en dos condiciones comparables, y el efecto d de Cohen para evaluar que tan grande es la diferencia entre los dos grupos. Valores mayores a 0,8 interpreta un efecto grande. (Cohen J. 1988).

Resultados y discusión

De las 29 perras que formaron parte de este estudio en 11 de ellas logramos un porcentaje de metilación en tejido sano que fuera significativo. El resto de los animales no alcanzaron el pico necesario de la citosina metilada en el software por lo cual tuvieron que ser descartadas. En la **Tabla 4** se describe la edad, raza, estadio de la enfermedad, clasificación y grado histopatológico de los tumores luego de la cirugía clasificados según (Goldshmidt et al. 2011). y % de metilación del tejido sano y tumoral.

Tabla 4. Descripción de los pacientes según la edad, raza, estadio, histopatología y porcentaje de metilación del tejido sano y tejido tumoral.

caso	edad	raza	Estadio	Grado histop.	Histopatología.	Metilación tej. sano	Metilación tej. tumoral
1	10	Cimarrón	III	II	Carcinoma quístico papilar	4,791892158	2,725887465
2	8	cruza	III	II	Adenocarcinoma simple	2,144284287	2,336448598
3	12	Cocker	III	II	Carcinoma mixto	2,413530977	2,285336856
4	8	cruza	III	III	Adenocarcinoma simple	4,342321813	2,766662856
5	7	cruza	III	benigno	Adenoma mixto	2,884515795	3,053574218
6	7	O. Alemán	III	II	Adenocarcinoma complejo	2,46986528	1,924168464
7	8	Pug	I	I	Carcinoma mixto	3,143661972	2,307747267
8	8	O. Alemán	I	benigno	Adenoma complejo	3,750999886	3,754702599
9	6	Caniche	I	benigno	Adenoma mixto	3,879251734	3,617225363
10	8	Cruza	III	II	Carcinoma simple	4,002230611	2,622711446
11	10	Caniche	I	II	Carcinoma sólido	4,027690371	3,458671344

De las 11 perras en estudio 8 de ellas presentaron tumores malignos y 3 tumores benignos. Los tumores malignos fueron 3 carcinomas simple, 2 carcinomas mixtos, 1 carcinoma quístico papilar, 1 adenocarcinoma complejo y un carcinoma sólido. Los tumores benignos fueron 2 adenomas mixtos y un adenoma complejo. Estos datos coinciden con los bibliográficos de los tumores más frecuentes según Goldshmidt et al. (2011).

Las razas estudiadas fueron 4 cruza, 2 caniches, 2 Ovejero Alemán, 1 Cocker, 1 Cimarrón y 1 Pug. Estas razas están sobrerrepresentadas en nuestro país, por lo que puede variar dependiendo de la localización geográfica. (Egenvall, et al. 2005).

Se realizó la comparación de niveles de metilación entre tejido sano y tumoral de las perras con diagnostico histopatológico de tumores mamarios observándose una diferencia significativa entre los valores de metilación global en tejido sano y tumoral ($p < 0.05$).

En las **Figuras 12 y 13** observamos niveles más bajos de metilación en el tejido tumoral en contraparte del tejido sano de las 11 perras, lo que indica que el tejido tumoral se encontraba hipometilado, lo cual es esperable según la bibliografía consultada, donde la hipometilación es reportada como una alteración epigenética común en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama en mujeres, en caninos, así como en otros tipos de cáncer.(Cappetta et al. 2015; Jeong et al. 2019; Biondi et al. 2021).

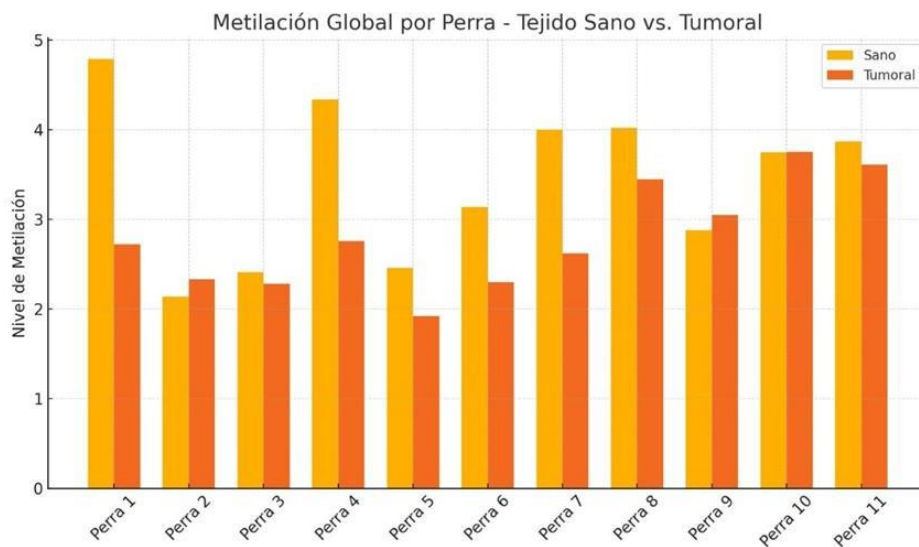


Figura 12. Comparación de niveles de metilación entre tejido sano y tumoral para cada perra.

En este grafico se observa una diferencia significativa entre los valores de metilación global en tejido sano y tumoral ($p < 0.05$).

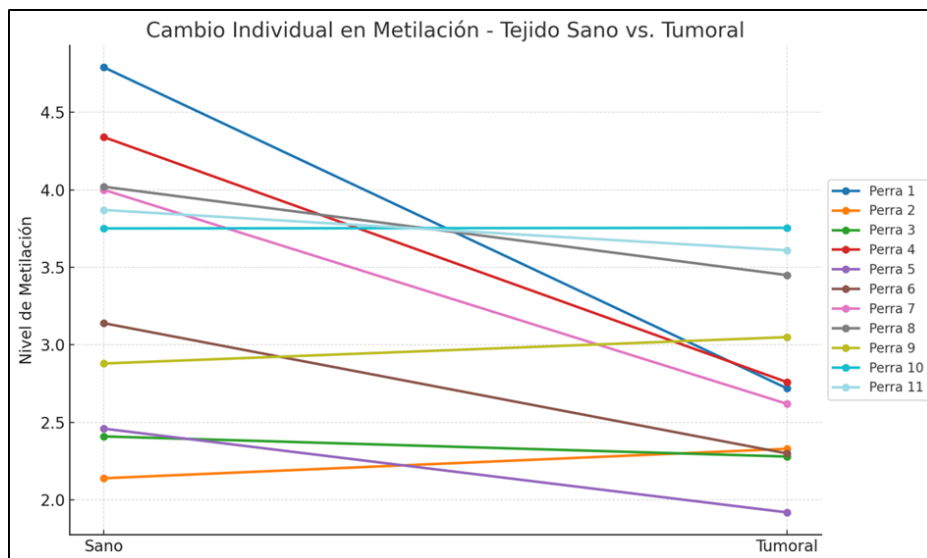


Figura 13. Gráfico comparativo entre los niveles de metilación global en tejido sano y tumoral para cada perra.

En la **Figura 14** se compara el porcentaje de metilación global del ADN entre tejido mamario normales y tumoral. Las diferencias estadísticamente significativas entre tejidos mamarios normales y tumores mamarios se determinaron mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$).

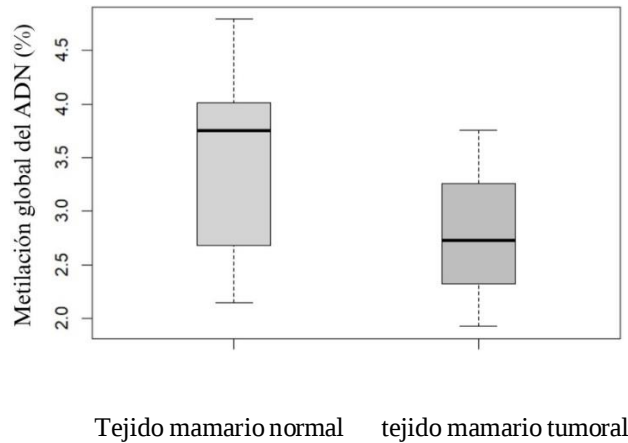


Figura 14. Comparación del porcentaje de metilación global del ADN entre tejidos mamarios normales y tumores mamarios. Los recuadros representan los rangos intercuartiles y las líneas transversales indican la mediana. Las diferencias estadísticamente significativas entre tejidos mamarios normales y tumores mamarios se determinaron mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$).

En las **Figuras 15 y 16** se observa en las 11 perras como este resultado indica que la diferencia de metilación entre tejido sano y tumoral no solo es estadísticamente significativo, sino que también tiene una magnitud considerable (efecto grande) utilizando el efecto d de Cohen con un valor promedio de 0,84 (valores superiores a 0,8 indican un efecto grande).

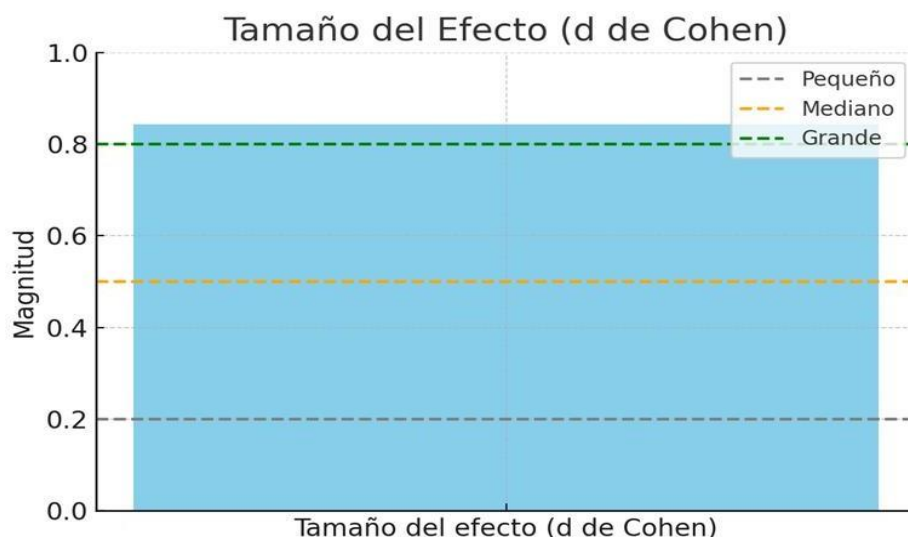


Figura 15. Se describe de forma general la magnitud del efecto d de Cohen con lo 3 valores de cohorte (0,2 bajo, 0,5 mediano y valores $> 0,8$ se considera alto. Este resultado indica una magnitud considerable (efecto grande, valor $> 0,8$)).

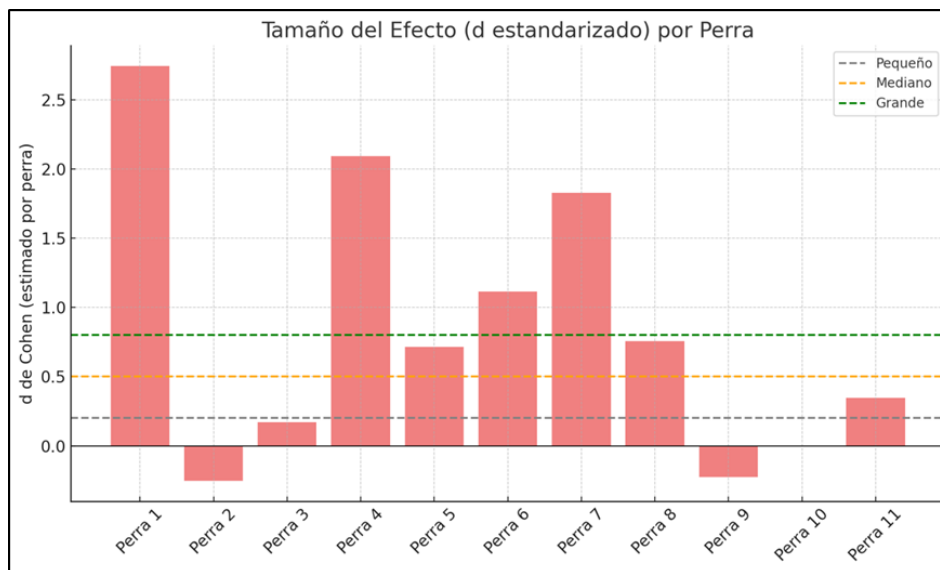


Figura 16. Tamaño del efecto estimado por perra, mostrando cómo varía la diferencia de metilación estandarizada entre tejido sano y tumoral en cada caso. Aunque el d de Cohen se interpreta globalmente, esta visualización permite identificar qué perras contribuyen más al efecto total. La muestra 1, 4 y 7 son las que presentaron mayor contribución empujando el resultado hacia un efecto grande.

Aunque las investigaciones sobre la metilación global en perras con CMT son escasas, existen estudios centrados en la metilación en genes específicos. Por ejemplo, el trabajo de Brandão et al. (2018) investigó el estado de metilación del ADN del gen ESR1 que codifica el receptor de estrógeno alfa, en CMT. Sus hallazgos indicaron que el estado de metilación de ESR1 no varió significativamente entre los diferentes tipos de tumor, lo que sugiere que la metilación del ADN no estaría implicada en la regulación de la expresión de ESR1 en tumores mamarios caninos. Esto contrasta con los hallazgos en el cáncer de mama humano, donde la metilación del ADN puede afectar significativamente la expresión de ESR1. Si bien el presente estudio se centró en la metilación genómica global y no en genes específicos como ESR1, es importante mencionar el efecto diferenciado que la metilación puede tener a nivel global en contraste al nivel génico, y que las modificaciones en genes específicos no necesariamente reflejan los cambios epigenéticos globales.

Por su parte, Jeong et al. en el (2019) investigaron los perfiles de metilación de todo el genoma en tejidos de tumor mamario canino y en células mononucleares de sangre periférica mediante secuenciación de bisulfito. Estos autores encontraron firmas de metilación únicas enriquecidas en CMT, con los genes relacionados con la apoptosis y el transporte transmembrana de iones estaban hipermetilados, mientras que genes relacionados con la proliferación celular y los oncogenes estaban hipometilados en los tejidos tumorales. La inclusión de muestras de sangre periférica por Jeong et al. (2019) marca un precedente para su uso en investigación en CMT. Esto se plantea como una futura línea de investigación para nuestro grupo, al tratarse de muestras menos invasivas que podría convertirse en una herramienta adecuada para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento.

Beetch et al. (2020) analizaron muestras de diferentes estadios tumorales, así como donantes sanos, describieron el patrón de hipermetilación de genes relacionados con el cáncer y encontraron que aquellos involucrados en la regulación transcripcional, la apoptosis, la transducción de señales y la migración celular estaban asociados con la expresión genética y la progresión de la enfermedad en caninos, lo que sugiere que el patrón de metilación tiene el potencial de ser utilizado en la clínica para distinguir estadios de progresión tumoral. El enfoque de dicho trabajo difiere del nuestro, sin embargo, coinciden en que el patrón de metilación fue diferente entre tumores mamarios caninos agresivos. De esta manera, las modificaciones en la metilación del ADN podrían orientar el monitoreo de la progresión de la enfermedad, que está vinculado al pronóstico.

La investigación en humanos se centra en lograr una comprensión más profunda de los mecanismos epigenéticos para obtener mejores terapias, así como en el aprovechamiento de terapias que promuevan la normalización epigenética global para contrarrestar las aberraciones epigenéticas. Estos enfoques mejorarán la utilidad de los fármacos epigenéticos, maximizando los beneficios en términos de retorno de la inversión en investigación y mejorando los pacientes con cáncer. (Hillyar et al. 2020). En caninos hay pocos estudios referentes al tema por lo que se espera aportar datos para comprender mejor la biología tumoral desde el punto de vista epigenético en cáncer de mama en caninos.

DISCUSIÓN GENERAL

Hasta la fecha, son pocos los estudios que han informado una asociación entre SNP y el riesgo de CMT en caninos. Entre ellos tenemos el trabajo de Yoshikawa et al. (2005 a) donde encontraron un único polimorfismo de inserción / deleción en la señal de localización nuclear 2 (NLS2) de *BRCA2* canino, llamado 10204ins / del AAA. Estos autores también informaron de otros polimorfismos en el exón 27 de *BRCA2* (Yoshikawa et al. 2005 b).

Hsu et al. (2010) encontraron variaciones del exón 11 de *BRCA2* observando SNPs que eran mutaciones sin sentido que podrían provocar cambios estructurales en la proteína *BRCA2* y mutaciones silenciosas que no provocan alteración de aminoácidos.

En un estudio realizado en China detectaron tres SNPs en *BRCA1* canino; un SNP asociado estadísticamente con CMT. Dos SNPs en las regiones promotoras y un SNP no sinónimo en el exón 23 (Sun et al. 2015).

Por su parte Qiu et al. (2016) encontraron dos mutaciones puntuales en la región codificante de *BRCA1* canino en una muestra de animales con tumor mamario benigno y en una muestra de animales con tumor mamario maligno. No se detectaron mutaciones en las muestras de tejido mamario canino normal. Así mismo Ozmen et al. (2017) detectaron por primera vez 19 SNP del exón 11 de *BRCA2* en tumores mamarios caninos. Los perros exhiben una notable diversidad genética entre razas, lo que influye significativamente en la biología del cáncer, la prevalencia de mutaciones y las respuestas al tratamiento. Debido a mutaciones genéticas heredadas, ciertas razas como Boxers, Golden Retrievers y Cocker Spaniels, presentan una mayor predisposición a tipos específicos de cáncer, incluyendo tumores mamarios (Rivera et al. 2009).

En 2 de los trabajos estudiamos regiones diferentes a los autores citados de *BRCA1* (intrón 9-10/exón 10) y *BRCA2* (exón 10), por ser regiones donde hay descritas mutaciones en la base de datos Ensembl. Estudiamos un grupo de perras con cáncer de mama vs. grupo control y otro grupo de perras con antecedentes familiares de cáncer de mama. No se encontró relación entre los marcadores estudiados y la ocurrencia de tumor de mama entre el grupo problema y el grupo control. Tampoco se encontraron diferencias relacionado con los marcadores estudiados en las perras con antecedentes familiares de tumores de mama. La caracterización de *BRCA1* y *BRCA2* en tumores caninos sigue siendo inconsistente entre los diferentes estudios. Esto surge de diversas metodologías, diferentes tamaños de muestra y la falta de protocolos estandarizados. Como resultado, es difícil obtener conclusiones definitivas sobre la prevalencia, la importancia funcional y las implicaciones terapéuticas de las mutaciones de BRCA en el cáncer canino. Aunque algunos estudios han identificado mutaciones en estos genes asociados con tumores mamarios y otros tumores en caninos, las variaciones en las tecnologías de secuenciación y los criterios para la clasificación de variantes contribuyen a hallazgos contradictorios (Rivera et al. 2009; Yoshikawa et al. 2015).

Para abordar las discrepancias entre diferentes autores, existe una necesidad de protocolos de pruebas genéticas estandarizados, marcos de informe unificados y colaboraciones

entre diferentes instituciones que puedan armonizar los esfuerzos de la investigación. Los análisis genómicos comparativos, que evalúan las variantes de BRCA en poblaciones caninas más grandes y múltiples tipos de cáncer, podrían mejorar la confiabilidad y reproducibilidad de los hallazgos. Establecer metodologías consistentes será crucial para avanzar en la medicina de precisión en oncología veterinaria y garantizar que las terapias dirigidas a BRCA se adapten con precisión a los pacientes caninos. Más allá de *BRCA1* y *BRCA2*, otros genes involucrados en la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular merecen investigación en oncología canina. Los genes supresores de tumores, como la proteína tumoral p53, frecuentemente mutada en varios tumores tiene un papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Las mutaciones en el homólogo de fosfatasa y tensina PTEN, un regulador clave de la proliferación celular y la apoptosis, también es de gran interés debido a su papel en la tumorigénesis. (Pasaol et al. 2025).

Por lo tanto, son necesarios más estudios para poder sacar conclusiones más acertadas y que dichos resultados sirvan a futuro para poder involucrar nuevos objetivos terapéuticos que podrían incluir terapias combinadas que involucran PARPi (olaparib, rucaparib, veliparib, iniparib) (Pulliam et al. 2018) e inhibidores de puntos de control inmunitarios u otros agentes que se dirigen a la respuesta al daño del ADN (Peyraud et al. 2020).

La importancia de la investigación trasciende la oncología canina, ya que enriquece la comprensión de la oncología comparada, ofrece nuevos conocimientos sobre la biología del cáncer e impulsa avances tanto en medicina veterinaria como humana. (Pulliam et al. 2018).

Los datos presentados en el análisis molecular realizado aquí pueden deberse a numerosos factores. Puede haber influido porque partimos de un número de animales bajo, de diversas razas, las cuales presentaban diferentes estadios tumorales y tuvimos diferencias en los grados histopatológicos desde tumores benignos a tumores malignos muy indiferenciados. Para futuros estudios se pretende aumentar el número de muestras de los bancos de ADN ya existentes, de ambas poblaciones. En lo que se refiere a la raza, se plantea circunscribir los animales estudiados, ya sea los que sean de determinada raza, o los animales cruza. Con esto se lograría una muestra de estudio más homogénea. Con respecto a las marcadoras estudiadas en caninos, la diferenciación entre tumores hereditarios-no hereditarios, no está tan estudiada. Puede ser que estos marcadores en concreto no estén tan involucrados en los tumores mamarios más frecuentemente encontrados en esta especie. A futuro se pretende aumentar el espectro de genes estudiados, con el fin de encontrar marcadores que sean de utilidad en distintos aspectos de la clínica oncológica.

La investigación en epigenética de tumores mamarios en caninos abarca varios enfoques, como la metilación del ADN, modificaciones de histonas y la regulación mediante microARNs (miRNAs). Se ha estudiado la metilación a nivel específico y global, identificando posibles biomarcadores y relacionándolos con el desarrollo, progresión y recurrencia de los tumores. Algunos estudios encuentran diferencias en la metilación entre tumores benignos y malignos, aunque en el caso del gen *ESR1* según el trabajo de Brandão et al. (2018), la metilación no varía significativamente en tumores caninos, a diferencia de lo observado en humanos.

Otros estudios, como el de Jeong et al. (2019), identifican firmas de metilación únicas en tumores caninos, relacionadas con apoptosis y transporte transmembrana de iones, mientras que Biondi et al. (2021) reportaron patrones de hipometilación más frecuentes en tumores malignos. Beech et al. (2020) sugiere que los patrones de metilación pueden servir como marcadores para distinguir estadios tumorales.

En nuestro trabajo, se encontró que los tumores mamarios caninos presentan niveles de metilación global más bajos en comparación con tejidos sanos, indicando hipometilación en tejidos tumorales. Estos hallazgos refuerzan la relevancia de la epigenética en la comprensión y diagnóstico del cáncer mamario en perras.

CONCLUSIONES

En el **Artículo I**, no se encontró relación estadísticamente significativa entre el marcador SNP1 y relación con tumores mamarios entre el grupo problema y el grupo control. Por otra parte, la sustitución aminoacídica que genera dicha mutación se considera “tolerada” en la proteína brc-1. La secuencia amplificada intrón 9-10/exón 10 de *BRCA1* a nivel filogenético mostró homología con la especie *Canis lupus familiaris* y relación más lejana con otros géneros como *Vulpes* y *Nyctereutes* de la familia *Canidae*. Como conclusión final las mutaciones en esta región de splicing del mayor exón de *BRCA1* no estarían relacionadas con la aparición de tumores mamarios en este grupo de animales.

En el **Artículo II**, a partir del alineamiento de secuencias comparadas con las razas Bóxer, Gran Danés, Basenji, Ovejero Alemán de referencia no se identificaron nuevos SNP en la muestra analizada. Se identificó para el SNP1 c.715G>A, ubicado en la secuencia estudiada de *BRCA1*, un animal con genotipo heterocigota (G/A), resultando los demás individuos homocigotas G/G. No se halló variabilidad genética en el SNP2c. 1341 G>A en *BRCA2*, siendo todos los animales estudiados homocigotas G/G. En ambos SNPs, al comparar las frecuencias alélicas entre la población analizada P y la población de referencia, no se encontraron diferencias significativas.

En cuanto al análisis filogenético de la secuencia estudiada del exón 10 de *BRCA2*, existe una mayor homología con *Canis lupus dingo* y con *Canis lupus familiaris*, en comparación con los géneros *Nyctereutes* y *Vulpes*.

Consideramos de importancia continuar aportando información molecular sobre estos dos genes supresores tumorales para continuar avanzando en el estudio de una enfermedad compleja como el cáncer mamario en caninos y como modelo para el estudio de la misma en humanos.

En el **Artículo III** se estudiaron los niveles de metilación global del ADN en perras con tumores de mama y tejido mamario sano (muestras control). Se observaron porcentajes más bajos de metilación del ADN en el tejido tumoral, siendo más marcado el efecto en tumores de alto grado histopatológico, en contraparte del tejido sano. En función de estos resultados podemos concluir que el ADN del tejido tumoral se encontraba hipometilado en relación al tejido sano. Este trabajo resalta la importancia de continuar con esta línea de investigación aumentando el tamaño muestral, principalmente para que en el futuro se pueda usar la metilación global del ADN como biomarcador para dar un pronóstico más certero de esta enfermedad.

PERSPECTIVAS

Las limitantes en veterinaria es poder conseguir un número de muestras que sea representativo por lo que nuestro objetivo es generar un banco de tumores de mama y tejido mamario sano y ADN de perras con cáncer de mama en la Facultad de Veterinaria, que a futuro puede ser usado en otros proyectos de investigación.

Por lo tanto, a futuro aumentaremos el tamaño muestral, principalmente para que también se pueda usar la metilación global del ADN como biomarcador para detección temprana y progresión de la enfermedad. Realizar otros estudios de epigenética en regiones promotoras de genes y a nivel genómico y poder utilizar otras técnicas como la secuenciación con bisulfito de sodio o inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales de ratón.

También a futuro nuestra perspectiva sería poder profundizar en el estudio de la metilación en tumores de mama y otros tipos tumorales que justifique adquirir el equipo de HPLC que generará más recursos humanos para el análisis epigenético (extracción de ADN, técnica de HPLC, análisis de datos) y poder ser replicados también a otras especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abbate, J.M., Arfuso, F., Riolo, K., Capparucci, F., Brunetti, B., & Lanteri, G. (2023). Epigenetics in Canine Mammary Tumors: Upregulation of miR-18a and miR-18b Oncogenes Is Associated with Decreased *ERS1* Target mRNA Expression and ER α Immunoexpression in Highly Proliferating Carcinomas. *Animals (Basel)*, 13(6), 1086.
- Adams, V., Evans, K., Sampson, J., & Wood, J. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*, 51(10), 512-524.
- Abdelmegeed, S.M., & Mohammed, S. (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters*, 15, 8195-8205.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., & Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248-9.
- Beetch, M., Harandi-Zadeh, S., Yang, T., Boycott, C., Chen, Y., Stefanska, B., & Mohammed, S. (2020). DNA methylation landscape of triple-negative ductal carcinoma in situ (DCIS) progressing to the invasive stage in canine breast cancer. *Scientific Reports*, 10, 2415.
- Berdasco, M., Fraga, M.F., & Esteller, M. (2009). Quantification of global DNA methylation by capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*, 507, 23– 34.
- BioEdit - Software para edición y alineamiento de secuencias biológicas. (2024). <https://bioedit.software.informer.com/download/?lang=es>
- Biondi, L., Tedardi, M., Gentile, L., Chamas, P., & Dagli, M. (2021). Quantification of global DNA methylation in canine mammary gland tumors via immunostaining of 5-Methylcytosine: Histopathological and clinical correlations. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 628241
- Boratyn, G., Camacho, C., Cooper, P., Coulouris, G., Fong, A. M. N., Madden, T., Matten, W., McGinnis, S., Merezuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E.W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41, W29-33.

- Borges, B. (2022). Epigenetic alterations in canine mammary cancer. *Genética y Biología Molecular*, 45(3 Suppl 1), e20220131.
- Borge, K., Borresen, D., & Lingaas, F. (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9, 241–250.
- Borrego, J. (2016). Urogenital and mammary gland tumors. (8°Ed.), (*Textbook of Veterinary Internal Medicine*) (cap. 351).
- Brønden, L., Nielsen, S., Toft, N., & Kristensen, A. (2010). Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(19), 586–590.
- Brandão, Y. de O., Toledo, M. B., Chequin, A., Cristo, T. G., Sousa, R. S., Ramos, E. A. S., et al. (2018). DNA methylation status of the estrogen receptor α gene in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 55(4), 510–516.
- Brookes, E., & Shi, Y. (2014). Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annual Review of Genetics*, 48, 237–268.
- Burrai, G., Gabrieli, A., Moccia, V., Zappulli, V., Porcellato, I., Brachelente, C., Pirino, S., Polinas, M., & Antuofermo, E. (2020). A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: A multicenter study. *Animals*, 10(10), 1687.
- Cappetta, M., Berdasco, M., Hochmann, J., Bonilla, C., Sans, M., Hidalgo, P. C., Artagaveytia, N., Kittles, R., Martínez, M., Esteller, M., & Bertoni, B. (2015). Effect of genetic ancestry on leukocyte global DNA methylation in cancer patients. *BMC Cancer*, 15, 434.
- Cassali, G., Nakagaki, K., Jark, P., Horta, R., Ariaa, A., Tellado, M., Lima, A., Sueiro, F., Reys, M., Wronski, J., Sierra, O., Kristancic, E., Decuadro, A., & Gómez, J. (2024). Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: Solid arrangement (2023). *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 17, 152–163.
- ClustalW - Herramienta para alineamiento múltiple de secuencias. (s.f.) <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
- Decuadro, A. (2021). 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, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/28768>

- Decuadro, A., Llambi, S., Benech, A., & Gagliardi, R. (2022). Analysis of polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 genes in a population samples of canines from Uruguay. *Revista Científica FCV-LUZ*, 32, 1–6.
- Decuadro, A., Sosa, M., García, F., Balemian, N., Montenegro, M., & Llambi, S. (2025). Analysis of genetic polymorphisms in the intron 9–10/exon 10 region of the BRCA1 gene in a population sample of dogs with mammary cancer from Uruguay. *Revista Científica FCV-LUZ*, 35, 1–6.
- Di Giacomo, D., Di Domenico, M., Defourny, S. V. P., Malatesta, D., Di Teodoro, G., Martino, M., Viola, A., D'Alterio, N., Cammà, C., Modesto, P., & Petrini, A. (2022). Validation of AmpliSeq NGS panel for BRCA1 and BRCA2 variant detection in canine formalin–fixed paraffin–embedded mammary tumors. *Life (Basel)*, 12(6), 851.
- Dyer, S., et al. (2025). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D948–D957.
- Egenvall, A., Bonnett, B., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., & von Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 109–127.
- Elgue V, Piaggio J, Amaral C, Pessina P. (2012). Factors Associated With the Presentation of the Type of Cancer in Dogs Assisted in the Hospital of the Faculty of Veterinary of Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 25–30.
- Enginler, S. O., Akış, I., Toydemir, T. S., Oztabak, K., Haktanir, D., Gündüz, M. C., Kırşan, I., & Fırat, I. (2014). Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Veterinary Research Communications*, 38(1), 21–27.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148–1159.
- Federación Cinológica Internacional (FCI)
<http://www.fci.be/es>
- Fleming, J., Creevy, K., & Promislow, D. (2011). Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: An investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 187–198.
- Genetix - Software para análisis genético y de polimorfismos. (s.f.) <https://kimura.univ-montp2.fr/genetix>
- Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., & Zappulli, V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, 48(1), 117–131.

- Gopal, A., Radhika, G., Aravindakshan, T. V., Thomas, N., & Devi, S. (2020). Candidate tumour suppressor genes associated with canine mammary tumour. *The Pharma Journal*, 9(10), 200–205.
- Győrffy, B., Bottai, G., Fleischer, T., Munkácsy, G., Budczies, J., Paladini, L., Børresen-Dale, A. L., Kristensen, V. N., & Santarpia, L. (2016). Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. *International Journal of Cancer*, 138(1), 87–97.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- He, K., Zhang, L., & Long, X. (2016). Quantitative assessment of the association between APC promoter methylation and breast cancer. *Oncotarget*, 7(25), 37920–37930.
- Hillyar, C., Rallis, K. S., & Varghese, J. (2020). Advances in epigenetic cancer therapeutics. *Cureus*, 12(11), e11725.
- Hsu, W., Huang, Y., Chang, T., Wong, M., & Chang, S. (2010). Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *The Veterinary Journal*, 184(3), 351–356.
- Huskey, A., Goebel, K., Lloveras-Fuentes, C., McNeely, I., & Merner, N. (2020). Whole genome sequencing for the investigation of canine mammary tumor inheritance: An initial assessment of high-risk breast cancer genes reveals BRCA2 and STK11 variants potentially associated with risk in purebred dogs. *Canine Medicine and Genetics*, 25, 7–8.
- Iniesta, R., Guinó, E., & Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333–341.
- Jackson, S., Fleming, P., Eldridge, M., Archer, M., Ingleby, S., Johnson, R., & Helgen, K. (2021). Taxonomy of the dingo: It's an ancient dog. *Australian Zoologist*, 41(3), 347–357.
- Jasin, M. (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: The BRCA connection. *Oncogene*, 21(58), 8981–8993.
- Jeong, J., Lee, H., Nam, R., & Cho, Y. (2019). Genome-wide methylation profiling in canine mammary tumor reveals miRNA candidates associated with human breast cancer. *Cancers (Basel)*, 11(10), 1466.
- Jovanovic, J., Rønneberg, J. A., Tost, J., & Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, 4(3), 242–254.
- Karsli-Ceppioglu, S., Dagdemir, A., Judes, G., Ngollo, M., Penault-Llorca, F., Pajon, A., Bignon, Y.-J., & Bernard-Gallon, D. (2014). Epigenetic mechanisms of breast cancer: An update of the current knowledge. *Epigenomics*, 6, 651–664.

- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2013). *Conceptos de genética* (10ª ed.). Pearson Educación S.A.
- Lai, J., & Sarkar, N. I. A. (2021). Phylogenetic approach to analyze the conservativeness of BRCA1 and BRCA2 mutations. *AMIA Annual Symposium Proceedings*, 2021, 677–686.
- Larson, G., & Fuller, D. (2014). The evolution of animal domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 115–136.
- Li, D., Harlan-Williams, L. M., Kumaraswamy, E., & Jensen, R. A. (2019). BRCA1—No matter how you splice it. *Cancer Research*, 79(9), 2091–2098.
- Liu, D., Xiong, H., Ellis, A., Northrup, N., Rodriguez, C., O'Regan, R., Dalton, S., & Zhao, S. (2014). Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Research*, 74(18), 5045–5056.
- Lou, D. I., McBee, R. M., Le, U. Q., et al. (2014). Rapid evolution of BRCA1 and BRCA2 in humans and other primates. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 155.
- Meadows, J. R. S., Kidd, J. M., Wang, G. D., Parker, H. G., Schall, P. Z., Bianchi, M., Christmas, M. J., Bougiouri, K., Buckley, R. M., Hitte, C., Nguyen, A. K., Wang, C., Jagannathan, V., Niskanen, J. E., Frantz, L. A. F., Arumilli, M., Hundi, S., Lindblad-Toh, K., Ginja, C., Agustina, K. K., ... Ostrander, E. A. (2023). Genome sequencing of 2000 canids by the Dog10K consortium advances the understanding of demography, genome function and architecture. *Genome Biology*, 24(1), 187.
- Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., & Lipscomb, T. (1999). Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat. *International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals* (2nd series). *Bulletin of the World Health Organization/American Registry of Pathology*, 7, 18-25.
- Nieto, A., Pérez-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.
- Nguyen, A. K., Schall, P. Z., & Kidd, J. M. (2024). A map of canine sequence variation relative to a Greenland wolf outgroups. *Mammalian Genome*, 35, 565–576
- Ochiat, K., Ishiguro-Oonuma, T., Yoshikawa, Y., Udagawa, C., Kato, Y., Watanabe, M., Bonkobara, M., Morimatsu, M., & Toshinori. (2015). Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomedical Research (Tokyo)*, 36(2), 155–158.
- Ogilvie, G., & Moore, A. (2008). Neoplasia mamaria. En G. Ogilvie & A. Moore (Eds.), *Manejo del paciente canino oncológico* (pp. 675–687). Intermédica.

- Ozmen, O., Kul, S., Risvanli, A., Ozalp, G., Sabuncu, A., & Kul, O. (2017). Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(4), 1479–1486.
- Pasaol, J., Śmieszek, A., & Pawlak, A. (2025). Exploring the therapeutic potential of BRCA1 and BRCA2 as targets in canine oncology: A comprehensive review of their role in cancer development and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 1768.
- Pasculli, B., Barbano, R., & Parrella, P. (2018). Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Seminars in Cancer Biology*, 51, 22–35.
- Peyraud, F., & Italiano, A. (2020). Combined PARP inhibition and immune checkpoint therapy in solid tumors. *Cancers*, 12, 1502.
- Porrello, A., Cardelli, P., & Spugnini, E. P. (2006). Oncology of companion animals as a model for humans: An overview of tumor histotypes. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 25(1), 97–105.
- Pulliam, N., Fang, F., Ozes, A. R., Tang, J., Adewuyi, A., Keer, H., Lyons, J., Baylin, S. B., Matei, D., Nakshatri, H., Rassool, F. V., Miller, K. D., & Nephew, K. P. (2018). An effective epigenetic-PARP inhibitor combination therapy for breast and ovarian cancers independent of BRCA mutations. *Clinical Cancer Research*, 24(13), 3163–3175.
- 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. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(6), 943-949.
- R Development Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Rasotto, R., Berlatto, D., Goldschmidt, M. H., & Zappulli, V. (2017). Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: An observational cohort study of 229 cases. *Veterinary Pathology*, 54(4), 571–578.
- 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. *Cancer Research*, 69(22), 8770–8774.
- Rutteman, C. (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog: An update. *In Vivo*, 4(1), 33–40.
- Soares, J., Pinto, A., Cunha, C., André, S., Barão, I., Sousa, J., & Cravo, M. (1999). Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: Correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer*, 85(1), 112–118.
- Scully, R., & Livingston, D. (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 408(6811), 429–432.

- Severi, G., Southey, M. C., English, D. R., Jung, C. H., Lonie, A., McLean, C., Tsimiklis, H., Hopper, J. L., Giles, G. G., & Baglietto, L. (2014). Epigenome-wide methylation in DNA from peripheral blood as a marker of risk for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 148(3), 665–673.
- Senhorello, I., Matiz, O., Canavari, I., Hernandez, G., Anai, L., Navarrete Ampuero, R., Pazzini, J., Prado, C., Meirelles, F., Vasconcelos, R., & Tinucci-Costa, E. (2023). Expression of acetylated histones H3 and H4 and histone deacetylase enzymes HDAC1, HDAC2 and HDAC6 in simple mammary carcinomas of female dogs. *Frontiers in Genetics*, 14, 1257932.
- Sim, N.-L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W452–W457.
- Shipman, P. (2021). What the dingo says about dog domestication. *Anatomical Record (Hoboken)*, 304(1), 19–30.
- Somaia, M. A. S. M. (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). *Oncology Letters*, 15(6), 8195–8205.
- Sun, W., Yang, X., Zhang, D., Wang, H., Huang, J., & Lin, D. (2015). Relationship between three novel SNPs of BRCA1 and canine mammary tumors. *Molecular Biology Reports*, 42(11), 1541–1543.
- Szabo, C. I., Wagner, L. A., Francisco, L. V., Roach, J. C., Argonza, R., King, M. C., & Ostrander, E. A. (1996). Human, canine and murine BRCA1 genes: Sequence comparison among species. *Human Molecular Genetics*, 5(9), 1289–1298.
- Thumser-Henner, P., Nytko, J., & Rohrer Bley, C. (2020). Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Veterinary Research*, 16, 30.
- Torres Vidales, G., & Eslava Mocha, P. R. (2017). Tumores mamarios en caninos: Adenocarcinoma complejo de glándula mamaria con metástasis a ganglio linfático regional. *Orinoquia*, 11(1), 99–110.
- Varol, U., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Somali, I., Altun, Z., Aktas, S., & Oktay Tarhan, M. (2018). BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 23(4), 862–866.
- Vail, D. M., & MacEwen, E. G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781–792.
- van Veldhoven, K., Polidoro, S., Baglietto, L., Severi, G., Sacerdote, C., Panico, S., Mattiello, A., Palli, D., Masala, G., Krogh, V., et al. (2015). Epigenome-wide association study reveals decreased average methylation levels years before breast cancer diagnosis. *Clinical Epigenetics*, 7, 67.
- Ventikaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171–182.

- Vieira, T., Prado, M., Ruiz Sueiro, F., Cassali, G., & Jark, P. (2025). Small canine mammary tumours have different prognostic factors: A study of 3,470 tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 219, 6–10.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799.
- Von Euler, H. (2014). Tumores de las glándulas mamarias. En J. Dobson & B. Lascelles (Eds.), *Manual de Oncología de pequeños animales* (3.^a ed., pp. 351–365). Lexus.
- Wu, Y., Sarkissyan, M., & Vadgama, J.V. (2015). Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 1238, 425–466.
- Werner, P., Raducha, M. G., Prociuk, U., Henthorn, P. S., & Patterson, D. F. (1997). Physical and linkage mapping of human chromosome 17 loci to dog chromosomes 9 and 5. *Genomics*, 42(1), 74–82.
- Widschwendter, M., & Jones, P. (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 21(35), 5462–5482.
- Withrow, S. J., & MacEwen, E. G. (2022). *Oncología clínica de pequeños animales* (6.^a ed., pp. 455–471). Asis Biomedia SL.
- Xavier, P., Müller, S., & Fukumasu, H. (2020). Epigenetic mechanisms in canine cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 591843.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, B. J., Ye, T. Z. H., Ye, X., & Mao, J. (1999). *PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canadá.
- Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Nagano, M., Yamane, Y., & Tomizawa, N. (2005a). Insertion/deletion polymorphism in the BRCA2 nuclear localization signal. *Biomedical Research*, 26(3), 109–116.
- Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Nagano, M., Yamane, Y., & Tomizawa, N. (2005b). Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(10), 1013–1017.
- Zatloukal, J., Lorenzová, J., Tichy, F., Neâas, A., Kecová, H., & Kohout, P. (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno*, 74, 103–109. República Checa.

Anexos.

Analysis of genetic polymorphisms in the intron 9–10/exon 10 region of the *BRCA1* gene in a population sample of dogs with mammary cancer from Uruguay

Análisis de polimorfismos genéticos en la región intrón 9–10/exón 10 del gen *BRCA1* en una muestra poblacional de perras con cáncer de mama de Uruguay

Alicia Decuadro^{1*} , Micaela Sosa¹ , Federico García¹ , Nariné Balemian² , María del Carmen Montenegro² , Silvia Llambí² 

¹Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Unidad Académica de Clínica de Pequeños Animales. Montevideo, Uruguay.

²Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Unidad Académica de Genética y Mejora Animal. Montevideo, Uruguay.

*Correspondence author: oncologia@vetudelar@gmail.com

ABSTRACT

This study involved clinical and genetic analysis of 15 female dogs with mammary tumors. Fourteen healthy female dogs were used as controls, and blood samples were collected from them for genetic analysis. Polymorphisms located in a splicing region of the largest exon of the *BRCA1* gene were studied, both at the population and evolutionary level, in a population of female dogs with different histopathological types of mammary tumors. In the intron 9–10/exon 10 initiation region, two SNP-type polymorphisms are described: SNP1 and SNP2. The SNP1 produces a non-synonymous change with unknown effect on the coding protein. Selected animals underwent surgery, and samples were sent for histopathological analysis. Peripheral blood was also collected for DNA extraction. A region corresponding to intron 9–10/exon 10 of the *BRCA1* gene (ENSCAFE00845051080) was amplified by endpoint PCR, with PCR results subsequently confirmed through agarose gel electrophoresis at 1%. PCR products were sequenced to study the polymorphisms identified within this region. No statistically significant differences were observed between the genotype frequencies in both populations (χ^2 0.33, $P > 0.5$), indicating that SNP1 is not linked to mammary tumors in the studied animals. Regarding SNP2, the mutation was not identified in the studied groups (females with mammary tumors and controls), being monomorphic. Although this SNP2 is described in the Ensembl database, there are no genotyping data in reference populations. The phylogenetic analysis of the amplified intron 9–10/exon 10 revealed an evolutionary homology with *Canis lupus familiaris*, and a more distant relationship with other genera such as *Vulpes* and *Nyctereutes* within the Canidae family. It can be concluded that mutations in this splicing region of the largest exon of *BRCA1* are not associated with the development of mammary tumors in canines within this group of animals.

Key words: Canine mammary tumors; canine *BRCA1* gene; SNP

RESUMEN

Se realizó el estudio clínico y genético en 15 perras con tumores de mama. El grupo control incluyó 14 perras sanas a las cuales se les extrajo sangre para el estudio genético. Se estudió a nivel poblacional y evolutivo, polimorfismos localizados en una región de corte y empalme del exón más grande del gen *BRCA1* en una población de perras con distintos tipos histopatológicos de tumores mamarios. En la región de inicio de intrón 9–10/exón 10 hay descritos dos polimorfismos de tipo SNP: SNP1 y SNP2. El SNP1 produce un cambio no sinónimo y se desconoce el efecto del mismo a nivel de la proteína codificante. Los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, con posterior estudio histopatológico, y obtención de muestras de sangre para la extracción de ADN. Se amplificó por PCR a tiempo final una región correspondiente al intrón 9–10/exón 10 del gen *BRCA1* (ENSCAFE00845051080), confirmándose los resultados por PCR a través de electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Los productos de PCR se secuenciaron para estudiar los polimorfismos identificados en dicha región. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas en ambas poblaciones (χ^2 0.33, $P > 0,5$), por lo tanto, este SNP1 no estaría vinculado con los tumores mamarios en los animales estudiados. En referencia al SNP2, en ambos grupos estudiados, no fue identificada la mutación siendo monomórfico. Si bien este SNP2 se encuentra descrito en la base Ensembl, no existen datos de genotipado en poblaciones de referencia. La secuencia amplificada intrón 9–10/exón 10 a nivel filogenético mostró homología con la especie *Canis lupus familiaris* y relación más lejana con otros géneros como *Vulpes* y *Nyctereutes* de la familia *Canidae*. Concluimos que las mutaciones en esta región de splicing del mayor exón de *BRCA1* no estarían relacionadas con la aparición de tumores mamarios en caninos en este grupo de animales.

Palabras clave: Tumores mamarios caninos; *BRCA1* canino; SNP

INTRODUCTION

Cancer stands as the leading cause of death in dogs, being responsible for 27–30% of deaths, and reaching 50% in certain breeds, such as the Golden Retriever and the Bernese Mountain Dog [1, 2].

In recognition of the importance of cancer research in companion animals, the National Cancer Institute established the Comparative Oncology Program in 2003. This initiative has facilitated numerous studies that have benefited human medicine [3].

Dogs develop spontaneous mammary tumors with clinical and molecular similarities to human breast cancer. In addition to the spontaneous presentation of the tumor, there are several clinical parallels between human breast cancer (HBC) and canine mammary tumors (CMT). These include age of onset (from 6 years in dogs and 40 years in women), hormonal etiology, disease progression, tumor size, stage, and invasion of regional lymph nodes. In situ ductal carcinomas in both human and canine mammary glands exhibit analogous pathological and molecular characteristics. The traits of CMT and their resemblances to HBC indicate that dogs could serve as models for studying the disease in humans [4].

Genetic components and hereditary risk factors for breast cancer are shared between humans and dogs. One notable example is the *BRCA1* tumor suppressor gene. Mutations in this gene have been linked to an increased likelihood of developing breast and ovarian cancer in women due to the accumulation of DNA damage [5]. *BRCA1* has also been identified as a contributing factor in the development of mammary tumors in certain breeds, including the English Springer Spaniel [4, 5]. Mutations in the *BRCA1* tumor suppressor gene have been linked to a higher risk of mammary cancer in both humans and canines [6, 7]. In canines, this gene is located on chromosome CFA9, encompassing 23 exons and four transcripts (splice variants). In our country, Decuadro *et al.* (2022) [8], studied the smaller exons (exons 22 and 23) of the *BRCA1* gene through DNA sequencing, and found no significant differences in the molecular markers identified in a group of dogs with mammary tumors compared to the control group. Furthermore, exon 10 (3444 bp in transcript 202) is the largest exon of this gene in canines and corresponds, by sequence homology, to exon 11, the largest exon of the homologous gene in humans [9].

In the Ensembl Dog database (ROS_Cfam_1.0), two SNP-type polymorphisms are described in the intron 9–10/exon10 initiation region: SNP1 (missense) (R, G/A) c.715G>A, at protein position Gly239Ser 239 (aa change G/S) and SNP2 (synonymous variant) (W, A/T) c.738T>A, at protein position Thr246= 246 (aa T/T) [10]. The interest has focused on SNP1 as it produces a nonsynonymous change, and its effect on the coding protein remains unknown.

In humans, extensive evidence shows that various types of mutations (SNPs, InDels, and rearrangements in intron and exon splicing) ultimately affect the functionality of the encoded protein, thereby preventing DNA repair [4]. Over time, the progressive accumulation of DNA damage increases the likelihood of developing mammary tumors [5]. Since the cloning of *BRCA1* in 1994, it has been observed that it undergoes high alternative splicing, with more than 100 transcripts detected in humans via next-generation sequencing (NGS) [11].

The *BRCA1* gene encodes a protein that is homologous to the breast cancer type 1 susceptibility protein (Brc-1). This protein plays a crucial role in DNA repair and cell cycle regulation in the mammary gland [12].

Phylogenetically, *BRCA1* is an ancient gene, the precise origin of which remains uncertain. However, evidence suggests a common ancestor may have emerged approximately 1.6 billion years ago, at the time of the divergence of animals and plants. [13].

This study aimed to investigate population-level and evolutionary polymorphisms located in a splicing region of the largest exon of the *BRCA1* gene, with a specific focus on SNP1 and its impact on the amino acid change in the encoded protein in a population of female dogs with diverse histological types of mammary tumors.

The aim of this work was to compare the analysis of *BRCA1* gene sequence in a group of canines with and without mammary tumors. Since there are few studies in female dogs that study breast cancer at a molecular level. The study proposed in this work will collaborate in obtaining this knowledge in order to have more elements when facing these clinical cases.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted at the Veterinary Hospital and the Laboratory of the Genetics and Animal Improvement Unit of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of the Republic (Montevideo, Uruguay). The study was approved by the Ethics and Animal Use Committee (CEUA) under the number 1383.

CMT cases were selected based on the presence of nodules or tumors in the mammary region with clinical characteristics consistent with those observed in mammary tumors. Fifteen female dogs, aged 6 to 12 years, were selected, as this is a prime age for this pathology. Pre-surgical studies, including blood chemistry, chest X-rays, and urine analysis.

The Clinical Analysis Laboratory has the necessary instruments for blood tests (CB 31 Oi Biotechnica Instruments S.p.A.). Thoracic radiographs were obtained in a Vetter Rems 100 device (Argentina) and digitalized in a Kodak DirectView, Sistem Classic CR Carestream (Japan) and a TOSHIBA Nemio MX.(Japan) fixed hospital ultrasound scanner.

As well as disease staging according to WHO standards enabled the implementation of appropriate surgical techniques, with anesthetic risk classified as ASA I or II. Sedation was performed with acepromazine 0.05 mg·kg⁻¹ and morphine 0.5 mg·kg⁻¹ intramuscularly, anesthesia was induced with propofol 5 mg·kg⁻¹ intravenously for placement of the tracheotube and inhalational anesthesia was maintained with isoflurane.

Post-surgery tissue samples were sent for histopathological study with an Olympus BX51 microscope using hematoxylin and eosin staining at 40× and 10× magnification

Tumors were grouped according to the histopathological classification of Goldschmidt *et al.* (2011) [14] (TABLE I).

The control group consisted of fourteen female dogs, within the same age range and with no oncological pathologies. These dogs, admitted to the Veterinary Faculty Hospital for other reasons. To dismiss any oncological pathology all dogs underwent clinical examination and collateral studies. Blood samples were collected to perform laboratory analysis (as with dogs with breast tumors), abdominal ultrasound and thorax radiography. An aliquot of the blood sample preserved with EDTA was reserved for genetic analysis.

DNA Molecular Studies

Peripheral blood samples were collected from selected animals under aseptic conditions in accordance with animal welfare protocols. Blood samples were obtained (3 mL) from the cephalic vein with a 21 G butterfly by the veterinary nurse. DNA extraction was conducted using the Quick_DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research). DNA samples were quantified using a NanoDrop ND 1000 spectrophotometer, (Thermo Fisher Scientific, USA) with full spectrum (220–750 nm).

A 281 bp fragment corresponding to the intron 9–10/exon 10 region of the *BRCA1* gene (ENSCAFE00845051080) was amplified by endpoint PCR using a Multigene II machine (Labnet International, Inc., USA). The following primers were utilized: F 5'→3' AGGTGCTTATTTCCTACTCCCC and R 5'→3' TCATGCTGTAATGAGCTGGCA. Amplification conditions comprised an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1) denaturation at 95°C for 30 s, 2) annealing at 56°C for 30 s, and 3) extension at 72°C for 30 s, with a final extension at 72°C for 5 min.

In each experiment, as analytical quality control a non-template PCR control tube was added using sterile deionized water (negative PCR)

PCR results were confirmed by electrophoresis on 1% agarose gels in 1× TBE buffer. Electrophoresis was conducted using an HU13 MIDI horizontal gel electrophoresis system (Scie-plas, Great Britain) and a POWER PAC 3000 power supply (Bio-Rad, USA). The resulting bands were visualized under UV light using a BIOSENS SC805–BIOTOP instrument (Shanghai Bio-Tech Co., Ltd., China).

PCR products (F and R chains) were submitted to Sanger sequencing on an ABI 3500 instrument (ThermoFisher, USA) at GENEXA, Uruguay, to study the polymorphisms identified in this region. Before the sequencing process, the PCR products are purified using the Quiagen column kit, in order to obtain good quality in the sequencing process (elimination of dNTSs, by-products).

Statistical and *in silico* analysis

The free Bioedit software [15] was used to align 29 sequences in order to identify SNP polymorphisms in the amplified fragment and to compare them with the reference canine genome sequence (Ensembl Dog, ROS_Cfam_1.0)

Genetic variability calculations, Chi-square test for allelic frequencies of polymorphisms and Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) were performed using the free POPGENE software version 1.32 [16].

To investigate the impact of SNP1's amino acid change effect on the *brc1* protein, two online bioinformatics tools were employed: a) SIFT Sorting Intolerant From Tolerant, [<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>] [17], and b) PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) [18]. A sequence alignment and genetic distance Neighbor–Joining tree of the amplified sequence with available genomic data from Canidae species was constructed using the online BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool) [19, 20]. Furthermore, reference population data for 216 canine genotypes reported for SNP1 (204 homozygotes G/G, 10 heterozygotes G/A, and 2 homozygotes A/A) were downloaded from Ensembl Dog, ROS_Cfam_1.0, for the purpose of performing a comparative allele frequency and HWE analysis with the two aforementioned populations.

RESULTS AND DISCUSSION

The presence of the biallelic polymorphism SNP1 was identified in both populations of female canines (CMT group and C group) through the use of PCR–sequencing and subsequent sequence alignment. In the CMT group, two females exhibited the heterozygous genotype GA, while the remaining 13 were

TABLE I
Description of patients, clinical staging (according to the WHO), histopathological diagnostic and classification

Case	Age (years)	Breed	Stage	Histopathological Grade	Histopathology
1	6	Poodle	I	II	Mixed Carcinoma
2	8	Rottweiler	III	III	Simple Tubular Carcinoma
3	12	American Staffordshire Terrier	III	III	Tubulopapillary Carcinoma
4	6	Cocker	III	II	Simple Tubular Carcinoma
5	10	Mixed Breed	II	Benign	Complex Adenoma
6	12	Mixed Breed	V	III	Poorly Differentiated Complex Carcinoma
7	10	Cimarrón	III	III	Anaplastic Carcinoma
8	8	Cocker	I	III	Solid Carcinoma
10	12	Cimarrón	III	II	Tubulopapillary Carcinoma
11	6	Poodle	I	Benign	Complex Adenoma with Intraductal Lobular Hyperplasia
12	12	Poodle	I	Benign	Benign Mixed Tumor
13	12	Cimarrón	III	II	Tubulopapillary Carcinoma
14	12	Boxer	II	II	Complex Carcinoma
15	11	Pitbull	I	Benign	Complex Adenoma

GG homozygous. In the C group, three females exhibited the heterozygous genotype GA, while the remaining 11 were GG homozygous. The homozygous AA genotype for the mutant allele was not observed in either group (FIG. 1). No statistically significant differences were observed between the genotype frequencies in both populations (Chi-square 0.33, $P>0.5$), indicating that SNP1 is not linked to mammary tumors in the studied animals. Both populations were in HWE, whereas the reference population was not (TABLE II). This deviation from HWE in the reference population may be attributed to the lack of knowledge regarding the genotyping method employed, as Iniesta *et al.*, 2005 [21] have indicated that such a method can introduce biases in interpreting genotype results. Additionally, the authors have proposed the biological possibility of inbreeding in the population or selection for a specific allele. With regard to SNP2 (synonymous variant, W, A/T) c.738T>A), the mutation was not identified in the studied groups (CMT and control), exhibiting monomorphic characteristics. Although this SNP2 is described in the Ensembl database,, there are no genotyping data in reference populations. Di Giacomo *et al.* (2022) [22], using an AmpliSeq panel for *BRCA1* variant identification in a population sample of 22 dogs, identified 12 SNPs (10 with nonsynonymous changes). These authors identified two SNPs in exon 10 that differed from the one identified in this work.

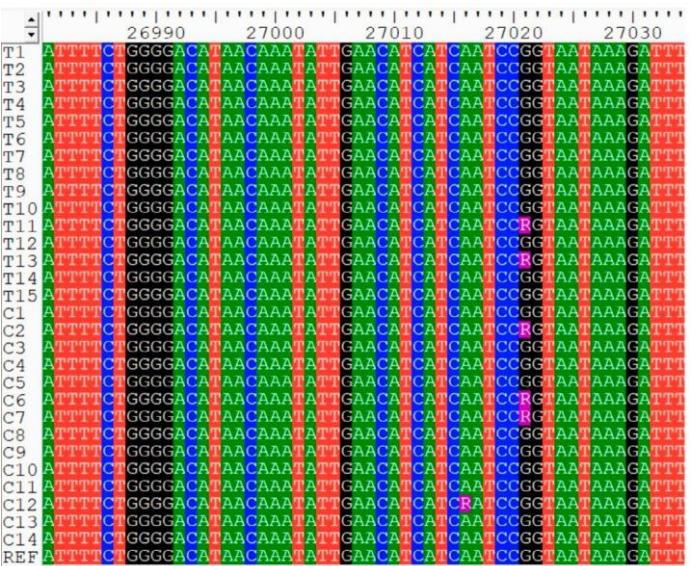


FIGURE 1. Partial multiple alignment of the amplified intron 9-10/exon 10 sequence of the *BRCA1* gene from 15 female canines with tumors (T1-T15) and control females (C1-C14). The REF sample corresponds to the reference sequence ENSCAFG00845006070 from Ensembl (*Canis Lupus familiaris*). At position 27021, the SNP1 polymorphism (letter R, in violet) is observed

With regard to the impact of the amino acid substitution resulting from SNP1 on the brc1 protein (Gly/Ser at position 239), the SIFT analysis returned a score of 0.08 (indicating a tolerated amino acid substitution), whereas substitutions with scores < 0.05 are regarded as “detrimental,” signifying a potential alteration in protein function. Similarly, PolyPhen-2 analysis classified the substitution as benign with a score of 0.007 (sensitivity 0.96, specificity 0.75). In this program, values closer to 1 are predicted with higher confidence to be detrimental (in contrast to the SIFT scale).

TABLE II Allelic Frequencies: Observed allelic frequencies of SNP1 and Chi-square (X ²) results for HWE			
Exon 10-SNP1 c.715G>A Allelic Frequencies and X ² for HWE	With tumors (CMT)	No tumors (C)	Reference Population
Allele G	0,933	0,893	0,968
Allele A	0,067	0,107	0,031
X ² and P (HWE)	0.0765 $P\geq 0.70$	0,202 $P\geq 0.50$	16.03 $P<0.001$

Phylogenetically, the amplified sequence demonstrated greater homology with *Canis lupus dingo* and *Canis lupus familiaris* indicating an evolutionary divergence from the genus *Vulpes* and *Nyctereutes* as expected (FIG. 2). Recent taxonomic revisions propose that the dingo should be classified as *Canis familiaris*, which is the appropriate taxonomic designation for ancient, modern dog breeds and their hybrids [23].

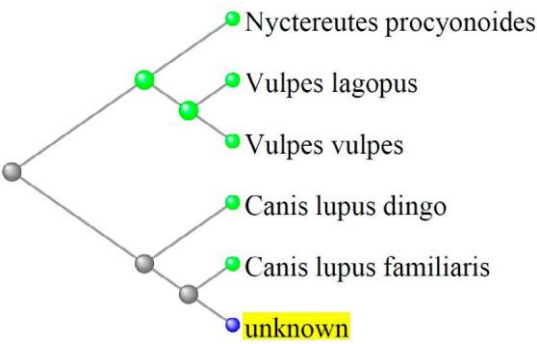


FIGURE 2 Neighbor-joining genetic distance tree, generated using the amplified sequence with the tBlastn multiple alignment program within the *Canidae* family. The consensus sequence amplified in this study is represented by the blue circle

In primates, there is evidence that *BRCA1* evolves through positive selection, whereby mutations confer resistance advantages to viral infections. This could explain its evolution and the transmission of cancer-related mutations [24].

This study confirmed that the splice initiation region of the largest exon of *BRCA1* in canines, despite presenting SNP-type polymorphisms, does not affect the functionality of the coding protein and is not associated with tumors in female canines.

CONCLUSIONS

It has been demonstrated that distinct mutations in the *BRCA1* gene are associated with mammary tumors in female canines. In this study, no statistically significant relationship was found between the SNP1 marker and mammary tumors in the problem and control groups. Furthermore, the amino acid substitution resulting from this mutation is regarded as being benign to the brc-1 protein. From a phylogenetic perspective, the amplified intron 9-10/exon 10 sequence demonstrated homology with *Canis lupus familiaris* and a more distant relationship with other

genera, such as *Vulpes* and *Nyctereutes*, within the *Canidae* family. Consequently, it can be concluded that mutations in this splicing region of the largest exon of *BRCA1* are not associated with the occurrence of mammary tumors in this group of animals.

This is the beginning of a line research at DNA in female dogs with mammary tumors, and the next step to deepen this work can be achieved by increasing samples number.

During the course of this work, two sample banks were created, one of blood and the other of DNA from female dogs with mammary tumors. These samples will be use in future studies. We also intend to study other gene sequences and their variants in a larger number of animals. Likewise, we hope to include the study of epigenetics in female dogs with mammary tumors compared to healthy animals in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was conducted in the Small Animal Clinic and Surgery Unit and the Academic Unit of Genetics and Animal Improvement at the Faculty of Veterinary Medicine, University of the Republic, with funding from the Sectoral Commission for Scientific Research (CSIC), the Research and Scientific Development Commission of the Faculty of Veterinary Medicine (CIDE), and the Graduate Academic Programs of the Faculty of Veterinary Medicine, Uruguay.

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] Adams V, Evans K, Sampson J, Wood J. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. JSAP. [Internet]. 2010; 51(10):512–524. doi: <https://doi.org/b53qs2>
- [2] Fleming J, Creevy K, Promislow D. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: An investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. J. Vet. Intern. Med. [Internet]. 2011; 25(2):187–198. doi: <https://doi.org/dxs8c2>
- [3] Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. Nat. Rev. Cancer. [Internet]. 2008; 8(2):147–156. doi: <https://doi.org/fvrsy4>
- [4] Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). Oncol. Lett. [Internet]. 2018; 15(6):8195–8205. doi: <https://doi.org/mdsq>
- [5] Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh, von Euler H. Mammary tumor development in dogs is associated with *BRCA1* and *BRCA2*. Cancer Res. [Internet]. 2009; 69(22):8770–8774. doi: <https://doi.org/bz3p2n>
- [6] Rivera P, von Euler H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. Vet. Pathol. [Internet]. 2011; 48(1):132–146. doi: <https://doi.org/dp5qh5>
- [7] Scully R, Livingston DM. In search of the tumor-suppressor functions of *BRCA1* and *BRCA2*. Nature [Internet]. 2000; 408:429–432. doi: <https://doi.org/cwz6kh>
- [8] Decuadro A, Llambi S, Benech A, Gagliardi R. Analysis of polymorphisms in *BRCA1* and *BRCA2* genes in a population samples of canines from Uruguay. Rev. Cient. FCV-LUZ. [Internet]. 2022; 32:e32163. doi: <https://doi.org/nzt2>
- [9] Priyam A, Woodcroft BJ, Rai V, Moghul I, Munagala A, Ter F, Chowdhary H., Pieniak I, Maynard LJ, Gibbins MA, Moon HK, Davis-Richardson A, Uludag M, Watson-Haigh NS, Challis R, Nakamura H, Favreau E, Gómez EA, Pluskal T, Leonard G, Rumpf W, Wurm, Y. Sequenceserver: A modern graphical user interface for custom BLAST databases. Mol. Biol. Evol. [Internet]. 2019; 36(12):2922–2924. doi: <https://doi.org/dgds>
- [10] Martin FJ, Gall A, Szpak M, Flicek P. Accessing livestock resources in Ensembl. Front. Genet. [Internet]. 2021; 12:650228. doi: <https://doi.org/g8xrxx>
- [11] Li D, Harlan-Williams LM, Kumaraswamy E, Jensen RA. *BRCA1*—No matter how you splice it. Cancer Res. [Internet]. 2019; 79(9):2091–2098. doi: <https://doi.org/g8xrxx>
- [12] Ribeiro-Silva A, Garcia SB, Chahud F, Zucoloto S. Impacto prognóstico da expressão imuno-histoquímica do *BRCA1* nos carcinomas mamários esporádicos. [Prognostic impact of *BRCA1* immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas]. J. Bras. Patol. Med. Lab. [Internet]. 2005; 41(3):197–203. Portuguese. doi: <https://doi.org/bz838s>
- [13] Pfeffer CM, Ho BN, Singh ATK. The evolution, functions and applications of the breast cancer genes *BRCA1* and *BRCA2*. CGP. [Internet]. 2017; 14(5):293–298. doi: <https://doi.org/gpdkxj>
- [14] Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zapulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. Vet. Pathol. [Internet]. 2011; 48(1):117–131. doi: <https://doi.org/cq36bk>
- [15] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic. Acids Symp. Ser. 1999 [cited 21 Aug. 2024]; 41(41):95–98. Available in: <https://goo.su/5Siuf>
- [16] Yeh F, Yang RC, Boyle TJ, Ye ZH, Mao JX. PopGene, the user-friendly shareware for population genetic analysis [Internet]. Alberta (Canada): University of Alberta, Molecular Biology and Biotechnology Center. 1999 [cited 21 Aug. 2024]. Available in: <https://goo.su/YmV1m>
- [17] Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Res. [Internet]. 2012; 40(W1):W452–W457. doi: <https://doi.org/gfwv5k>
- [18] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat. Methods. [Internet]. 2010; 7(4):248–249. doi: <https://doi.org/cc4rrw>
- [19] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. [Internet]. 1990; 215:403–410. doi: <https://doi.org/cnsjsz>
- [20] Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I. BLAST: a more efficient report with usability improvements. Nucleic Acids Res. [Internet]. 2013; 41(W1):W29–W33. doi: <https://doi.org/gpmk7d>

- [21] Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.* 2005 [cited 24 August 2024]; 19(4):333–341. Available in: <https://goo.su/xNsDbXs>
- [22] Di Giacomo, D.; Di Domenico, M.; Defourny, SVP.; Malatesta D, Di Teodoro G, Martino M, Viola A, D’Alterio N, Cammà C, Modesto P, Petrini A. Validation of AmpliSeq NGS panel for *BRCA1* and *BRCA2* variant detection in canine formalin–fixed paraffin–embedded mammary tumors. *Life* [Internet]. 2022, 12(6):851. doi: <https://doi.org/g8xrx2>
- [23] Jackson S, Fleming P, Eldridge M, Archer M, Ingleby S, Johnson R, Helgen K. Taxonomy of the Dingo: It’s an ancient dog. *Aust. Zool.* [Internet]. 2021; 41(3):347–357. doi: <https://doi.org/g8xrx3>
- [24] Lou DI, McBee RM, Le UQ, Stone AC, Wilkerson GK, Demogines AM, Sawyer SL. Rapid evolution of *BRCA1* and *BRCA2* in humans and other primates. *BMC Evol. Biol.* [Internet]. 2014; 14:155. doi: <https://doi.org/f59tsh>

BRCA1 and BRCA2 Gene Analysis in Dogs with Familial Mammary Tumors

There are few studies that study at the molecular level families of dogs with a history of mammary tumors. Therefore, we thought it appropriate to study different families of 4 breeds of dogs with a history of mammary tumors where we worked on regions of the BRCA1 and BRCA2 genes in which different mutations have been described, according to the Ensembl website.

The breeds studied were Poodle, Boxer, Uruguayan Cimarron and Great Dane.

The study protocol was approved by the Ethics and Animal Use Committee (CEUA) under protocol number 2157.

Alicia Decuadro <https://orcid.org/0000-0002-0118-6535>; oncologiafvetudelar@gmail.com

BRCA1 and BRCA2 Gene Analysis in Dogs with Familial Mammary Tumors

Abstract

Objective: This study aimed to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the intron 9–10/exon 10 region of the BRCA1 gene and in exon 10 of the BRCA2 gene in canines of the following breeds: Great Dane, Boxer, Uruguayan Cimarrón, and Poodle that have a familial history of mammary tumors.

Materials and Methods: DNA was extracted from 15 animals. Polymerase chain reaction (PCR), followed by automated sequencing, and subsequent analysis with various bioinformatics tools, was employed to analyze the SNPs and to perform comparative analyses with those of other canine breeds and members of the *Canidae* family. Allelic and genotypic frequencies were calculated and compared with those of reference populations.

Results: No novel allelic variants were identified in the study sample compared with the reference breeds. For BRCA1, SNP1 c.715G>A was detected with an allelic frequency of 0.966 for the G allele and 0.033 for the A allele. In the case of BRCA2, SNP2 c.1341G>A was monomorphic (GG), and no significant differences were observed relative to the reference population. Phylogenetic analysis revealed, as expected, that the amplified BRCA2 sequence exhibited higher homology with *Canis lupus dingo* and *Canis lupus familiaris*.

Conclusion: In this cohort of dogs with a familial history of mammary tumors, no novel SNPs were

identified in the regions analyzed. Statistically, the allele frequencies for the previously described SNPs did not differ significantly from those of the reference population. These results contribute to our understanding of genetic variability in genes implicated in canine mammary tumorigenesis.

Keywords: Canine mammary tumors; BRCA1 gene; BRCA2 gene.

Introduction

Mammary tumors represent the most prevalent neoplastic condition in female dogs, posing a significant challenge in veterinary oncology. Their annual incidence rates vary considerably with geographical location and contributory factors, such as early spaying practices and socioeconomic conditions [1]. In countries with low rates of ovariectomy, mammary neoplasms are exceedingly common, accounting for approximately 50 to 70% of tumors detected in intact females. Notably, the overall rate of neoplasm development in dogs is nearly double that seen in humans [2].

At the time of diagnosis, 60% of affected female dogs present with multifocal tumors—either confined to a single mammary gland, dispersed across different glands, or manifesting sequentially along the contralateral chain. Specifically, 37% of these cases displaying heterogeneous histopathological characteristics [3].

Furthermore, the overwhelming predilection for mammary tumors in female dogs (97–100% incidence compared to 0–3% in males) is particularly marked in older, intact females, with a higher frequency documented in the inguinal mammary glands [4].

Genetically, investigations in both human and canine mammary cancers have underscored the crucial role of tumor suppressor genes, most notably BRCA1 and BRCA2. These genes modulate cancer risk via variations such as DNA single nucleotide polymorphisms (SNPs) [5,6]. Comparative studies have revealed significant genetic similarities between canine and human mammary tumors [7]. Hereditary breast cancer in humans, accounting for 5–10% of all cases, is primarily associated with pathogenic variants in BRCA1 and BRCA2. Carriers of these variants have a lifetime risk up to 85% to develop breast cancer [8,9]. However, despite the established importance of BRCA1 and BRCA2 as biomarkers and therapeutic targets in human oncology, their role in canine mammary cancer remains underexplored [10]. Most genetic variations identified in these genes in canine are SNPs—occurring within both coding and non-coding regions—and may influence tumor development [11]. For example, Decuadro et al. [12] examined exons 22 and 23 of BRCA1 and exons 11 and 27 of BRCA2 in two cohorts of female dogs (one with mammary tumors and one comprising healthy controls) and found no significant association between the

1 identified SNPs and disease status. Moreover, the Ensembl Dog (ROS_Cfam_1.0) database
2 documents a missense SNP, c.715G>A (resulting in a non-synonymous change, R, G/A), within
3 the intron 9–10/exon 10 initiation region of the BRCA1 gene [13].

4 Recent studies in dogs employing next-generation sequencing (NGS) AmpliSeq techniques for
5 BRCA1 and BRCA2 have yielded comprehensive variant databases that promise to deepen our
6 understanding of mammary cancer in the future [5].

7 Additionally, several studies have demonstrated a certain breed predisposition for tumors in
8 specific canine breeds such as Poodle, Yorkshire Terrier, Dachshund, Labrador, Cocker Spaniel,
9 and Boxer, suggesting a substantial genetic component [14, 1].

10 Genetic factors are further emphasized by evidence that certain familial lineages within these
11 breeds exhibit markedly higher tumor risks [15].

12 Evolutionary studies in primates have revealed that both BRCA1 and BRCA2 are subject to
13 positive selection, yet the mechanisms driving this diversifying selection in these crucial DNA
14 repair genes remain incompletely understood [16]. In canines, sequence analysis of the intron 9–
15 10/exon 10 region of BRCA1 has demonstrated homology with *Canis lupus familiaris* and
16 comparatively more distant relationships with other *Canidae* genera [13].

17 In light of this background, the objective of this study is to examine, from an evolutionary
18 perspective and via allelic frequency analysis, the SNPs present in the intron 9–10/exon 10 region
19 of BRCA1 and in a segment within exon 10 of BRCA2. This investigation will be conducted in a
20 population of dogs encompassing four breeds with direct familial ties characterized by a history of
21 mammary tumors.

23 **Materials and methods.**

24 This work was conducted at the Genetics and Animal Improvement Unit Laboratory and the
25 Veterinary Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of the Republic
26 (Uruguay).

27 *Animal Description*

28 A total of 15 dogs from four breeds with an age range of 2 to 15 years (study population, P) were
29 included: 6 Great Danes (4 females and 2 males), all offspring of a female with a histopathologically
30 confirmed diagnosis of simple tubular carcinoma; 3 Boxers (sibling females), daughters of a female
31 with histopathologically confirmed cystic papillary carcinoma; 4 Uruguayan Cimarrón (3 females
32 and 1 male) from the local breed (Standard Fédération Cynologique Internationale CI No. 353),
33 with a maternal history of histopathologically confirmed simple carcinoma; 2 Poodles (females)
34 with a maternal history of histopathologically confirmed complex carcinoma, as per the

classification described by Goldschmidt et al. [17].

Note that for the Great Dane and Boxer groups, the dams were diagnosed with mammary cancer but were unavailable to participate in the study; in contrast, the dams of the Uruguayan Cimarrón and Poodle breeds were diagnosed with mammary cancer and were included in the sampling. Table 1.

Molecular DNA Studies.

Peripheral blood samples (2–5 mL) were collected from the selected animals under strict aseptic conditions, in accordance with an animal welfare protocol administered by private veterinarians who provided the samples for this study. Blood was drawn into EDTA-containing tubes and stored at –18 degrees Celsius (°C). Genomic DNA was isolated using the Quick DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research). DNA concentrations were subsequently quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) by measuring absorbance at 260 nm.

Subsequently, PCR amplification was performed to target regions within the BRCA1 and BRCA2 genes where distinct mutations have been previously documented, as referenced in the Ensembl database (<http://www.ensembl.org/index.html>). The primer sets used were as follows:

BRCA1 Primers (for amplification of a segment within intron 9–10/exon 10 region; amplicon size: 281 bp) [13]:

BRCA1 F: AGGTGCTTTATTTCCACTCCCC

BRCA1 R: TCATGCTGTAATGAGCTGGCA

BRCA2 Primers (for amplification of a segment within exon 10; amplicon size: 301 bp), which were designed using the Primer-Blast tool [18]:

BRCA2 F: AGCCCTTTGGGAATGGAACT

BRCA2 R: TCAAGACACTGCCCTTCGTT

PCR amplification was performed to completion on a Multigene II thermal cycler (Labnet International, Inc., USA). Amplification conditions comprised an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 1) denaturation at 95°C for 30 seconds, 2) annealing at 56°C for 30 seconds, and 3) extension at 72°C for 30 seconds. A final extension was carried out at 72°C for 5 minutes, in accordance with the protocol described by Decuadro et al. [12]. The PCR

products for all 15 samples were subsequently subjected to automated Sanger sequencing (both forward and reverse strands) using an ABI 3500 sequencer (Thermo Fisher Scientific, USA) by GENEXA (Uruguay) for SNP identification, using Mega V11 software [19] for raw read analysis.

In Silico and Statistical Analysis

Sequence alignments for the 15 amplified regions of BRCA1 and BRCA2 were performed using the open-source software BioEdit [20]. The obtained sequences were then compared against reference sequences from the canine genome and from breeds available in the Ensembl Dog database (ROS_Cfam_1.0), including Boxer, Great Dane, Basenji, and German Shepherd. Genetic variability calculations and Chi-square tests for allelic frequency comparisons between the study population (P) and the reference population (PR) were conducted using the freeware POPGENE version 1.32. Statistical significance was defined as $p < 0.05$ [21]. Reference population genotype data were downloaded from the Ensembl Dog ROS_Cfam_1.0 database. For SNP1 (c.715G>A in BRCA1), the reported reference population comprised 216 animals with the following genotypes: 204 homozygotes for guanine (G/G), 10 heterozygotes guanine- adenine (G/A), and 2 homozygotes for adenine (A/A). For SNP2 (c. 1341 G>A in BRCA2), the reference population consisted of 218 animals with the following genotypes: 209 G/G homozygotes, 8 G/A heterozygotes, and 1 A/A homozygotes. Finally, the consensus sequence derived from the 15 samples was utilized the online BLAST algorithm (Basic Local Alignment Search Tool) to construct a Neighbor-Joining genetic distance tree of the amplified exon 10 sequence of BRCA2, incorporating available genomic information from various species within the Canidae family [22].

Results and Discussion

The selection of breeds for this study was based on previous investigations reporting a higher incidence of canine mammary tumors (CMT) in small breeds, while also including large breeds [1, 14]. In our country, the high prevalence of Poodles and Uruguayan Cimarrón dogs justifies their inclusion. Additionally, the Boxer, a breed well documented for its high prevalence of oncologic pathologies and the Great Dane, representing a large breed that has been scarcely studied at a molecular level, were also selected [15]. Although familial canine neoplasia remains poorly characterized, several studies have noted a higher incidence in crossbred animals compared to purebreds [23].

Sequence alignments performed with BioEdit on the amplified regions of the BRCA1 and BRCA2 genes, and compared with reference sequences available from Ensembl (including Boxer, Great

Dane, Basenji, and German Shepherd), did not reveal any novel variants. Specifically, for SNP2 c.1341G>A in exon 10 of BRCA2, it was observed that the Boxer and Basenji breeds consistently display an Adenine (A) at the targeted nucleotide, whereas the Great Dane and German Shepherd exhibit a Guanine (G). Although extensive genomic datasets are now available primarily generated by the Dog10K project, many canine genetic variation studies have traditionally relied on a single reference genome from the Boxer breed (i.e., “Tasha”) [24]. In this context, Nguyen et al. [25] have emphasize that depending on a single reference genome may impact genetic variability studies based on sequencing. They further caution that inherent inbreeding in modern dog breeds could bias genetic variability assessments, both within and between canines, when a single reference genome from a particular breed is used.

Within the analyzed sequence of the intron 9–10/exon 10 region of BRCA1, one Boxer was found to carry SNP1 c.715G>A with a heterozygous genotype (G/A), whereas the remaining 14 animals were homozygous G/G. A Chi-square comparing allelic frequencies between the study population (P) and the reference population revealed no statistically significant differences ($\chi^2 = 0.0008$, $p = 0.999$; see Table 2).

Decuadro et al. [13] similarly reported no significant association between this variant and mammary cancer when comparing two populations of female dogs (one with mammary tumors and one consisting of healthy females). Furthermore, these authors demonstrated that although SNP1c.715G>A results in an amino acid substitution (Gly/Ser at position 239 of protein), this change is “tolerated” and does not appear to impact protein function [13]. The rationale for investigating the effects of mutations (SNP) in these regions stems from their potential to produce a balanced array of alternative transcripts of BRCA1, which is critical to maintaining normal gene function. Dysregulation of these transcripts could, in turn, contribute to the pathogenesis of mammary cancer in humans [26].

For the sequence analysis of exon 10 of BRCA2 recognized as the second largest coding exon in terms of base pair length no genetic variability was observed for SNP2 c.1341G>A, with all animals being homozygous (G/G) (monomorphic) in the study population (P). Likewise, the Chi-square test exhibited no significant differences in allelic frequencies between the study (P) and reference populations ($\chi^2 = 0.703$, $p = 0.872 > 0.05$; see Table 1). This SNP2c. 1341 G>A in BRCA2 produces a synonymous variant (Lys, K/K amino acid) that does not alter the structural integrity of the protein. Nonetheless, other genetic variations in canine BRCA2 whether involving coding or noncoding SNPs, insertions, or deletions may influence protein function and transcription, thereby playing a role in tumorigenesis [27]. Recent studies in our country have

evaluated mutations in different segments of the *BRCA1* and *BRCA2* genes and their correlations with tumor histopathology, reporting a moderate yet significant correlation between clinical presentation and histopathological findings. These studies identified 15 molecular markers (SNPs and indels) of which 6 were polymorphic SNPs [12].

Moreover, whole-genome sequencing studies by Huskey et al. [28] identified *BRCA2* variants potentially associated with mammary cancer risk in various canine breeds and variable prevalence among breeds; however, though they highlighted the need for further validation of their findings. Employing a strategy similar to that applied to *BRCA1* by Decuadro et al. [11], the phylogenetic analysis of the amplified exon 10 sequence of *BRCA2* revealed a closer homology with *Canis lupus dingo* and *Canis lupus familiaris*, and a greater divergence from the *Nyctereutes* and *Vulpes* genera (Figure 1). *Canis lupus dingo* retains distinct *lupine* characteristics and, after humans, is Australia's primary predator, maintaining reproductive and behavioral traits that are significantly differ from those of domestic dogs [29]. Genetically, dingoes cluster with 71% of dog breeds and wolves, suggesting that their incomplete domestication results in the sharing of many wild-type traits with the latter [30]. Recent in silico studies using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) have provided a comparative evolutionary framework between human *BRCA1/BRCA2* sequences and 20,000 sequences from various organisms, demonstrating that certain alleles associated with cancer in humans may function as "wild-type" alleles in other species [31].

In-depth sequence analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in dogs with mammary tumors, and their interspecies comparisons, will yield valuable insights from both an evolutionary and a veterinary medicine perspectives, thereby advancing our understanding of this complex pathology.

Conclusions

In this study, sequence alignments and comparisons with reference breeds (Boxer, Great Dane, Basenji, and German Shepherd) revealed no novel SNPs in the analyzed cohort. For SNP1 c.715G>A, located within the investigated region of *BRCA1*, one dog exhibited a heterozygous genotype (G/A), while the remainder of the individuals were homozygous (G/G). No genetic variability was observed for SNP2c. 1341 G>A in *BRCA2*, as all dogs were homozygous (G/G). In both SNPs, statistical comparisons of allelic frequencies between the study population (P) and the reference population did not yield significant differences.

Moreover, phylogenetic analysis of the amplified exon 10 sequence of *BRCA2* indicated a higher degree of homology with *Canis lupus dingo* and *Canis lupus familiaris* compared to the *Nyctereutes* and *Vulpes* genera.

These findings underscore the necessity of continuing molecular investigations into the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes to further elucidate the complex etiology of canine mammary cancer and to further validate the canine model as a proxy for human breast cancer research. Future research hopes to increase the number of samples and perform whole genome sequencing.

Abbreviations.

DNA: Deoxyribonucleic Acid

BRCA1/2: Breast Cancer Genes 1 and 2

CMT: Canine Mammary Tumor

Indels: Insertions or Deletions

PCR: Polymerase Chain Reaction

SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' contributions

Decuadro A conceived the study, collected the samples, analyzed the data, performed PCR and drafted the manuscript. García F, Sosa M collected the samples, performed PCR, and analyzed the data. Llambí S was engaged in interpreting the data and was involved in writing the manuscript. Montenegro, M oversaw the study design, DNA sequences interpretation, and manuscript review. All authors have read and approved the final manuscript

References.

[1]. Cassali G, Nakagaki K, Jark P, Horta R, Arias A, Tellado M, et al. Consensus on the diagnosis, prognosis, and treatment of canine and feline mammary tumors: solid arrangement .Brazilian Journal of Veterinary Pathology 2024. 17(3):152-163; <https://10.0.94.6/bjvp.1983-0246.v17i3p152-163>

[2]. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. Cancer Invest 2000. 18(8):781–792; <https://doi.org/10.3109/073579000009012210>

- [3]. Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncol. Lett* 2018. 15: 8195-8205; <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>
- [4]. Pérez Alenza MD, Pena L, Del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. *J. Small Anim. Pract* 2000. 41: 287-291; <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03203.x>
- [5]. Di Giacomo D, Di Domenico M, Defourny SVP, Malatesta D, Di Teodoro G, Martino M, et al. Validation of AmpliSeq NGS panel for BRCA1 and BRCA2 variant detection in canine formalin-fixed paraffin-embedded mammary tumors. *Life (Basel)* 2022. 12(6):851; <https://doi.org/g8xrx2>
- [6]. Borge K, Borresen D, Lingaas F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Vet. Comp. Oncol* 2011. 9: 241–250; <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00250.x>
- [7]. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Okuda K, Taoda T, Chikazawa S, Shimamura A, et al. Establishment of a PCR analysis method for canine BRCA2. *BMC Res Notes* 2012. 5:173; <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-173>
- [8]. Lee A, Moon BI, Kim TH. BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Ann Lab Med.* 2020. 40(2):114-121; <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.2.114>
- [9]. Andour L, Hagenaars SC, Vangangel K, Aalberts J, Rebattu V, van der Meer DMAB, et al. The TESTBREAST journey: Revisiting the importance of early detection by frequent screening of women at high risk of breast cancer. *Int J Cancer.* 2025. 15;157(4):741-751; <https://doi.org/10.1002/ijc.35444>
- [10]. Pasaol JC, Śmieszek A, Pawlak A. Exploring the Therapeutic Potential of BRCA1 and BRCA2 as Targets in Canine Oncology: A Comprehensive Review of Their Role in Cancer Development and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2025. 26(4):1768; <https://doi.org/10.3390/ijms26041768>
- [11]. Sun W, Yang X, Qiu H, Zhang D, Wang H, Huang J, et al. Relationship between three novel SNPs of BRCA1 and canine mammary tumors. *J Vet Med Sci.* 2015. 77(11):1541-1543; <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0044>
- [12]. Decuadro A, Llambi S, Benech A, Gagliardi R. Analysis of polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 genes in a population samples of canines from Uruguay. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*2022. 32:1-6; <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32163>
- [13]. Decuadro A, Sosa M, García F, Balemian, N, Montenegro M, Llambi, S. Analysis of genetic polymorphisms in the intron 9–10/exon 10 region of the BRCA1 gene in a population sample of dogs with mammary cancer from Uruguay. *Revista Cient. FCV-LUZ* 2025. 35:1-6; <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e35545>
- [14]. Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, et al. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res.* 2009 69(22):8770-8774; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1725>

- [15]. Brønden LB, Nielsen SS, Toft N, Kristensen AT. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet Rec.* 2010. 166(19):586-90; <https://doi.org/10.1136/vr.b4808>
- [16]. Lou, DI, McBee, RM, Le, UQ. et al. Rapid evolution of BRCA1 and BRCA2 in humans and other primates. *BMC Evol Biol* 2014. 14:155; <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-155>
- [17]. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2011. 48(1):117-131; <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
- [18]. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012. 13:134; <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- [19]. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021. 38(7):3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- [20]. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 1999. 41(41): 95-98.
- [21]. Yeh FC, Yang RC, Boyle TB, Ye Z H, Mao JX. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. 1999. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- [22]. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013. 41(W1):W29–W33; <https://doi.org/gpmk7d>
- [20]. Nieto A, Pérez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castaño M, Peña L. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol* 2003. 128(4):260-8; <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0631>
- [24]. Meadows JRS, Kidd JM, Wang GD, Parker HG, Schall PZ, Bianchi M, et al. Genome sequencing of 2000 canids by the Dog10K consortium advances the understanding of demography, genome function and architecture. *Genome Biol* 2023. 15;24(1):187; <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03023-7>
- [25]. Nguyen, A.K., Schall, P.Z. & Kidd, J.M. A map of canine sequence variation relative to a Greenland wolf outgroups. *Mamm Genome* 2024. 35:565–576; <https://doi.org/10.1007/s00335-024-10056-1>
- [26]. Li D, Harlan-Williams LM, Kumaraswamy E, Jensen RA. BRCA1-No Matter How You Splice It. *Cancer Res* 2019. 79(9):2091-2098; <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3190>
- [27]. Thumser-Henner, P., Nytko, K.J. & Rohrer Bley, C. Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy. *BMC Vet Res* 2020. 16, 30; <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2247-4>
- [28]. Huskey ALW, Goebel K, Lloveras-Fuentes C, McNeely I, Merner ND. Whole genome sequencing for the investigation of canine mammary tumor inheritance - an initial assessment of

high-risk breast cancer genes reveal BRCA2 and STK11 variants potentially associated with risk in purebred dogs. Canine Med Genet 2020. 25:7-8; <https://doi.org/10.1186/s40575-020-00084-w>

[29]. Shipman P. What the dingo says about dog domestication. Anat Rec (Hoboken) 2021 .304(1):19-30; <https://doi.org/10.1002/ar.24517>

[30]. Larson, G, Fuller, D . The evolution of animal domestication. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst 2014. 45(1):115–136; <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-110512-135813>

[31]. Lai J, Sarkar NI. A Phylogenetic Approach to Analyze the Conservativeness of BRCA1 and BRCA2 Mutations. AMIA Annu Symp Proc. 2021. 25:677-686. PMID: 33936442; PMCID: PMC8075528.

Identification	Breeds	Relationship	Age	Sex	Presence of mammary tumors
GD1	Great Dane	Son	2	Male	mother with simple tubular carcinoma
GD2	Great Dane	Son	2	Male	mother with simple tubular carcinoma
GD3	Great Dane	Daughters	2	Female	mother with simple tubular carcinoma
GD4	Great Dane	Daughters	2	Female	mother with simple tubular carcinoma
GD5	Great Dane	Daughters	2	Female	mother with

					simple tubular carcinoma
GD6	Great Dane	Daughters	2	Female	mother with simple tubular carcinoma
B1	Bóxer	Sister	5	Female	mother with papillary cystic carcinoma
B2	Boxer	Sister	9	Female	mother with papillary cystic carcinoma
B3	Boxer	Sister	9	Female	mother with papillary cystic carcinoma
C1	Uruguayan Cimarron	Grandson	3	Macho	mother with simple carcinoma
C2	Uruguayan Cimarron	Daughters	5	Female	mother with simple carcinoma
C3	Uruguayan Cimarron	Granddaughter	3	Female	mother with simple carcinoma
C4	Uruguayan	Mother	10	Female	mother with

	Cimarron				simple carcinoma
P1	Poodle	Daughters	15	Female	mother with complex carcinoma
P2	Poodle	Mother	13	Female	mother with complex carcinoma

1

2 **Table 1**

3 Description of the animals according to breed, relationship, age, sex, and which of the animals had
4 a mammary tumor within each family. Mothers of Boxers and Great Danes were not included in
5 the sample.

6

7

BRCA1-Exon10-SNP1c.715G>A	P	Reference
Allele frequencies	Population	Population
Allele G	0.966	0.968
Allele A	0.033	0.031
G/G	0.9333	0.9444
G/A	0.0667	0.0463
A/A	0.0000	0.0093
BRCA2-Exon 10-SNP2c.1341G>A	P	Reference
	Population	Population

Allelic and Genotypic Frequencies		
Allele G	1	0.977
Allele A	0	0.023
G/G	1.00	0.9587
G/A	0.00	0.0367
A/A	0.00	0.0046

Table 2: Allelic and Genotypic Frequencies of the Polymorphisms Identified in the BRCA1 and BRCA2 Sequences in the Study Population (P) and the Reference Population. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

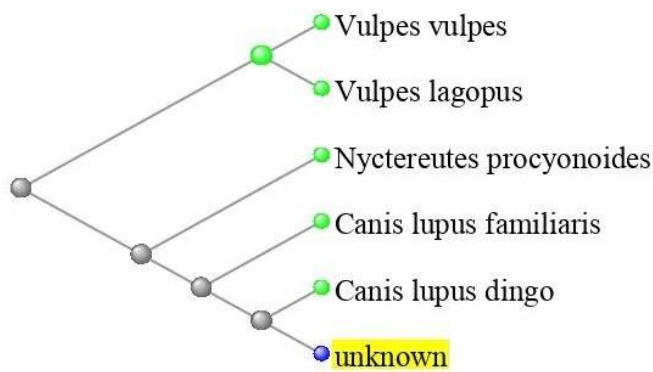


Figure 1: Neighbor-joining genetic distance tree generated using the amplified exon 10 sequence of BRCA2 via the tBlastn multiple alignment tool within the *Canidae* family. The blue circle denotes the consensus sequence generated in this study. The bootstrap support, based on 1000 replicates indicate a high value greater than 95%.

Global DNA hypomethylation in canine mammary tumors

Hipometilación genómica global en tumores de mama canino

Alicia Decuadro^{*1}, María del Carmen Montenegro², Silvia Llambí³, Nariné Balemian², Mónica Cappetta^{*3}

¹ Universidad de la República, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad Académica de Clínica de Pequeños Animales. Ruta 8, Km 18 Montevideo, Uruguay.

² Universidad de la República, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad Académica de Genética y Mejoramiento Animal. Ruta 8, Km 18 Montevideo, Uruguay.

³ Universidad de la República, Facultad de Medicina, Unidad Académica de Genética. Av. General Flores 2125, Montevideo, Uruguay.

*Autor correspondencia: oncologiafvvetudelar@gmail.com

ABSTRACT

Due to its influence in transcriptional potential of genes, genetic regulation by means of epigenetic mechanisms is essential for normal growth and development. In mammary cancer, epigenetic modifications play a key role for its development and progression. In early carcinogenesis stages, due to genetic alterations or environmental factors, chromatin structure alterations due to DNA methylation and post-translational modifications of DNA-bound proteins may appear. As with other types of tumor, genome-wide hypomethylation and hypermethylation of specific genes, particularly in CpG islands that normally are not methylated, are observed. In order to compare global DNA methylation levels between tumor tissue and normal mammary tissue, we studied 11 intact female dogs with mammary tumors. Both types of tissue were collected during surgery, with subsequent clinical staging and histopathological classification of tumors. For each animal, DNA was extracted from paired samples of tumor tissue and normal mammary tissue. Global genomic methylation levels were calculated by relative quantitation of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) with HPLC. Results showed that tumoral tissue had a global DNA hypomethylation when compared with normal mammary tissue ($P < 0.05$). This difference was greater in high histopathological grade tumors, characterized by their aggressive clinical behavior and high metastatic rate. These findings underscore the importance of additional studies in this line of research, with greater sample sizes. In the future, global DNA methylation may be used as a prognosis biomarker for mammary cancer in dogs.

Key words: Canine mammary tumors; epigenetics; global DNA methylation

RESUMEN

La regulación génica mediante mecanismos epigenéticos es esencial para el crecimiento y el desarrollo normal, ya que influye en el potencial transcripcional de los genes. En el cáncer de mama, las modificaciones epigenéticas desempeñan un papel clave en su desarrollo y progresión. En etapas tempranas de la carcinogénesis, como consecuencia de lesiones genéticas o factores ambientales, se producen alteraciones en la estructura de la cromatina a través de la metilación del ADN y de modificaciones postraduccionales de proteínas unidas al ADN. Al igual que varios tumores, se observa una hipometilación a nivel genómico y la hipermetilación de ciertos genes, especialmente en islas CpG que normalmente no se encuentran metiladas. Con el objetivo de comparar el nivel de metilación global del ADN entre tejido tumoral y tejido mamario sano, se estudiaron 11 perras enteras con tumores de mama. Ambos tipos de tejido fueron extraídos durante la cirugía, y se realizó la estadificación clínica y clasificación histopatológica de los tumores. A partir de muestras pareadas de tejido tumoral y tejido mamario sano de cada animal, se extrajo ADN y se determinaron los niveles de metilación genómica global mediante cuantificación relativa de 5-metil 2-desoxicitidina (5mdC) utilizando HPLC. Los resultados revelaron una hipometilación global del ADN en el tejido tumoral en comparación con el tejido mamario sano ($P < 0.05$). Esta diferencia fue más pronunciada en tumores de alto grado histopatológico, caracterizados por un comportamiento clínico agresivo y una elevada tasa de metástasis. Estos hallazgos subrayan la importancia de continuar con esta línea de investigación, ampliando el tamaño muestral. En el futuro, la metilación global del ADN podría utilizarse como un biomarcador pronóstico del cáncer de mama en perros.

Palabras clave: Tumores de mama en caninos; epigenética; metilación global del ADN



INTRODUCTION

Epigenetics refers to changes in genetic expression impacting on phenotype and that involve no modifications of the DNA sequence [1, 2]. Epigenetic processes include DNA methylation, histone post-translational modifications, non-coding RNA functions, and co-transcriptional modification of different RNA molecules (mRNA, rRNA, tRNA, RNAmi or lncRNA) [3]. Genetic regulation by means of epigenetic mechanisms is essential for normal growth and development, conditioning transcriptional potential of genes. In normal cells, DNA methylation is necessary for maintenance of cellular growth and metabolism, while abnormal DNA methylation may cause different diseases, like cancer [1]. In cancer, DNA methylation is one of the most frequently altered epigenetic processes [4, 5].

DNA methylation consists in a covalent chemical modification that adds a methyl group (CH₃) to the fifth carbon of the cytosine pyrimidine ring, leading to the formation of 5-methylcytosine (5-me-C). This process is catalyzed by the DNA methyltransferases (DNMT), a family of enzymes that may carry out de novo DNA methylation or establish methylation of hemimethylated DNA [2, 6].

In mammary cancer, epigenetic modifications are a key element in tumor development and progression. In early carcinogenesis stages, due to genetic lesions or environmental impacts, alterations in chromatin structure take place through DNA methylation and post-translational modifications of DNA-bound proteins [7]. These alterations impact cellular plasticity and favor oncogenic reprogramming of tumor progenitor cells, promoting the acquisition of uncontrolled self-renewal properties. In later stages of cancer growth, further epigenetic modifications, combined with subclonal mutations and microenvironmental signals, modulate tumor cell phenotype and influence its metastatic propensity [8].

As for the role of DNA methylation in mammary cancer, it has been demonstrated, similarly to cancer in general, both hypomethylation at the genomic level and hypermethylation of certain genes, particularly in usually unmethylated CpG islands [2]. More than 100 genes with hypermethylated promoters have been identified; many of them are critical for tumor suppression, cell cycle regulation, apoptosis, angiogenesis, tissue invasion, and metastasis [9].

On the other hand, DNA methylation has been associated with clinical and pathological characteristics of women with breast cancer, such as tumor clinical stage and grade. Additionally, specific methylation profiles associated with different breast cancer subtypes in women have been identified, suggesting they could play an important role in their development and progression [10].

Cancer is the best-characterized complex human disease associated with epigenetic defects [11, 12], with epigenetic modifications observed in human tumors being shared with canines. This supports the possibility of using dogs (*Canis lupus familiaris*) as a model for studying such alterations for diagnosis, prognosis and development of new therapies. Canines are an excellent study model, as they share the same environment with humans [13].

Humans and dogs share similar aspects of the disease, including spontaneous tumor development, hormonal

components, age of incidence, and disease progression. Tumor size and lymph node invasion show no differences between both species. Likewise, humans and dogs share expression of certain factors such as steroid receptors, epidermal growth factors, proliferation factors, and P53 mutations [14].

DNA methylation studies related to canine mammary tumor (CMT) development are scarce. Research includes the analysis of genome-wide methylation profiles (methylome) [15] and quantification of global DNA methylation [16]. Brandão *et al.* [17] analyzed the DNA methylation status of the ESR1 gene encoding estrogen receptor alpha in canine mammary tumors. Beetch *et al.* [18] analyzed samples from different tumor stages, as well as from healthy donors, describing hypermethylation patterns of cancer-related genes.

In view of the above, this study aims to compare global DNA methylation levels between tumor tissues and normal mammary tissue of female dogs with mammary tumors.

MATERIALS AND METHODS

The research was carried out at the Faculty of Veterinary Medicine Hospital, the Genetics and Animal Improvement Unit of the Faculty of Veterinary Medicine, and the Genetics Department of the Faculty of Medicine (University of the Republic). All procedures were approved under number 1383 by the Honorary Commission for Animal Experimentation (CHEA).

Eleven intact female dogs, with mammary tumors and ages ranging from 6 to 12 years of old that had been admitted to the Hospital, were selected. Mammary tumor cases were selected according to the clinical characteristics previously described in the species. The animals included in the study exhibited an acceptable general clinical condition and underwent pre-surgical studies (blood biochemistry and urinalysis) within reference ranges, which, combined with disease staging, allowed for the selection of an appropriate surgical approach (anesthetic risk classification: ASA I or II).

Clinical staging of patients with mammary tumors was performed according to the TNM mammary tumor classification criteria of the World Health Organization (WHO) by means of triple view chest X-ray and abdomen ultrasound. Normal and tumoral tissue samples were collected the same day of the surgery, and were immediately stored in Eppendorf tubes with no solution at -80°C in a freezer Thermo Fisher Scientific, TSX Series (USA) until their epigenetic and histological and pathological analysis (TABLE I).

Normal tissue samples were obtained from the mammary glands adjacent to those with tumors, using standardized sampling site criteria. This procedure was followed because regional excisions or radical mastectomies generally involve removal of normal mammary glands in the same surgical procedure, thus eliminating the need for additional biopsies for collection of these types of samples.

The DNA extraction from tumoral and normal mammary tissue samples was performed with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Extracted DNA concentration and purity was measured with a DeNovix DS-11 spectrophotometer USA. Global genomic methylation levels were measured by relative

Hypomethylation in canine mammary tumors / Decuadro y cols.

quantification of 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC) with HPLC as described by Berdasco *et al.* [11] and Cappetta *et al.* [12]. For enzymatic hydrolysis, 1 µg of genomic DNA (in 10 µg of ultra-pure water) of each sample was denatured for 10 minutes (min) at 94 °C, followed by cooling on ice for 5 min. Subsequently, 1.5 µL of nuclease P1 (New England BioLabs), with its corresponding buffer was added, with subsequent incubation at 37 °C for 15 hours (h) using a Multigene II machine (Labnet International, Inc. USA). Hydrolyzed DNA was incubated with alkaline phosphatase (Thermo Scientific™ USA) for an additional hour at 37 °C and 10 min at 75 °C, according to the manufacturer's instructions, in a reaction with a final volume of 50 µL.

Nucleoside separation following genomic hydrolysis was performed with an HPLC Agilent series 1100 equipment (USA) with UV detection. 50 µL of hydrolyzed DNA were injected into a dC18 Atlantis (Waters) reverse-phase column (2.1 × 20 mm; 5 mm particle size), protected by a guard column (2.1 × 20 mm; 5 mm particle size; Agilent), at a 0.150 mL/min constant flow rate. The following buffers were used: 0.1 % formic acid in water (solvent A), and 0.1 % formic acid in water:methanol (40 %) (solvent B); in an isocratic gradient of 95 % solvent A and 5 % solvent B for 30 min. As standards, a 5 mM mixture of the following mononucleosides were used: deoxyadenosine (dA), deoxythymidine (dT), deoxyguanosine (dG), deoxycytidine (dC), 5-methyl-2'-deoxycytidine (5mdC), and deoxyuridine (dU) (Sigma-Aldrich).

Quantification of 5mdC and dC percentages was directly calculated from the area of their respective peaks in the HPLC chromatogram. Samples were analyzed in duplicate, and those with a 5mdC content differences between duplicates greater than 3 % were excluded [12]. Global genomic DNA methylation

level is shown as the relative amount of 5mdC in total cytidine residues; thereby, global genomic DNA methylation percentage is: $[\text{mdC} / (\text{mdC} + \text{dC})] \times 100$.

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was performed to assess normality of global methylation percentage data distribution. Upon confirmation of normality assumptions, Student's t-test was performed. Cohen's d effect size was calculated to assess the magnitude of the difference between both groups [19].

RESULTS AND DISCUSSION

Global genomic DNA methylation was assessed in 11 female dogs of various breeds diagnosed with mammary cancer, comparing tumor tissue with normal mammary tissue from each animal studied. TABLE I summarizes age, breed, disease stage, histopathological classification and grade of tumors following surgery, as classified according to Goldschmidt *et al.* [20], as well as the DNA methylation percentage of normal and tumor tissues.

The histopathological analysis showed that 8 (72.7) and 3 (27.3 %) of the 11 female dogs analyzed had malignant and benign tumors respectively. Malignant tumors comprised: 3 simple carcinomas, 2 mixed carcinomas, 1 papillary cystic carcinoma, 1 complex adenocarcinoma, and 1 solid carcinoma. Benign tumors corresponded to 2 mixed adenomas and 1 complex adenoma. This distribution of tumor types is consistent with the most frequent tumors in CMT reported by Goldschmidt *et al.* [20].

TABLE I
Description of patients by age, breed, disease stage, histopathological classification, and methylation percentage in normal tissue and tumor tissue.

Case	Age	Breed	Stage	Histopathological Grade		Normal Tissue Methylation	Tumor Tissue Methylation
1	10	Cimarrón	III	II	Papillary cystic carcinoma	4.791892158	2.725887465
2	8	Mixed Breed	III	II	Simple adenocarcinoma	2.144284287	2.336448598
3	12	Cocker	III	II	Mixed carcinoma	2.413530977	2.285336856
4	8	Mixed Breed	III	III	Simple adenocarcinoma	4.342321813	2.766662856
5	7	Mixed Breed	III	Benign	Mixed adenoma	2.884515795	3.053574218
6	7	German Shepherd	III	II	Complex adenocarcinoma	2.46986528	1.924168464
7	8	Pug	I	I	Mixed carcinoma	3.143661972	2.307747267
8	8	German Shepherd	I	Benign	Complex Adenoma	3.750999886	3.754702599
9	6	Poodle	I	Benign	Mixed adenoma	3.879251734	3.617225363
10	8	Mixed Breed	III	II	Simple Carcinoma	4.002230611	2.622711446
11	10	Poodle	I	II	Solid Carcinoma	4.027690371	3.458671344

The breeds studied included 4 mixed breeds, 2 Poodles, 2 German Shepherds, 1 Cocker Spaniel, 1 Cimarrón, and 1 Pug. The prevalence of these breeds in the sample may reflect their overrepresentation in the canine population of our country, which may vary according to geographical location [21].

Comparison of global genomic methylation levels between normal tissue and tumor tissue from dogs histopathologically diagnosed with mammary tumors revealed a significant difference ($P < 0.05$). Specifically, tumor tissues had lower

methylation levels than normal tissues animals (FIG. 1), indicating global hypomethylation in tumor tissues of the analyzed. This finding is consistent with existing literature, where hypomethylation is reported as a common epigenetic alteration in different cancer types, including mammary cancer in women [12] and dogs [15, 16], as well as other cancer types [15].

Cases 1, 4, and 10 showed the greatest differences in genomic methylation percentages between tumor and normal tissue. These three female dogs (two mixed breeds and one

Cimarrón) were diagnosed with high histopathological grade tumors (grade III): one cystic papillary carcinoma and two simple adenocarcinomas. These tumors are characterized by their clinically aggressive behavior and high metastatic rates.

These results are consistent with those of Biondi *et al.* [16], who also observed significant differences in global DNA methylation patterns in CMT, where hypomethylation was more frequent in malignant tumors. Although these authors used a different detection approach (5-methylcytosine immunostaining) and a larger sample size, the similarity of findings supports the existence of a relationship between global DNA hypomethylation and malignancy in canine mammary tumors, thus suggesting its potential as a prognostic biomarker, particularly in tumors with a more aggressive behavior and a higher relapse risk.

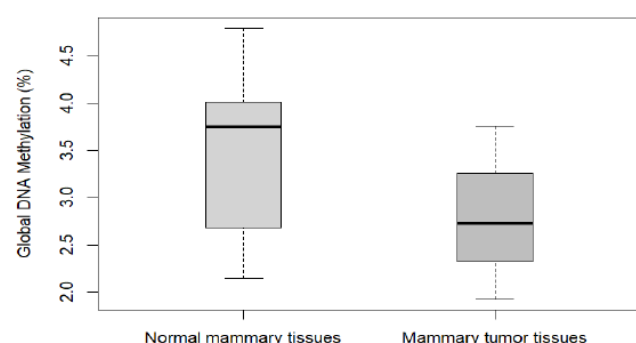


FIGURE 1. Comparison of global DNA methylation level percentages between normal mammary tissues and mammary tumor tissues. Boxes represent interquartile ranges, and lines across boxes the median values. Statistically significant differences between normal mammary tissues and mammary tumors were calculated using Student's t test ($P < 0.05$)

The observed difference in methylation between normal and tumor tissue in 11 of the samples, besides being statistically significant, was also of considerable magnitude according to the calculated Cohen's d effect value of 0.84 (values above 0.8 indicate a large effect).

Although research on global genomic methylation in female dogs with CMT is limited, there are studies focusing on methylation in specific genes. For example, Brandão *et al.* [17] investigated DNA methylation status of the ESR1 gene encoding estrogen receptor alpha in CMT. Their findings showed no significant differences in ESR1 methylation status between different types of tumors, suggesting DNA methylation would not be involved in ESR1 regulation in canine mammary tumors.

This contrasts with findings in human breast cancer, where DNA methylation may have a significant impact on ESR1 expression. Although this study focused in global genomic methylation and not in specific genes such as ESR1, it is worth mentioning the differential effect that methylation may have at the global level, as well as the fact that modifications in specific genes do not necessarily reflect global epigenetic modifications.

In addition, Jeong *et al.* [15] used bisulfite sequencing to investigate whole genome methylation profiles in both canine mammary tumors and peripheral blood mononuclear cells. Interestingly, they found unique methylation signatures enriched in CMT, where genes associated with apoptotic pathways and transmembrane ion transport exhibited hypermethylation, while genes involved in cellular proliferation and oncogenes were hypomethylated in tumor tissues. The inclusion of peripheral blood samples by Jeong *et al.* [15] constitutes a precedent for their use in CMT research. This poses a future line of research for our team, as these are less invasive samples that may be used as a suitable tool for diagnosis, prognosis and treatment monitoring.

Beetch *et al.* [18] examined samples from various tumor stages alongside normal donor controls, characterizing hypermethylation patterns in cancer-associated genes. Their findings demonstrated that genes involved in transcriptional regulation, apoptotic processes, signal transduction pathways, and cellular migration correlate with gene expression patterns and disease progression in canine patients.

This suggests that methylation profiling holds clinical potential for distinguishing between different stages of tumor progression. Although their approach differs from ours, they agree that aggressive canine mammary tumors and benign tumors have different methylation patterns. Thus, DNA methylation modifications could guide disease progression monitoring, which is linked to prognosis.

Human research focuses on achieving deeper understanding of epigenetic mechanisms to obtain better therapies, as well as leveraging therapies that promote global epigenetic normalization to counteract epigenetic aberrations. Such approaches promise to enhance the clinical utility of epigenetic therapeutics, optimizing research investment returns while improving patient outcomes [22]. Given the paucity of comparable studies in canine oncology, this findings contribute valuable data toward better understanding the epigenetic landscape of mammary tumor biology in dogs.

CONCLUSIONS

This study investigated global DNA methylation levels in female dogs with mammary tumors and normal mammary tissue (control samples). Lower DNA methylation percentages were observed in tumor tissues, being this effect more pronounced in high histopathological grade tumors when compared to normal tissue. Based on these results, we can conclude that tumor tissue DNA was hypomethylated when compared to normal tissue. This work highlights the importance of continuing this line of research with larger sample sizes, mainly so that in the future global DNA methylation can be used as a biomarker to provide more accurate prognosis for this disease in dogs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out in the Small Animal Clinic and Surgery Unit and the Academic Unit of Genetics and Animal Improvement at the Faculty of Veterinary Medicine, University of the Republic, and the Genetics Unit of the Faculty of Medicine. Funding was from the Sectoral Commission for Scientific

Hypomethylation in canine mammary tumors / Decuadro y cols.

Research (SIC), the Research and Scientific Development Commission of the Faculty of Veterinary Medicine (CIDER), and the Graduate Academic Programs of the Faculty of Veterinary Medicine, Uruguay.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest related to this report.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] Zhou WM, Liu B, Shavandi A, Li L, Song H, Zhang JY. Methylation landscape: Targeting writer or eraser to discover anti-cancer drug. *Front Pharmacol*. [Internet]. 2021; 12:690057. doi: <https://doi.org/qf7c>
- [2] Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*. [Internet]. 2014; 6(6):651-664. doi: <https://doi.org/gms37n>
- [3] Bártová E. Epigenetic and gene therapy in human and veterinary medicine. *Environ. Epigenetics*. [Internet]. 2024; 10(1):dvae006. doi: <https://doi.org/qf7f>
- [4] Szczepanek J, Skorupa M, Jarkiewicz-Tretyn J, Cybulski C, Tretyn A. Harnessing Epigenetics for Breast Cancer Therapy: The Role of DNA Methylation, Histone Modifications, and MicroRNA. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2023; 24(8):7235. doi: <https://doi.org/qf7h>
- [5] Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annu. Rev. Genet.* [Internet]. 2014; 48:237-268. doi: <https://doi.org/qf7j>
- [6] Nishiyama A, Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet.* [Internet]. 2021; 37(11):1012-1027. doi: <https://doi.org/gm5thv>
- [7] Menezo Y, Silvestris E, Dale B, Elder K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod. Biomed. Online*. [Internet]. 2016; 33(6):668-683. doi: <https://doi.org/f9p3tc>
- [8] Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin. Cancer Biol.* [Internet]. 2018; 51:22-35. doi: <https://doi.org/gd45tv>
- [9] Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. In: Verma, M. (eds). *Cancer Epigenetics. Methods Mol. Biol.* [Internet]. 2015; 1238:425-466. doi: <https://doi.org/f6trhx>
- [10] Györfy B, Bottai G, Fleischer T, Munkácsy G, Budczies J, Paladini L, Børresen-Dale A, Kristensen VN, Santarpia L. Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes. *Int. J. Cancer*. [Internet]. 2016; 138(1):87-97. doi: <https://doi.org/gjjd2s>
- [11] Berdasco M, Fraga M, Esteller M. Quantification of global DNA methylation by capillary electrophoresis and mass spectrometry. In: Tost, J. (eds) *DNA Methylation. Methods Mol. Biol.* [Internet]. 2009; 507:23-34. doi: <https://doi.org/cjz5p9>
- [12] Cappetta M, Berdasco M, Hochmann J, Bonilla C, Sans M, Hidalgo PC, Artagaveytia N, Kittles R, Martínez M, Esteller M, Bertoni B. Effect of genetic ancestry on leukocyte global DNA methylation in cancer patients. *BMC Cancer*. [Internet]. 2015; 15:434. doi: <https://doi.org/f7dp9f>
- [13] Xavier P, Müller S, Fukumasu H. Epigenetic Mechanisms in Canine Cancer. *Front. Oncol.* [Internet]. 2020; 10:591843. doi: <https://doi.org/qf7k>
- [14] Abdelmegeed S, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). *Oncol. Lett.* [Internet] 2018; 15(6):8195-8205. doi: <https://doi.org/mdsg>
- [15] Jeong S, Lee K, Nam A, Cho J. Genome-wide methylation profiling in canine mammary tumor reveals miRNA candidates associated with human breast cancer. *Cancers*. [Internet] 2019; 11(10):1466. doi: <https://doi.org/qf7m>
- [16] Biondi L, Tedardi M, Gentile L, Chamas P, Dagli M. Quantification of global DNA methylation in canine mammary gland tumors via immunostaining of 5-methylcytosine: Histopathological and clinical correlations. *Front. Vet. Sci.* [Internet] 2021; 8:628241. doi: <https://doi.org/qf7n>
- [17] Brandão Y, Toledo M, Chequin A, Cristo T, Sousa R, Ramos E, Klassen G. DNA methylation status of the estrogen receptor α gene in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* [Internet] 2018; 55(4):510-516. doi: <https://doi.org/qf7p>
- [18] Beetch M, Harandi S, Yang T, Boycott C, Chen Y, Stefanskán B, Mohammed S. DNA methylation landscape of triple-negative ductal carcinoma in situ (DCIS) progressing to the invasive stage in canine breast cancer. *Sci. Rep.* [Internet] 2020; 10:2415. doi: <https://doi.org/qf7q>
- [19] Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. New York University: Lawrence Erlbaum Associates. 1988.
- [20] Goldshmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli, V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* [Internet] 2011; 48(1):117-131. doi: <https://doi.org/cg36bk>
- [21] Egenvall A, Bonnett B, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prevent. Vet. Med.* [Internet]. 2005; 69(1-2):109-127. doi: <https://doi.org/fw7k7z>
- [22] Hillyar C, Rallis K, Varghese J. Advances in epigenetic cancer therapeutics. *Cureus*. [Internet] 2020; 12(11):e11725. doi: <https://doi.org/gqsrqz>