

Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el Área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico

Luigi Mateo Arango Vásquez M.V

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Genética.

Tutor

Gustavo Alfonso Mendoza Fandiño. Biólogo, PhD. Bioquímica
Docente Facultad de medicina Veterinaria
Corporación Universitaria Remington.
Grupo de investigación GINVER

Co-tutor

Carlos Mario Muñetón Peña. Biólogo. MSc.
Profesor Titular
Unidad Genética Médica Departamento de Pediatría
Facultad de Medicina
Universidad de Antioquia

Comité tutorial

Elsa Maria Vásquez Trespalacios Bióloga MSc. (C) PhD.
Gonzalo Vásquez. Biólogo. Esp. Citogenética. MSc
Luis Guillermo Carvajal Zootecnista. PhD.

Universidad de Antioquia
Corporación Ciencias Básicas Biomédicas
Medellín

Dedicatoria

Especialmente y con todo el amor de mi corazón dedico este logro profesional a mis padres Yelly Vásquez García y Miguel Ángel Arango García, a mis abuelos Betty García Echeverry y Miguel Antonio Arango Muñoz, por brindarme su apoyo incondicional, amor y dedicación, por enseñarme que todo en la vida se logra, siempre y cuando haya pasión y entrega.

Agradecimientos

- A los profesores Gustavo Mendoza Fandiño y Carlos Muñetón Peña por su dedicación, paciencia y apoyo académico, recibido durante este proceso formativo.
- A mis compañeros y formadores de la Corporación Universitaria Remington, en especial a Ignacio Ramos Jaramillo, Ana Cristina Cadavid Ramírez, por apoyarme, creer en mi y darme su aliento para seguir adelante.
- A los miembros del Comité Tutorial por sus consejos y valiosos aportes, de manera especial a la profesora Elsa Vásquez por el tiempo dedicado por enseñarme y corregirme en el proceso de investigar.
- A las clínicas Veterinarias por brindarme su apoyo y colaboración en la recolección de muestras, en especial a la Clínica Veterinaria la 30 y a la clínica veterinaria Zoomania.
- A la Médico Veterinario sp, MS.c Clara Taborda, por enseñarme en el área de patología y apoyar la investigación desde el análisis histopatológico de las muestras.
- Al profesor Camilo Calle por su paciencia y ayuda en los análisis estadísticos.
- A los propietarios y sus caninos que participaron voluntariamente en esta investigación.

Tabla de Contenido

1. Resúmen.....	11
2. Abstract.....	13
3. Planteamiento del problema	15
4. Justificación.....	18
5. Marco teórico.....	19
5.1. Generalidades neoplasias.....	19
5.2. Glándula mamaria en caninos.....	22
5.3. Neoplasias mamarias en caninos.....	22
5.4. Clasificación de las neoplasias mamarias en caninos.....	23
5.5. Bases moleculares en el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos.....	33
6. Objetivos.....	34
6.1. Objetivo general.....	34
6.2. Objetivos específicos.....	34
7. Materiales y métodos.....	36

7.1. Tipo de estudio.....	36
7.2. Población de estudio.....	36
7.2.1. Criterios de inclusión.....	37
7.2.2. Criterios de exclusión.....	37
7.3. Muestra.....	37
7.4. Extracción de DNA.....	38
7.5. Amplificación de regiones.....	39
7.6. Secuenciamiento.....	43
7.7. Análisis de resultados.....	43
8. Resultados.....	44
8.1. Caracterización de la población de estudio.....	44
8.2. Clasificación histopatológica de las muestras neoplásicas.....	45
8.3. Detección y frecuencia de variantes genéticas.....	46
8.4. La frecuencia de las variantes genéticas detectadas en el exón 11 del gen <i>BRCA2</i> según los tipos histológicos.....	49
8.5. Detección y frecuencia de haplotipos.....	50

8.6. Relación entre haplotipos y los tipos histológicos.....	51
8.7. Relación entre haplotipos y las razas.....	52
8.8. Relación entre las variantes genéticas y la edad.....	53
8.9. Relación entre las variantes genéticas y la raza.....	54
9. Discusión.....	56
10. Conclusiones.....	65
11. Perspectivas.....	67
12. Referencias.....	69
13. Anexos.....	79

Lista de tablas

Tabla 1. Porcentaje y tasa de incidencia por cada 100.000 caninos afectados por neoplasias.

Tabla 2. Clasificación histológica de las neoplasias mamarias en caninos reportada por Goldschmidt, M. Et al. 2011

Tabla 3: Listado de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Tabla 4: Listado de variantes genéticas a analizar.

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados amplificación de las regiones genéticas que contienen las variantes genéticas analizadas y el tamaño obtenido en pares de bases (pb) del fragmento amplificado por PCR.

Tabla 6: Condiciones de experimento PCR para la amplificación de las regiones que contienen las variantes genéticas analizadas.

Tabla 7: Frecuencia de variantes genéticas en el exón 11 del gen *BRCA2* en condición homocigota y heterocigota, en 75 muestras de caninos con NGM.

Tabla 8: Frecuencia de las variantes genéticas detectadas en el exón 11 del gen *BRCA2* en condición heterocigota y homocigota según los tipos histológicos malignos.

Tabla 9: Frecuencia de haplotipos en el exón 11 del gen *BRCA2* en 75 caninos con neoplasias mamarias estudiados.

Tabla 10: Relación entre los haplotipos y los tipos histológicos en los 75 caninos con NGM.

Tabla 11: Relación entre los haplotipos y la raza.

Lista de figuras.

Figura 1: Anatomía e histología de la glándula mamaria.

Figura 2: Productos amplificados por PCR para cada uno de los genes evaluados.

Figura 3: Frecuencia de razas en la población de estudio.

Figura 4: Frecuencia tipos histológicos en la población.

Figura 5: Cromatogramas de las variantes genéticas de analizadas.

Figura 6: Relación entre la edad de aparición de las neoplasias y la variante genética

801.

Lista de anexos

Anexo 1: Características físico-patológicas de la población de estudio y variantes genéticas.

Anexo 2: Relación entre la edad de aparición de las neoplasias mamarias en los 75 caninos estudiados y la variante genética 1425.

Anexo 3: Relación entre la edad de aparición de las neoplasias mamarias en los 75 caninos estudiados y la variante genética 1435.

Anexo 4: Relación de los haplotipos con el efecto de las covariables edades y esterilizado.

Anexo 5: Consentimiento informado.

Anexo 6: Formato empleado para obtener la información clínico patológica de los 75 caninos con neoplasias mamarias.

1. Resumen.

Las neoplasias son procesos patológicos multifactoriales caracterizados por la proliferación anormal e incontrolada de las células. Las neoplasias mamarias son diagnosticadas comúnmente en las hembras caninas no esterilizadas con reportes epidemiológicos entre el 20,5% y el 70,5% dependiendo de la población estudiada. Las neoplasias mamarias presentan una alta heterogeneidad histológica debido a sus múltiples componentes celulares. Diferentes factores intervienen en la pérdida del control de la proliferación celular. Se han reportado variantes genéticas en los genes Breast Cáncer type 1 (*BRCA1*) Breast Cáncer type 2 (*BRCA2*) relacionadas con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos. *BRCA1* y *BRCA2* son genes supresores tumorales cuya función es la regulación de la proliferación celular, reparación del daño por rupturas en la doble cadena de DNA y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Actualmente en Colombia no existen reportes de estudios que detecten la presencia y establezcan la frecuencia de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* relacionadas con las neoplasias mamarias en caninos. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia y frecuencia de las variantes genéticas identificadas previamente en la literatura, c.4762 G>T p.W1567STOP en el exón 13 del gen *BRCA1* y c.2401 A>C p.K801Q, c.2488 A>G p.I830V, c.4273 A>C p.T1425P y c.4304 A>G p.K1435R ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2* en 75 caninos hembra con neoplasias mamarias del Área metropolitana; Antioquia, caracterizar histopatológicamente sus tejidos neoplásicos mamarios y establecer la

relación entre la presencia de las variantes genéticas y características como el tipo histológico, la edad, la raza entre otras. Se encontraron 8 diferentes tipos histológicos en los tejidos neoplásicos mamarios estudiados, 7 clasificados como malignos, siendo el carcinoma mixto mamario el más común con un 36%. Las frecuencias de las variantes genéticas estudiadas fueron: 65.3% p.K1435R, 51.9% p.K801Q, 13.3% p.T1425P y 5.3% p.I830V. Adicional se establecieron los diferentes haplotipos según las combinaciones alélicas, 5 en total, de los cuales el CAAA que presentaba la variante p.K801Q en condición homocigota se relacionó estadísticamente significativa con el tipo histológico y la raza. También se encontró que los individuos con la variante genética c.2401 A>C p.K801Q en condición homocigota presentaron una mediana de edad de aparición de la neoplasia mamaria menor, en 2.5 años, respecto al resto de individuos de la población de estudio, siendo esto estadísticamente significativo. Estos hallazgos permiten establecer un primer registro epidemiológico y molecular sobre la presencia de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, relacionadas con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos en el Área Metropolitana de Antioquia, Colombia, las cuales presentan una relación con características neoplásicas y poblacionales. Este estudio estableció por primera vez una relación genotipo - fenotipo en el cáncer de mama en caninos en Colombia.

Palabras claves: Neoplasias mamarias, Caninos, Variantes genéticas, *BRCA1*, *BRCA2*.

2. Abstract.

Neoplasms are multifactorial pathological processes characterized by abnormal and uncontrolled proliferation of cells. Mammary neoplasms are commonly diagnosed in non-sterilized canine females with epidemiological reports between 20.5% and 70.5% depending on the population studied. Breast neoplasms present a high histological heterogeneity due to their multiple cellular and histological components. Different factors intervene in the loss of control of cell proliferation. Genetic variants have been reported in Breast Cancer type 1 (BRCA1) and Breast Cancer type 2 (BRCA2) genes related to the development of mammary neoplasms in canines. BRCA1 and BRCA2 are tumor suppressor genes whose function is the regulation of cell proliferation, repair of damage due to breaks in the double strand of DNA and the maintenance of genomic stability. Currently in Colombia there are no reports of studies that detect the presence and establish the frequency of genetic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes related to mammary neoplasms in canines. The objective of this study was to determine the presence and frequency of the genetic variants previously identified in the literature, c.4762 G> T p.W1567STOP in exon 13 of the BRCA1 gene and c.2401 A> C p.K801Q, c. 2488 A> G p.I830V, c.4273 A> C p.T1425P and c.4304 A> G p.K1435R located in exon 11 of the BRCA2 gene in 75 female canines with mammary neoplasms from the Metropolitan Area; Antioquia, histopathologically characterize its mammary neoplasm tissues and establish the relationship between the presence of genetic variants and characteristics such as

histological type, age, race, among others. Eight different histological types were found in the studied mammary neoplasm tissues, 7 classified as malignant, with mixed mammary carcinoma being the most common with 36%. The frequencies of the genetic variants studied were: 65.3% p.K1435R, 51.9% p.K801Q, 13.3% p.T1425P and 5.3% p.I830V. In addition, the different haplotypes were established according to the allelic combinations, 5 in total, of which the CAAA that presented the p.K801Q variant in homozygous condition was statistically significant related to the histological type and race. It was also found that individuals with the genetic variant c.2401 A> C p.K801Q in a homozygous condition had a median age of appearance of the lower mammary neoplasm, in 2.5 years, compared to the rest of the individuals in the study population. this being statistically significant. These findings allow us to establish a first epidemiological and molecular registry on the presence of genetic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes, related to the development of mammary neoplasms in canines in Colombia, which present a relationship with neoplastic and population characteristics. This study established for the first time a genotype-phenotype relationship in canine breast cancer in Colombia.

Keywords: Breast neoplasms, Canines, Genetic variants, *BRCA1*, *BRCA2*.

3. Planteamiento del problema.

Las neoplasias son procesos patológicos multifactoriales, caracterizados por la proliferación celular anormal e incontrolada. (1,2) Diferentes factores intervienen en la pérdida del control de la proliferación de las células, entre ellos, los ambientales o externos como la dieta, actividad física, exposición a agentes físicos, químicos o biológicos y los endógenos, entre los cuales se consideran las alteraciones genéticas. (3–6) En caninos, las neoplasias se desarrollan en diferentes órganos o sistemas anatómicos, entre estos la piel y glándulas anexas, glándulas mamarias, tejido hematopoyético y tejido gastrointestinal. (7,8) Las neoplasias que se denominan malignas, presentan comportamientos celulares de alta proliferación, invasión, alteraciones nucleares, pérdida de la relación núcleo-citoplasma, presencia de necrosis entre otras características, son la principal causa de muerte en caninos adultos. (9) Las neoplasias malignas representan más del 50% de los casos diagnosticados. (10,11) Las neoplasias que involucran la glándula mamaria en caninos hembra presentan frecuencias entre el 20,5 y 70,5% y tasa de mortalidad entre el 18 al 27%. (7,12)

El desarrollo de neoplasias mamarias se ha asociado a la alteración en genes involucrados en el control del ciclo celular, la proliferación celular y la reparación del material genético, entre ellos *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *STK11*, *BRIP1*, *RAD 51*, *STK11*, *p53*, *c-erB2*, *C-myc*, *BRCA1* y *BRCA2* (13,14). Existe evidencia que las variantes genéticas en los genes Breast Cáncer type 1 (*BRCA1*) y Breast Cáncer type 2 (*BRCA2*) tienen una relación estadísticamente significativa con el desarrollo de neoplasias mamarias tanto en humanos como en caninos. (14,15) Los genes

BRCA1 y *BRCA2* son supresores tumorales cuya función es la regulación de la proliferación celular, reparación del daño en la doble cadena de DNA y el mantenimiento de la estabilidad genómica. (14,16) Para el desarrollo de sus funciones, las proteínas *BRCA1* y *BRCA2*, forman complejos proteicos, con las proteínas *RAD51*, *BRPI1* y *RMN 30*. Para sus funciones biológicas, los principales dominios de unión en los genes *BRCA1* y *BRAC2* están codificados en los exones 13 y 11 respectivamente. Estos dominios de unión permiten detectar y reparar el daño a la doble cadena de DNA por recombinación homóloga. Los exones 13 y 11 en los genes *BRCA1* y *BRAC2* son los de mayor tamaño y los más conservados en los mamíferos. (17,18) Se han reportado variantes genéticas en el exón 13 del gen *BRCA1* y en el exón 11 del gen *BRCA2* con frecuencias superiores al 10%, en diferentes estudios en Brasil, Turquía, Noruega y China, que generan un daño en la estructura proteica con un efecto deletéreo en la función biológica de la proteína. (1,15,18,19) Estas variantes se han relacionado con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos. (15,20)

En la actualidad, en Colombia, más específicamente en el área metropolitana del departamento de Antioquia, no se encuentran reportes de estudios que determinen la presencia y frecuencia de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasia mamaria, ni su correlación con el diagnóstico histológico, generando una limitación epidemiológica y molecular frente a características genotípicas y fenotípicas de neoplasias mamarias en caninos en el Área Metropolitana - Antioquia, Colombia.

En el presente trabajo se formularon las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la frecuencia de las variantes genéticas c.4762 G>T p.W1567STOP en el exón 13 del gen *BRCA1* y c.2401 A>C p.K801Q, c.2488 A>G p.I830V, c.4273 A>C p.T1425P y c.4304 A>G p.K1435R ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2* en los caninos con neoplasias de glándula mamaria a estudiar?
2. ¿Existen diferencias entre las frecuencias de las variantes genéticas analizadas en este estudio, con las informadas en otras poblaciones en estudios previos?
3. ¿Existe relación entre la presencia de las variantes genéticas analizadas en el estudio y características como el tipo histológico, raza y la edad de aparición de neoplasia mamaria?

4. Justificación.

Las neoplasias de glándula mamaria (NGM) tanto en humanos como en caninos comparten características clínicas, moleculares, histológicas y epidemiológicas similares (21–27), las cuales presentan en ambas especies un desarrollo espontáneo, por lo que en consideración de lo anteriormente expuesto, los caninos han sido propuestos como modelo de estudio en la oncología, ya que permiten la translación de resultados a la especie humana. (22,28,29) Las variantes en los genes supresores tumorales, *BRCA1* y *BRCA2*, se han asociado con el desarrollo de neoplasias mamarias tanto en caninos como en humanos. (5,13) Determinar la presencia y frecuencia de variantes en estos dos genes supresores tumorales en línea germinal en NGM en caninos por primera vez en el Área Metropolitana – Antioquia, Colombia y establecer su relación con el tipo histológico, edad de aparición de neoplasia y raza, contribuirá al reporte epidemiológico de variantes genéticas en *BRCA1* y *BRCA2* en la población canina y adicionalmente, permitirá correlacionar la información genética (variantes genéticas) y las características clínico-patológicas para el cáncer de mama en caninos, y brindar herramientas para desarrollar pruebas genéticas para la detección de variantes en los genes *BRCA1* y *BRCA2* útiles en la aproximación diagnóstica de tipos histológicos específicos de neoplasias mamarias, lo cual prevé un valor clínico y pronóstico.

5. Marco teórico.

El proceso co-evolutivo entre humanos y caninos inicia con un mutualismo en funciones como alimentación, protección, caza entre otras y en los últimos siglos se ha evidenciado una nueva forma de vínculo interespecie ligado a la compañía, trabajo y diversión.(30)

En los últimos 200 a 300 años el humano ha generado a través del entrecruzamiento diferentes razas de caninos a partir ancestro común, el lobo. (8)

La generación de estas razas, a partir de un número restringido de individuos, denominados “toros”, involucra limitación de entrecruzamientos y el favorecimiento de la endogamia, lo que ha generado un cuello de botella evolutivo y la disminución de la variabilidad genética en los individuos que pertenecen a razas específicas.

(25) Tanto las características fenotípicas como las genotípicas de los toros se ven sobre representadas en los nuevos individuos, lo que incluye una predisposición genética a diferentes enfermedades, como las neoplasias (31), la diabetes mellitus (32), la displasia de codo (33), entre muchas otras.

5.1 Generalidades de las neoplasias

Las neoplasias son patologías multifactoriales producto de la alteración de procesos celulares como el control del ciclo celular, proliferación, diferenciación e interacción celular.(34) Diferentes factores se atribuyen a la pérdida del control de la proliferación celular, como los ambientales o externos – la dieta, actividad física, exposición a agentes físicos, químicos o biológicos (2,35–38) y factores endógenos o no modificables como el factor genético. (39,40) Las células con proliferación anormal pueden ser de origen histológico epitelial, mesenquimal y células redondas.

El grado de proliferación anormal de las células y su grado de diferenciación está relacionado con las neoplasias de tipo benigno o maligno. (41) Las neoplasias malignas, las cuales se denominan cáncer, tienden a crecer rápidamente, invadir los tejidos circundantes y propagarse a otras partes del cuerpo mediante un proceso llamado metástasis. (10)

En los caninos diferentes órganos y tejidos (la piel, la glándula mamaria, tracto digestivo, reproductivo, el sistema hematopoyético entre otros), presentan crecimientos neoplásicos (Ver tabla 1). Diferentes reportes indican que la piel y la glándula mamaria son los órganos más frecuentemente involucrados en los procesos neoplásicos. (7,12,42–44)

Tabla 1. Porcentaje y tasa de incidencia por cada 100.000 caninos afectados por neoplasias, discriminadas por órgano y/o sistema, encontrando que la piel y la glándula mamaria son los más afectados por esta condición patológica. (34–38,41)

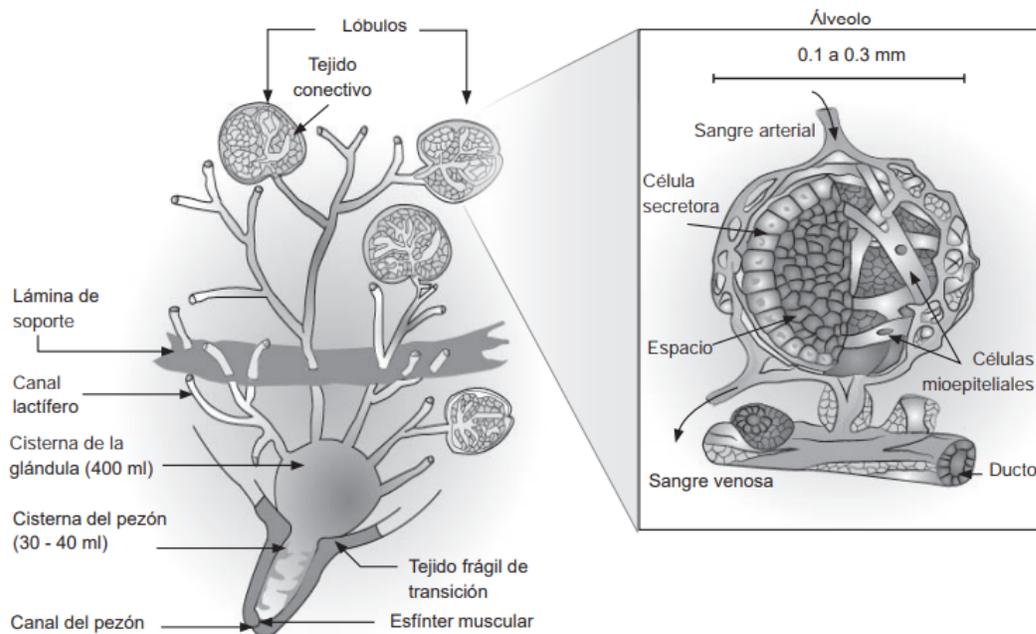
ESTUDIO	SISTEMA/ÓRGANO	PORCENTAJE
Grüntzig, K. Et al. 2018	Piel	32,29 %
	Glándula mamaria	20,53 %
	Tejidos blandos	11,90 %
	Sistema digestivo	7,49 %
	Total	72 %
Baioni, E. Et al. 2017	Glándula mamaria	49,90 %
	Piel y tejido blando	40,18 %
	Testículos	9,50 %
	Total	99,58 %
Baioni, E. et al. 2017	Piel y anexo	43 %
	Glándula mamaria	585 / 100,000
	Piel y tejido blando	461 / 100,000
	Testículos	112 / 100,000
	Ovario	40 / 100,000
Bronden 1.B. Et al. 2010	Piel y anexo	43 %
	Sistema reproductivo en hembras, incluyendo glándula mamaria	28 %
	Hematopoyético	6 %
	Sistema gastrointestinal	5 %
	Total	82 %

ESTUDIO	SISTEMA/ÓRGANO	PORCENTAJE
Merlo. Et al. 2009	Glándula mamaria	70,5 %
	Linfoma no Hodgkin's	8,4 %
	Tejido blando y conectivo	4,6 %
	Piel	3,8 %
	Total	87,3 %
Vascellari, M. et al. 2009	Glándula mamaria	56,40 %
	Piel y tejido blando	30,80 %
	Total	87,20 %
Merlo, DF. 2008	Glándula mamaria	191,8 / 100,000
	Tejido blando y conectivo	37,9 / 100,000
	Piel	26,4 / 100,000
	Linfoma no hodkin's	73,8 / 100,000

5.2 Glándula mamaria en caninos

La mama es una glándula apocrina sudorípara modificada que para el cumplimiento de su función – producción y almacenamiento de leche para la alimentación de las crías mamíferas – tiene múltiples estructuras anatómicas y componentes celulares, como lo son: conductos, lóbulos, lobulillos, cisterna, esfínteres, epitelios simples, escamoso estratificado, columnar de dos capas, su componente celular de origen epitelial - células mioepiteliales/basales y epiteliales/luminales- y su estructura de sostén, compuesto por tejido o células mesenquimales que a su vez forman tejido conectivo. (38,45,46) Las células mioepiteliales que revisten el epitelio secretor; son contráctiles por lo que su función es expulsar la leche a través de los conductos interlobulares, lactíferos, papilar hasta llegar a la cisterna del pezón. Las hembras caninas desarrollan entre cinco y seis pares de glándulas mamarias; distribuidas en el tórax, abdomen y región inguinal. (46)

Figura 1: anatomía e histología de la glándula mamaria.



Burgos Baena, Agustín. conductos del sistema secretor de la leche. 2017

5.3 Neoplasias mamarias en caninos

Los caninos son la especie doméstica en la que con mayor frecuencia se ve afectada la glándula mamaria por procesos neoplásicos. (14,19) Las neoplasias de la glándula mamaria (NGM) son la patología neoplásica más común en caninos hembras no esterilizadas y la principal causa de muerte en caninos hembra geriatras, con edades superiores a los 10 años (47), con frecuencias reportadas entre el 20,5% y el 70,5% (7,12) y mortalidades asociadas entre el 18 y 27% (12,38,48). La edad de aparición de las NGM se reporta entre los 6 y 10 años con promedio de 8 años. (9) Diferentes razas presentan predisposición genética al desarrollo de NGM, entre ellas se encuentran: los Spaniels, Poodle, Criollo, Pastor alemán, el Bóxer, Beagle, chihuahua, Dachshund, Bichon frise, Pinscher. (46,48)

Las neoplasias mamarias se caracterizan por su heterogeneidad histológica y diversidad en la presentación clínica. (49,50) Dicha variabilidad se atribuye a los componentes celulares de la glándula mamaria, los cuales son susceptibles de modificaciones estructurales dependientes de hormonas como: estrógeno (E2), progesterona (P4), prolactina (PR). (51). Estas hormonas estimulan la activación o inactivación de genes que tienen función sobre el control de ciclo y proliferación celular, generando así diferentes alteraciones o modificaciones en el tejido mamario (40). Las NGM se clasifican en benignas o malignas según características como: estructura, proliferación, invasión a tejidos adyacentes, tamaño celular, nucléolo, cromatina-DNA, mitosis, relación núcleo citoplasma. (52) En particular las neoplasias malignas presentan poca diferenciación celular, son infiltrantes, presentan rápido crecimiento, tienen capacidad metastásica, pleomorfismo celular,

nucléolo grande, numerosas mitosis y son las más comunes, estas representan entre el 54% y el 95% del total de las NGM. (15)

5.4 Clasificación de las neoplasias mamarias en caninos

Las NGM se clasifican según su tipo histológico y a través del sistema TNM: tamaño de neoplasia, compromiso de linfonódulo y presencia de metástasis. Debido a dicha heterogeneidad histológica la clasificación histopatológica ha sido constantemente modificada, iniciando con dos clasificaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1975 y 1999, y una última realizada por Goldschmidt et al., 2011 (11) a través de American College of Veterinary Pathologist's Oncology Committee y avalada por la World Small Animal Veterinary Association para neoplasias mamarias caninas, la cual reúne las características de la clasificación propuesta por la OMS en 1999 anexando 5 nuevos subtipos histológicos: el carcinoma micropapilar invasor, el comedocarcinoma, el carcinoma ductal, el carcinoma papilar intraductal y el carcinoma y mioepitelioma maligno (49), lo que permite nombrar las NGM de forma uniforme, según el tipo histológico comprometido y según sus características clasificarlas según el grado histológico.

Tabla 2.

Clasificación histológica de las neoplasias mamarias en caninos reportada por Goldschmidt, M. Et al. 2011

<p>Proposed Histologic Classification 2010</p> <p>I: Malignant Epithelial Neoplasms</p> <p>Carcinoma-in situ</p> <p>Carcinoma-simple</p> <ol style="list-style-type: none"> Tubular Tubulopapillary Cystic-papillary Cribriform <p>Carcinoma-micropapillary invasive</p> <p>Carcinoma-solid</p> <p>Comedocarcinoma</p> <p>Carcinoma-anaplastic</p> <p>Carcinoma arising in a complex adenoma/mixed tumor</p> <p>--The benign counterpart is still detectable in the section.</p> <p>Carcinoma-complex type</p> <p>--The epithelial component is malignant, and the myoepithelium is benign.</p> <p>Carcinoma and malignant myoepithelioma</p> <p>--The epithelial and myoepithelial components are malignant.</p> <p>Carcinoma-mixed type</p> <p>--The epithelial component is malignant the myoepithelial mesenchymal component is benign; and the mesenchymal component is cartilage or bone.</p> <p>Ductal carcinoma-malignant counterpart of ductal adenoma</p> <p>Intraductal papillary carcinoma-malignant counterpart of intraductal papillary adenoma.</p>	<p>2: Malignant Epithelial Neoplasms—Special Types</p> <p>Squamous cell carcinoma</p> <p>Adenosquamous carcinoma</p> <p>Mucinous carcinoma</p> <p>Lipid-rich (secretory) carcinoma</p> <p>Spindle cell carcinoma</p> <p> Malignant myoepithelioma</p> <p> Squamous cell carcinoma</p> <p> Carcinoma—spindle cell variant</p> <p>Inflammatory carcinoma (see Inflammatory Carcinoma section)</p> <p>3: Malignant Mesenchymal Neoplasms---Sarcomas</p> <p>Osteosarcoma</p> <p>Chondrosarcoma</p> <p>Fibrosarcoma</p> <p>Hemangiosarcoma</p> <p>Other sarcomas</p> <p>4: Carcinosarcoma—malignant Mixed Mammary Tumor</p> <p>5: Benign Neoplasms</p> <p>Adenoma- simple</p> <p>Intraductal papillary adenoma (duct papilloma)</p> <p>Ductal adenoma (basaloid adenoma)</p> <p> With squamous differentiation (keratohyaline granules)</p> <p>Fibroadenoma</p> <p>Myoepithelioma</p> <p>Complex adenoma (adenomyoepithelioma)</p> <p>Benign mixed tumor</p>
--	--

5.5 Bases moleculares en el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos

La carcinogénesis de las neoplasias mamarias es un proceso multifactorial caracterizado por la activación o inactivación de genes relacionados con el control de la división y proliferación celular, supresión tumoral, control de muerte celular programada, estabilidad genómica, reparación del daño celular y del DNA y por

factores epigenéticos. En dichos procesos participan agentes ambientales, químicos, físicos, hormonales, nutricionales o dietarios y también factores endógenos como lo son las variantes genéticas, que alteran o modifican la función de dichos genes. Dicha carcinogénesis comprende tres etapas conocidas como: la iniciación, caracterizado por la exposición de agentes carcinogénicos o expresión de alteraciones genéticas heredadas que conllevan a la formación de clones celulares con inestabilidades satelitales, micro satelitales, alteraciones cromosómicas, y con expresión génica alterada. Una segunda etapa denominada promoción, en la que se genera la replicación de dichos clones celulares, y por último la progresión, en la que de forma principal se generan las lesiones preneoplásicas que se convierten en lesiones malignas, generando procesos metastásicos. (34,40) Según Weinberg R. y Hanahan D., en su texto *Hallmark of the cancer: the next generation*, dicha carcinogénesis involucra otros factores como: mecanismos de sostenimiento para las señales de proliferación y evasión ante procesos de supresión tumoral, inmortalización, angiogénesis entre otros, constituyendo así 6 marcas o procesos carcinogénicos los cuales son: sostenimiento de la señal proliferativa, evasión de factores supresores, activación de invasión y metástasis, inmortalidad y proliferación, angiogénesis y resistencia ante la muerte celular.(53)

Entre el 80 y el 85% de las neoplasias mamarias en caninos se presentan de forma esporádica (37), teniendo como base etiológica la acción de hormonas esteroidales, como el estrógeno y la progesterona, las cuales de forma natural están involucradas en el proceso de desarrollo mamario, estimulando el crecimiento ductual , lóbulo-

alveolar y la hiperplasia de estructuras secretoras y mioepiteliales, pero a su vez promueven el desarrollo tumoral (40) Los estrógenos endógenos desempeñan una función fundamental en el desarrollo del cáncer de mama y son considerados el principal factor de riesgo para esta enfermedad. (52,54) Los estrógenos hacen parte de la súper familia de hormonas esteroidales, las cuales tienen como precursor el colesterol y son sintetizadas en tejidos como: ovario, tejido adiposo, placenta, y la misma glándula mamaria, (51) Los estrógenos actúan como agentes de iniciación y promoción de carcinogénesis mamaria, esto por su capacidad al estar activos (unión ligando receptor y translocación nuclear) de inducir la transcripción de varios proto-oncogenes que inician una ganancia de función y se convierten en oncogenes, como los pertenecientes a la familia *myc*, entre ellos *c-myc*, promoviendo la proliferación celular y posibilitando función oncogénica de estos genes (efecto genómico de los estrógenos). (55,56) El desarrollo de la neoplasia mamaria dependerá del tiempo de exposición hormonal. (46) En la actualidad se han descrito otras vías de desarrollo de cáncer de mama generadas por los estrógenos, denominadas no genómicas, como la señalización bidireccional entre los receptores de estrógenos alpha (ERa) y uno de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFRs), ya que el EGFR estimula la síntesis de DNA y la transcripción génica para activación de RE nucleares de forma independiente de estradiol, es decir fosforilación de la serina 118 de los dominios A/B de ER, que permite la transactivación de genes relacionados con RE. (57) Otro factor de riesgo, el cual está relacionado con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos de forma hereditaria, es el factor endógeno, en el cual se consideran variantes genéticas, línea germinal, en genes involucrados en la carcinogénesis mamaria, radicales

libres de oxígeno o de nitrógeno producto de metabolismo celular que alteran o generan daños genéticos, y a los cuales se les atribuyen entre el 5 y el 10% de la presentación de NGM en caninos. (5,13)

Diferentes genes han sido relacionados con el desarrollo de neoplasias mamarias debido a sus funciones dentro del proceso de reparación de DNA, control de ciclo celular y a su intervención en mecanismos o procesos celulares como apoptosis, proliferación, diferenciación, supervivencia celular, migración celular, los cuales resultan relevantes en el desarrollo de una neoplasia. Entre estos genes se encuentran: *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *STK11*, *BRIP1*, *RAD 51*, *STK11*, p53, c-erB2, C-myc, *BRCA1* y *BRCA2* (14,58), pero sólo *BRCA1* y *BRCA2* presentan evidencia estadísticamente significativa en su asociación con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos. (1,14,15) Los genes *BRCA1* y *BRCA2* son supresores tumorales y su función es central para la regulación de la proliferación celular, control del ciclo celular y el mantenimiento de la estabilidad genómica a través del reconocimiento y reparación del daño en la doble cadena del DNA por recombinación homóloga. (17) Para sus funciones biológicas, los genes *BRCA1* y *BRCA2* tienen dominios de unión, localizados principalmente en los exones 13 y 11 respectivamente, con los cuales forman complejos con proteínas como BRIP1 y RAD51.(15,59) Las variantes génicas que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama pueden dividirse en tres grupos, alto, moderado y bajo. Las variantes de alto y moderado riesgo son raras (quiere decir que la frecuencia del alelo menor está por debajo del 1%) y confieren un riesgo de más del 50%. (5)

En los genes *BRCA1* y *BRCA2* se han reportado variantes que alteran estructural y funcionalmente la proteína, lo cual se ha relacionado con la pérdida de las funciones

biológicas de estos genes supresores tumorales, por lo que se asocian al desarrollo de neoplasias, incluyendo las mamarias. Estas variantes genéticas explican entre un 5-10% de la presentación de todos los casos en general y hasta un 60% en los casos familiares, refiriéndose a los humanos, esto debido a la inestabilidad genómica que se genera en las células cuando se presentan estas variantes. (1,15,16,18–20,60)

El gen *BRCA1* está ubicado en el cromosoma 9, conformado por 24 exones, presentando dos dominios, uno denominado RING, ubicado en el exón 2, el cual funciona como un E3 ubiquitina ligasa, y un dominio amino terminal denominado BRCT en los exones 13-24, en dicho dominio se da la unión a fosfoproteínas que participan en el proceso de reparación de DNA, esto principalmente en los exones 11 – 13, adicional son los mas conervados en mamiferos. (21,23) Estudios cristalográficos de la estructura de la proteína BRCA1 humanos muestran que las mutaciones en *BRCA1* asociadas con tumores, afectarían a la estabilidad o conformación del dominio BRCT o alterarían el dominio de dimerización. (17,20)

El gen *BRCA2*, ubicado en el cromosoma 25, con 63402 nucleótidos, conformado por 27 exones, entre ellos el exón 11, el cual es el más grande en todo el gen, presenta 8 repeticiones de dominio de unión, llamadas BRC, (BRC 1 AL 8), altamente conservadas en los mamíferos, en los cuales, principalmente en el BRC3 y BRC4, se llevan a cabo procesos como: la unión y modulación de la actividad de RAD51, proteína involucrada junto con la proteína BRCA2 en la reparación del DNA por la vía de recombinación homóloga en roturas de doble hebra, manteniendo así la integridad del material genético. (16–18,65)

En los genes *BRCA1* y *BRCA2* se han detectado variantes genéticas en regiones codificantes y no codificantes que generan daño estructural y funcional en las proteínas BRCA1 y BRCA2. Diferentes autores han reportado variantes genéticas estableciendo características como: región afectada (codificante), frecuencia, predicción de daño proteico según algoritmos, entre otras. (14,15,19,66–68) (Tabla 2). En los dominios repetitivos BRC del exón 11 del gen *BRCA2*, se han reportado variantes genéticas con frecuencias superiores al 10%, y que generan un posible daño a la proteína, entre estas c.2401 A>C p.K801Q, reportada por autores como Maués y col 2018 y Borge et al 2017, con una frecuencia del 45.5% en razas como: Poodle, Mestizo, Boxer, English Springer Spaniel, Bernes de la montaña, Cavalier King Charles Spaniel, SS: Shetland Sheepdog, y que según programas como PolyPhen-2 y PROVEAN genera un posible daño, sin embargo según MutPred2 y SNPs&GO no genera daño deletéreo a la proteína BRCA2. Las variantes c.2488 A>G p.I830V, c.4273 A>C p.T1425P reportadas por Maués T. Et al. 2018 en Brasil con frecuencia del 10.4%, se identificaron en razas como Poodle, Mestizo, Daschund, Yorkshire Terrier y Shih Tzu, Chihuahua y respecto a la variante genética c.4273 A>C p.T1425P esta según MutPred2, SNPs&GO, PolyPhen-2 y PROVEAN genera daño deletéreo a la proteína, y en estudios realizados por Ochiai O. Et al. 2015 en 236 caninos con neoplasias mamarias de 5 diferentes razas, según su ensayo two-hybrid assay, esta variante genética en condición homocigota disminuye o altera la unión con la proteína RAD51. Los autores antes mencionados (Ochiai O. Et al. 2015) bajo el mismo ensayo analizaron la posible alteración en la unión proteica BRCA2 y RAD51 en presencia de la variante c.4304 A>G p.K1435R, detectando que no hay disminución o alteración de dicha unión según el

experimento. Esta variante genética ha sido detectada con altas frecuencias, aproximadamente del 70.2% por diferentes autores como en la mayoría de las razas antes mencionadas, en especial en los Poodle, en los cuales se ha detectado, según Ochiai O. Et al.2015 y Maués 2018 en sus estudios, aproximadamente en el 50% de los individuos de esta raza. (19,66)

En el gen *BRCA1*, se han detectado variantes genéticas tanto en regiones intrónicas como en exones, (ver tabla 2), sin reporte de frecuencias, entre estas, la variante c.4762 G>T p.W1567STOP, única identificada en una región codificante, en el exón 13, y que genera un codón de parada. Esta variante solo ha sido reportada por Hengbin. Et al. 2016, y no presenta reporte de frecuencia, presencia en razas específicas u otros análisis como efecto en la proteína según algoritmos de predicción. (67)

Tabla 3: Listado de variantes genéticas reportadas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en regiones codificantes en caninos con neoplasias mamarias.

AUTOR	AÑO	GEN	EXÓN	MAF	SNP	POSICIÓN SNP	A.A CAMBIO	POSICIÓN CAMBIO A.A	FRECUENCIA	% FRECUENCIA
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	G	A>G	115	Asn/Asp	39	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	G	A>C	377	Pro/Ala	126	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	G	A>G	598	Ile/Val	200	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	A	C>A	680	Thr/Asn	227	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	A	C>A	797	Thr/Asn	266	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	C	T>C	986	Lys/Arg	805	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	C	G>C	1632	Gln/His	544	N/R	N/A
Maués. Et al.	2017	BRCA 2	11	A	G>A	1927	Glu/Lys	643	2/48	4,16%
Maués. Et al.	2017	BRCA 2	11	G	A>G	2005	Asn/Asp	669	2/48	4,16%
Hsu, W.-L. Et al. . O. Ozmen. Et al.	2009 2017	BRCA 2	11	C	A>C	2383	Thr/Pro	795	1/11	9%
Maués. Et al. K.S. BORGE. Et al.	2017 2011 2009	BRCA 2	11	C	A>C	2401	Lys/Gln	801	25/55	45,5%%
Maués. Et al.	2017	BRCA 2	11	G	A>G	2488	Ile/Val	830	5/48	10,40%

AUTOR	AÑO	GEN	EXÓN	MAF	SNP	POSICIÓN SNP	A.A CAMBIO	POSICIÓN CAMBIO A.A	FRECUENCIA	% FRECUENCIA
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	G	A>G	3838	Thr/Ala	1280	N/R	N/A
hengbin. Et al.	2016	BRCA 1	11	A	G>A	4006	Val/Ile	1336	N/R	N/A
Hsu, W.-L. Et al.	2009	BRCA 2	11	C	T>C	4034	Ile/Thr	1345	N/R	N/A
Maués. Et al.	2017	BRCA 2	11	C	A>C	4273	Thr/Pro	1425	5/47	10,60%
Maués. Et al. O. Ozmen. Et al. Hsu, W.-L. Et al.	2017 2017 2009	BRCA 2	11	G	A>G	4304	Lys/Arg	1435	33/47	70,20%
hengbin. Et al.	2016	BRCA 1	13	T	G>T	4702	Trp/Stop	1567	N/R	N/A
hengbin. Et al.	2016	BRCA 1	14	C	G>C	4765	Glu/Gln	1589	N/R	N/A
weidong. Et al.	2015	BRCA 1	23	A	G>A	63449	Ala/Thr	1851	N/R	N/A
S. O. Enginler. Et al.	2014	BRCA 2	27	A	A/G	7735475	Ser/Asp	3322	N/R	N/A
S. O. Enginler. Et al.	2014	BRCA 2	27	n/a	AAA/-	7735654	Met/Iso	3331-3332	N/R	N/A
S. O. Enginler. Et al.	2014	BRCA 2	24	G	A/G	7747634	Lys/Arg	3103	N/R	N/A
K.S. BORGE. Et al.	2011	BRCA 2	24	G	A>G	10732072	Lys/Arg	3103	N/R	N/A
K.S. BORGE. Et al.	2011	BRCA 2	5	C	T>C	10771796	His/Arg	143	N/R	N/A

En la actualidad, se han reportado variantes genéticas ubicadas en regiones codificantes de los genes *BRCA1* y *BRCA2* que se han relacionado con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos, sin embargo en Colombia, más específicamente en el área metropolitana del departamento de Antioquia, no se encuentran reportes de estudios que determinen la presencia y frecuencia de

variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasia mamaria, ni su correlación con características físico clínicas como la raza, edad de aparición de neoplasia, estado reproductivo, tipo y grado histológico generando una limitación epidemiológica y molecular frente a características genotípicas y fenotípicas de neoplasias mamarias en caninos en el Área Metropolitana - Antioquia, Colombia

6. Objetivos

6.1 General

Determinar la correlación entre la presencia de las variantes genéticas c.4762 G>T p.W1567STOP en el exón 13 del gen *BRCA1* y c.2401 A>C p.K801Q, c.2488 A>G p.I830V, c.4273 A>C p.T1425P y c.4304 A>G p.K1435R en el exón 11 del gen *BRCA2* y las características clínico patológicas en caninos con neoplasias mamarias en el Área metropolitana, Antioquia.

6.2 Específicos

6.2.1. Identificar las características físicas y clínicas de los caninos con neoplasias mamarias del Área metropolitana, Antioquia – Colombia, participantes en el estudio.

6.2.2. Caracterizar y establecer la frecuencia de la variante genética c.4762 G>T p.W1567STOP en el exón 13 del gen *BRCA1* y las variantes genéticas c.2401 A>C p.K801Q, c.2488 A>G p.I830V, c.4273 A>C p.T1425P y c.4304 A>G p.K1435R en el exón 11 del gen *BRCA2* en caninos con neoplasia mamarios del Área metropolitana – Antioquia, Colombia.

6.2.3. Clasificar histopatológicamente las neoplasias mamarias evaluadas en los caninos del Área metropolitana – Antioquia, Colombia.

6.2.4. Correlacionar las características clínico patológicas con las variantes genéticas analizadas y sus haplotipos en caninos con neoplasias mamarias del Área metropolitana – Antioquia, Colombia.

7. Materiales y métodos

7.1. Tipo de estudio.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal. Las muestras de tejido mamario neoplásico de caninos, muestra sanguínea venosa, variables clínicas como: edad, raza, sexo, condición reproductiva, edad esterilización, edad de aparición y retiro de neoplasia, se recolectaron entre noviembre del año 2018 y diciembre del 2019 en varias instituciones médicas veterinarias del Área metropolitana – Antioquia, Colombia.

Cada propietario firmó un documento de consentimiento informado, previamente aprobado por el comité de Ética de investigación de la Corporación Universitaria Remington en el que se explican los objetivos del estudio, los beneficios y riesgos potenciales, así mismo se explica que la participación es voluntaria, que los investigadores resolverán cualquier duda durante el desarrollo del estudio y que la no participación no tendrá ningún perjuicio. La información de este estudio se recolectó tanto de fuente primaria, con el diligenciamiento de una encuesta y adicionalmente de fuente secundaria al analizar el tejido mamario neoplásico y el DNA extraído de la muestra sanguínea venosa. En todos los momentos del desarrollo del estudio se dio cumplimiento al Estatuto Nacional de Protección de los animales (Ley 84 de 1989)

7.2. Población de estudio.

El estudio incluyó caninos con diagnóstico histopatológico de neoplasia mamaria. Las muestras de tejido mamario neoplásico de los pacientes participantes en la

investigación se obtuvieron secundarias a mastectomías parciales o radicales indicadas por la institución médico veterinaria tratante para análisis histopatológico. Las muestras de sangre venosa para el análisis genético de los exones 13 y 11 de los genes *BRCA1* y *BRCA2* se colectaron por venopunción cefálica, 1 mililitro en tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En este estudio todos los individuos fueron hembras, de cualquier raza, edad o condición reproductiva.

7.2.1. Criterios de inclusión.

Caninos con neoplasias mamaria confirmada por estudio histopatológico, sin tratamiento antineoplásico por otros tipos de neoplasia.

7.2.2. Criterios de exclusión.

Pacientes cuyos tejidos neoplásicos no correspondan a neoplasias mamarias.

7.3. Muestra.

Con un muestreo a conveniencia, que consideró como tamaño muestral todos los tejidos mamaros neoplásicos y muestras sanguíneas de caninos recolectadas durante noviembre de 2018 y diciembre del 2019, se lograron obtener y estudiar 75 muestras de tejido mamario neoplásico obtenidas por resección quirúrgica en mastectomía parcial o radical establecido por rutina y/o tratamiento del centro médico tratante. Los tejidos fueron fijados con formol buferado con fosfatos al 10%, durante 6 a 72 horas, con promedio de 42 horas, preservados con etanol al 70% y a 4°C, según el protocolo de O. Ozmen Et al. 2017, y enviados a un laboratorio de patología veterinaria externo no vinculado con la investigación para su diagnóstico

histopatológico, todos los tejidos analizados fueron confirmados como neoplasias mamarias. Las 75 muestras sanguíneas de los caninos participantes en la investigación se recolectaron por venopunción cefálica con previa antisepsia con alcohol al 70% del área a puncionar y sistema vacutainer. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en tubo estéril con EDTA, y almacenadas en refrigeración a 4°C para la posterior extracción de DNA.

7.4. Extracción de DNA.

La extracción del DNA se realizó a partir de las muestras de sangre venosa, utilizando el kit comercial Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Bioland Scientific LLC), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó el DNA de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la calidad e integridad del DNA. A partir de cada muestra se hizo una alícuota de 50 µl y se almacenó a 4°C para facilitar la manipulación y evitar la degradación por congelación y descongelación. El resto de DNA (50 µl) de cada muestra se preservó a -20°C

Tabla 4: Listado de variantes genéticas a analizar.

Se listan las variantes genéticas reportadas en la literatura que presentan una frecuencia superior al 10% ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2* que generan un efecto deletéreo según los algoritmos de predicción y en el exón 13 del gen *BRCA1* que genera un condón de parada.

GEN	EXÓN	MAF	SNP	POSICIÓN SNP	A.A CAMBIO	POSICIÓN CAMBIO A.A	% FRECUENCIA
<i>BRCA 2</i>	11	C	A>C	2401	Lys/Gln	801	45,5%
<i>BRCA 2</i>	11	G	A>G	2488	Ile/Val	830	10,4%
<i>BRCA 2</i>	11	C	A>C	4273	Thr/Pro	1425	10,6%
<i>BRCA 2</i>	11	G	A>G	4304	Lys/Arg	1435	70,2%
<i>BRCA 1</i>	13	T	G>T	4702	Trp/Stop	1567	N/A

7.5. Amplificación de las regiones que contienen las variantes genéticas a estudiar.

El DNA extraído de las muestras sanguíneas se empleó para amplificar las regiones en el exón 13 y 11 de los genes *BRCA1* y *BRCA2* respectivamente que contienen las variantes genéticas a analizar, empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador (Thermo Fisher Scientific) utilizando para esto primers específicos para cada región.

Para la amplificación de las variantes genéticas de estudio ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2* se diseñaron los primers de *novo* (sintetizados a través de la compañía SURGENOMA SAS), empleando para esto un par de primers informados previamente en la literatura (Maues T. Et al. 2018, se obtuvo la secuencia de nucleótidos del exón 11 del gen *BRCA2*, en la cual se flanquearon las regiones, dos en total, que contenían las 4 variantes genéticas a detectar, en el programa Primers3plus® dicho flanqueo fue empleado para el diseño de los primers, los cuales según el análisis de secuencia (BLAST) realizado no presentaron otros sitios

de hibridización aparte del deseado. Para la amplificación de la variante W1567Stop G>T ubicada en el exón 13 del gen *BRCA1*, los primers y su verificación, se sintetizaron de *novo* bajo la misma metodología empleada para las variantes del exón 11 del gen *BRCA2*, utilizando los primers informados en la literatura por Hengbin. Et al. 2016. (Tabla 4).

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados en la amplificación de las regiones genéticas que contienen las variantes genéticas analizadas y el tamaño obtenido en pares de bases (pb) del fragmento amplificado por PCR.

Gen	Exón	Variante	Forward	Reverse	Tamaño - pb
<i>BRCA1</i>	13	p.W1567STOP	5' TTTGGCCGCACAGGAAGTAT3'	5' ACAGAAGTGTTCCTCCCATCA'3	302
<i>BRCA2</i>	11	p.K801Q - p.I830V	5' TGGGAAAAGTTCTTCAGAGTTTGG'3	5' AGGGATTCTCCATCAAGCCT'3	327
<i>BRCA2</i>	11	p.T1425P - p.K1435R	5' TCTGTCCATTTTGGATTAAGGAGAC'3	5' ACCTGTTTGGGAAGTTATGAAAGCTG'3	203

El cóctel de las reacciones de la PCR se efectuaron en un volumen final de 50 µl que contenía 100 ng de ADN genómico por µl, empleando un total de 3 µl, Taq polimerasa 2x MIX (nombre comercial) empleando 25 µl, 5 µl de cada primer de concentración 1X, y 12 µl de agua ultra pura sin contaminantes.

Los ciclos que amplifican las regiones que contienen las variantes genéticas a analizar en el Exón 11 K801Q - I830V, Exón 11 K1435R – T1425P, y exón 13 W1567Stop fueron: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; 59°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos y por último, una extensión final a 72°C por 10 min. Ver tabla 5.

Tabla 6: Condiciones de la PCR para la amplificación de las regiones que contienen las variantes genéticas analizadas.

PROCESO	FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	Desnaturalización	95 ° C	5 minutos
Amplificación 36 ciclos	Desnaturalización	95 ° C	30 segundos
	Alineamiento	59 ° C	30 segundos
	Elongación	72 ° C	30 segundos
Amplificación final	Elongación	72 ° C	10 minutos

Posteriormente, los productos amplificados por PCR se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y coloreados con 2 µl de red gel para determinar el tamaño y calidad del fragmento amplificado (figura 1). Los productos amplificados se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar el secuenciamiento.

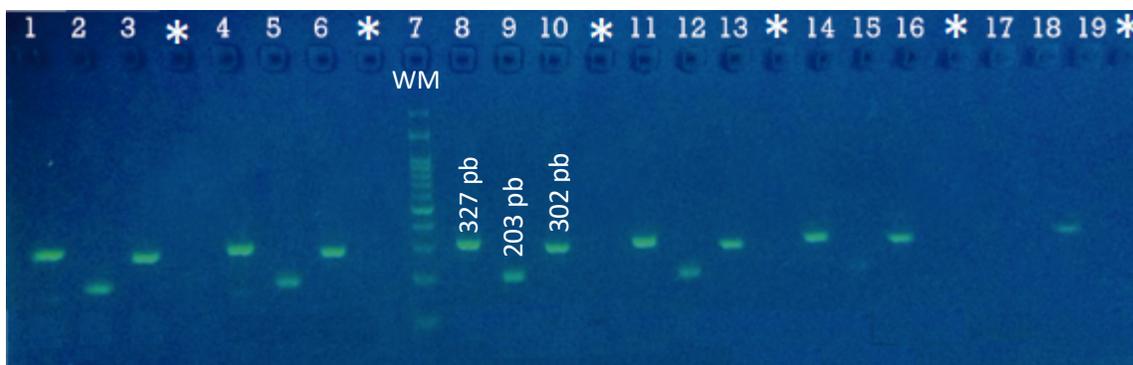


Figura 3: Productos amplificados por PCR para cada uno de los genes evaluados. Los carriles 1,4,8,11,14,17 corresponden a la amplificación de la región que contiene las variantes K801Q - I830V en el exón 11 del gen *BRCA2* en gradiente de temperatura entre 55 °c y 65°c. Los carriles 2,5,9,12,15,18 corresponden a la amplificación de la región que contiene las variantes K1435R – T1425P en el exón 11 del gen *BRCA2* en gradiente de temperatura entre 55 °c y 65°c. Los carriles 3,6,10,13,16,19 corresponden a la amplificación de la región que contiene la

variante W1567STOP en el exón 13 del gen *BRCA1* en gradiente de temperatura entre 55 °c y 65°c. El carril 7 corresponde al marcador de peso y el carril denominado * se uso para separación entre carriles.

7.6. Secuenciamiento.

Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambas cadenas con los mismos primers utilizados en la PCR, previa purificación para retirar el exceso de nucleótidos y primers, utilizando un Kit de purificación de Bioland, siguiendo las indicaciones del fabricante y verificando la integridad del DNA amplificado en un gel de agarosa al 2%. Luego se enviaron todas las muestras a Macrogen (Korea) para su secuenciamiento por la metodología SANGER. Posteriormente, se analizó detalladamente la calidad de cada uno de los cromatogramas de las muestras analizadas en el programa Sequence scanner software 2.0®, así como las puntuaciones Phred asignadas a cada base, y la presencia de dobles picos, para realizar la edición manual de las secuencias (“forward” y “reverse”) por medio de la comparación de cada una con su secuencia complementaria y los valores Phred de ambas.

7.7. Análisis de datos.

La detección de las variantes genéticas en las regiones amplificadas del exón 11 del gen *BRCA2* y la variante genética en el exón 13 del gen *BRCA1*, se realizaron en los cromatogramas obtenidos del secuenciamiento, los cuales se analizaron de forma manual, directa, analizando la calidad de cada uno de los cromatogramas

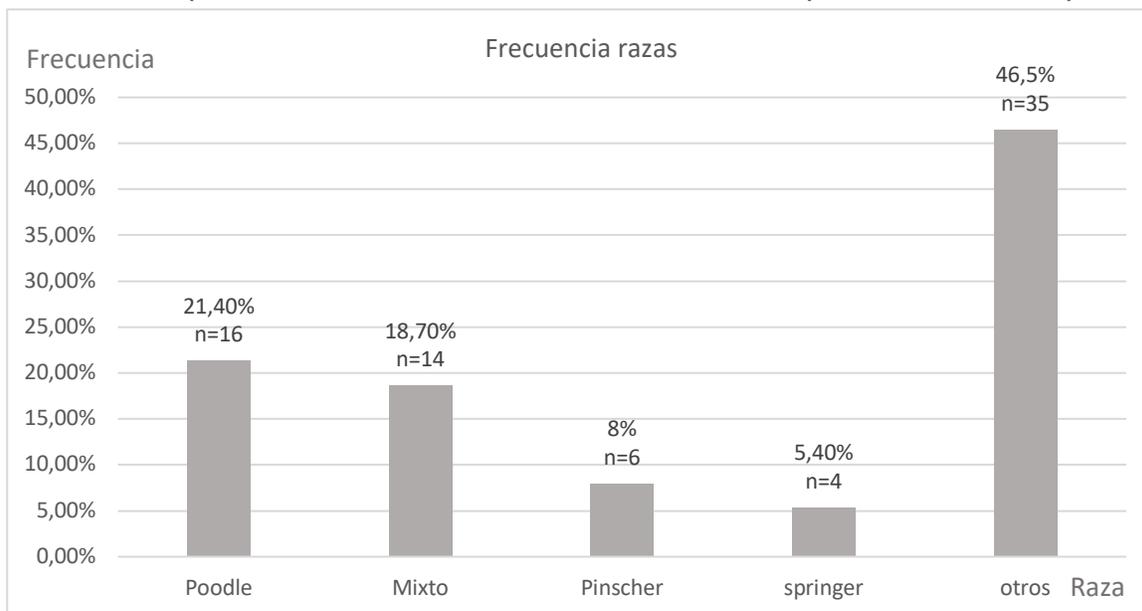
mediante los valores Phred asignados a cada base nitrogenada en el programa Sequence scanner software 2.0® y comparando la secuencia obtenida con el genoma de referencia para el canino reportado en el 2011 por la Universidad California Santa Cruz (UCSC) en el Genome Browser (GCA_000002285.2)

Todos los resultados obtenidos se tabularon en tablas con el programa Excel®, se operacionalizaron las variables y para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 23 (IBM Corp.), determinando así, la estadística descriptiva para las variables con naturaleza cuantitativa y la distribución de frecuencias para las variables cualitativas. Para el análisis bivariado se determinó el tipo de estudio estadístico (paramétrico – no paramétrico) a aplicar bajo la prueba Kolmogorv – Smirnov y según el tipo de variable se realizaron pruebas como: Chi² – Fisher para variables cualitativas, regresión lineal simple para variables cuantitativas y para el análisis de variables cuantitativas en conjunto con cualitativas se realizaron pruebas como: t - student o u de Mann Whitney y Anovas. Para la detección de haplotipos, su frecuencia y correlación con variables como: tipo y grado histológico, raza, edad de aparición de neoplasia, se utilizó el programa estadístico R, modulo haplo-stat.

8. Resultados.

8.1. Caracterización de la población de estudio.

Se analizaron 75 muestras de tejido neoplásico mamario y de sangre venosa de pacientes caninos hembras de 21 razas diferentes, entre las más comunes se encontraron los Poodles 21,3% (16/75), mixtos 18,7% (14/5) y Pinscher 8% (6/75). (ver gráfica 1) con diagnóstico clínico de neoplasia mamaria provenientes de diferentes centros médicos veterinarios del Área metropolitana – Antioquia. El 54,7% de la población estaba esterilizada antes de la aparición de la neoplasia y



presentó una mediana de edad de 10 años (rango 8 -11), y una mediana de edad de aparición de las neoplasias de 8,0 años (rango 6,5– 10).

Figura 4: Frecuencia de razas en la población de estudio.

8.2. Clasificación histopatológica de las muestras neoplásicas.

De las 75 muestras de neoplasias mamarias, el 5,4% (4/75) fueron neoplasias de comportamiento benigno, clasificadas histopatológicamente como adenomas mamarios. El 94,6% (71/75) fueron identificadas como neoplasias malignas (cáncer) representadas en total por 7 tipos histológicos diferentes, de los cuales, los más frecuentes fueron: Carcinoma mixto mamario 36% (27/75), Carcinoma mamario sólido simple 18,7% (14/75) y el Carcinoma mamario tubulopapilar 17,3% (13/75) (ver figura 3) Respecto grado histológico en las neoplasias malignas, el más frecuentemente detectado fue el grado 2 con un 52.1% (37/71) y para el grado 1 y 3, ambos se presentaron en el 23,9% (17/71) en los tejidos.

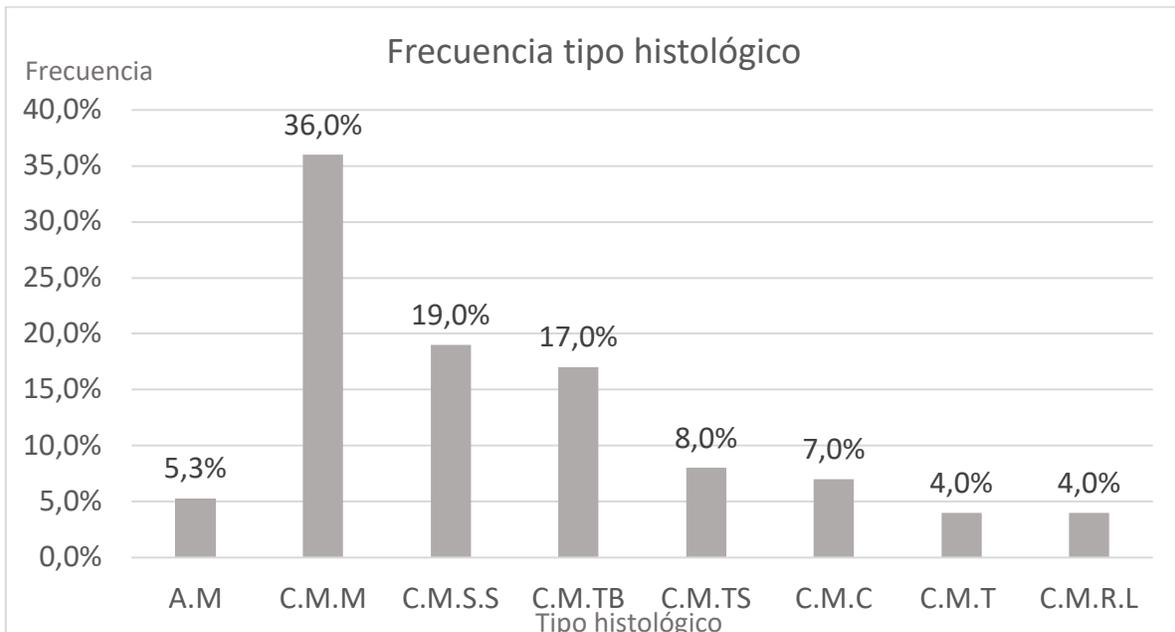


Figura 5: frecuencia tipos histológicos en la población. A.M: Adenoma mamario, C.M.M: carcinoma mixto mamario, C.M.S.S: carcinoma mamario sólido simple, C.M.TB: carcinoma mamario tubulopapilar, C.M.TS: carcinoma mamario tubular

simple, C.M.C: carcinoma mamario complejo, C.M.T: carcinoma mamario tubular, C.M.R.L: carcinoma mamario rico en lípidos.

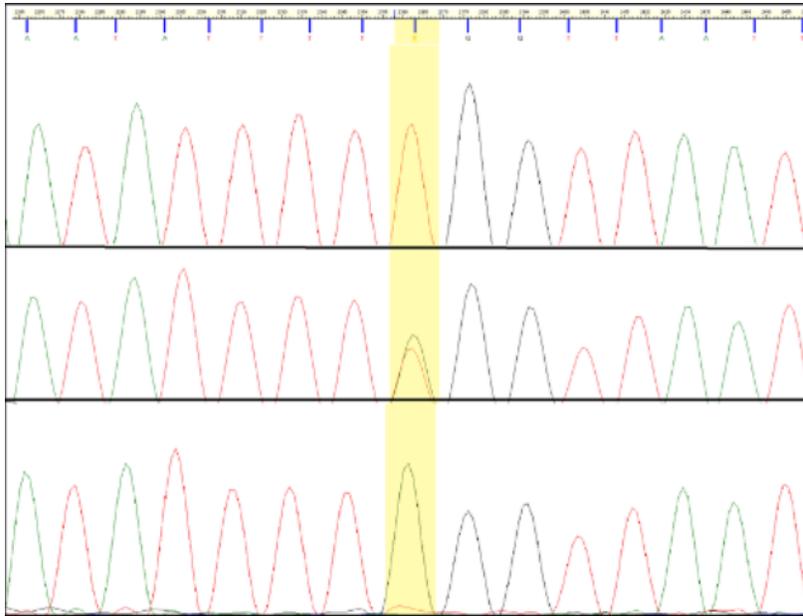
8.3. Frecuencia de variantes genéticas.

La variante genética W1567Stop G>T ubicada en el exón 13 del gen *BRCA1* no se detectó en ninguna de las muestras analizadas. El 94.6% (71/75) de la población presentó al menos una de las cuatro variantes genéticas evaluadas en el exón 11 del gen *BRCA2*. Las frecuencias de las variantes genéticas detectadas fueron: K1435R A>G 65,3% (49/75), K801Q A>C 52% (39/75), T1425P A>C 13,3% (10/75), y I830V A>G 5,3% (4/75).

Tabla 7: frecuencia de variantes genéticas en el exón 11 del gen *BRCA2* en condición homocigota y heterocigota, en 75 muestras de caninos con NGM

SNP	Heterocigota	Homocigota	Total	n
				%
c.2401 A>C (p.K801Q)	32 42,6	7 9,3	39 51,9	
c.2488 A>G (p.I830V)	4 5,3	.	4 5,3	
c.4273 A>C (p.T1425P)	10 13,3	.	10 13,3	
c. 4304 A>G (p.K1435R)	39 52	10 13,3	49 65,3	

Variante c.2401 A>C (p.K801Q)

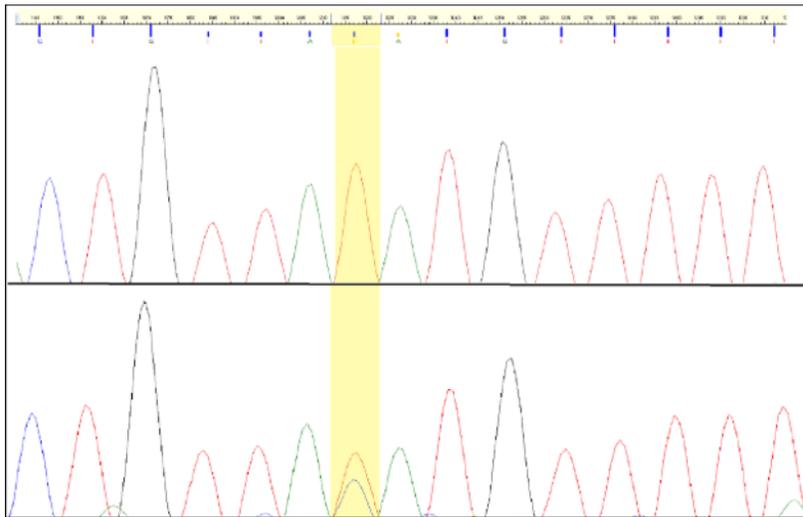


Sin variante genética:
c.2401 A/A

Con variante genética
c.2401 A/C

Con variante genética
c.2401 C/C

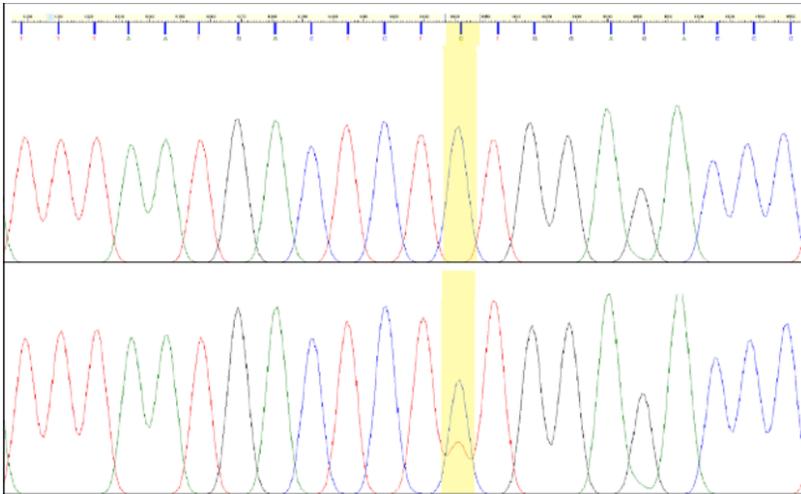
Variante c.2488 A>G (p.I830V)



Sin variante genética:
c.2488 A/A

Con variante genética:
c.2488 A/G

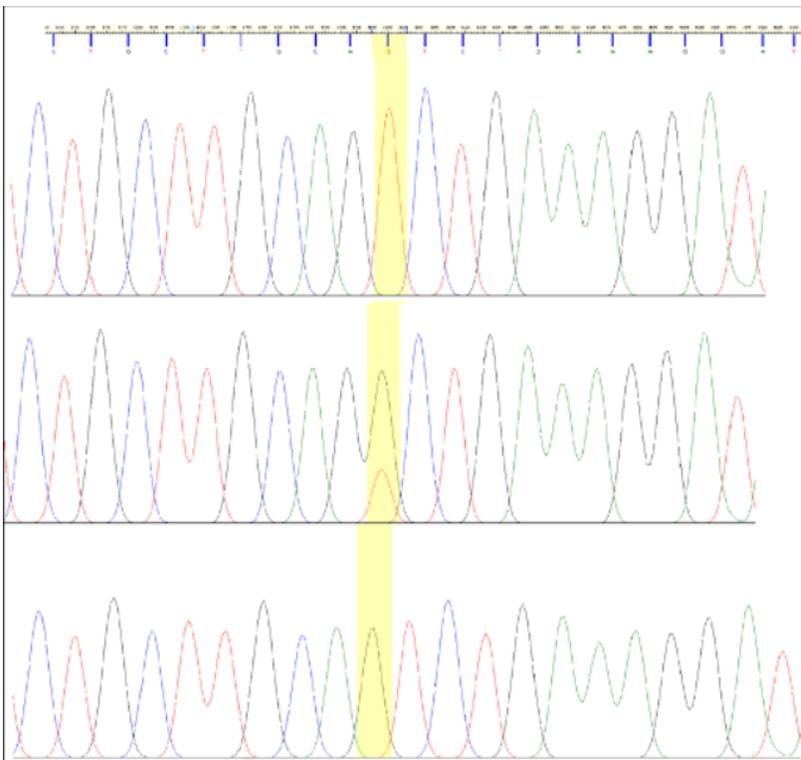
Variante c.4273 A>C (p.T1425P)



Sin variante genética:
c.4273 A/A

Con variante genética:
c.4273 A/G

Variante c. 4304 A>G (p.K1435R)



Sin variante genética:
c. 4304 A/G

Con variante genética:
c. 4304 A/G

Con variante genética
c. 4304 G/G

Figura 5: Cromatogramas de las variantes genéticas de analizadas. A) variante c.2401 A>C (p.K801Q) en orden descendente en el gráfico: primera línea sin la presencia de la variante genética, segunda línea en condición heterocigota y tercera línea en condición homocigota. B) variante c.2488 A>G (p.I830V) en orden descendente en el gráfico: primera línea sin la presencia de la variante genética, segunda línea en condición heterocigota. C) variante c. 4304 A>G (p.K1435R) en orden descendente en el gráfico: primera línea sin la presencia de la variante genética, segunda línea en condición heterocigota y tercera línea en condición homocigota. D) variante c.4273 A>C (p.T1425P) en orden descendente en el gráfico: primera línea sin la presencia de la variante genética, segunda línea en condición heterocigota.

8.4 La frecuencia de las variantes genéticas detectadas en el exón 11 del gen *BRCA2* según los tipos histológicos .

Para los adenomas mamarios las frecuencias de las variantes genéticas en el exón 11 del gen *BRCA2* fueron: la variante K801Q A>C 25% (1/4), I830V A>G 25% (1/4), T1425P A>C 25% (1/4), K1435R A>G 75% (3/4). Respecto a las frecuencias de las variantes genéticas en las neoplasias mamarias malignas, la tabla 7 describe los porcentajes según cada tipo histológico.

Tabla 8: frecuencia de las variantes genéticas detectadas en el exón 11 del gen *BRCA2* en condición heterocigota y homocigota según los tipos histológicos malignos

Variante genética	Genotipo		Tipo histológico						
			Carcinoma mixto mamario (n=27)	Carcinoma mamario sólido (n=14)	Carcinoma mamario tubulo-papilar (n= 13)	Carcinoma mamario tubular simple (n=6)	Carcinoma mamario complejo (n=5)	Carcinoma mamario tubular (n=3)	Carcinoma mamario rico en lípidos (n=3)
K801Q	A	A	48,1%	35,7%	46,2%	50%	60%	66,7%	-
	A	C	48,1%	42,9%	30,8%	50%	40%	33,3%	66,7%
	C	C	3,7%	21,4%	15,4%	-	-	-	33,3%
I830V	A	A	88,9%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	A	G	11,1%	-	-	-	-	-	-
	G	G	-	-	-	-	-	-	-
T1425P	A	A	88,9%	85,7%	92,3%	83,4%	80%	66,7%	100%
	A	C	11,1%	14,3%	7,7%	16,6%	20%	33,3%	-
	C	C	-	-	-	-	-	-	-
K1435R	A	A	29,6%	42,9%	38,4%	16,7%	20%	66,7%	66,7%
	A	G	70,4%	35,7%	30,8%	50%	60%	33,3%	33,3%
	G	G	-	21,4%	30,8%	33,3%	20%	-	-

8.5 Detección y frecuencia de haplotipos

Se identificaron 5 diferentes haplotipos en la población de estudio resultantes del análisis genético de las variantes K801Q A>C, I830V A>G, T1425P, K1435R ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2*, el haplotipo más comúnmente encontrado fue la combinación alélica con la variante c. 4304 A>G (p.K1435R) en condición homocigota (AAAG) con un 39%. La tabla 8 reporta los diferentes haplotipos identificados y sus respectivas frecuencias

Tabla 9: frecuencia de haplotipos en el exón 11 del gen *BRCA2* en 75 caninos con neoplasias mamarias estudiados.

K801Q	I830V	T1425P	K1435R	Frecuencia
A	A	A	G	39,4%
C	A	A	A	28,8%
A	A	A	A	23,5%
A	A	C	A	5,8%
A	G	A	A	2,3%

8.6. Relación entre haplotipos y los tipos histológicos.

Entre la población de estudio se encontraron 7 diferentes tipos histológicos de neoplasias mamarias malignas, entre estos el carcinoma mamario sólido simple, el segundo mas frecuentemente encontrado en la población de estudio, presentó una relación estadísticamente significativa con el haplotipo CAAA, con un valor de P de 0.047. Esta misma relación estadísticamente significativa se identificó entre el mismo haplotipo (CAAA) y el carcinoma mamario rico en lípidos, con un p- val de 0.0424. La tabla 9 muestra el resultado de los Score de los haplotipos y los respectivos valores de P para los tipos histológicos con los que se encontró relación estadísticamente significativa (*)

Tabla 10: Relación entre los haplotipos y los tipos histológicos en los 75 caninos con NGM.

Tipo histológico	Haplotipo				Score de haplotipo	P-valio
Carcinoma mamario sólido simple	A	A	A	G	-0,22852	0,81924
	C	A	A	A	1,9808	0,04761*
	A	A	A	A	-1,82013	0,06874
	A	A	C	A	0,24801	0,80413
Carcinoma mamario rico en lípidos	A	A	A	G	-1,2294	0,2189
	C	A	A	A	2,0298	0,0424*
	A	A	A	A	-0,4131	0,6795
	A	A	C	A	-0,6439	0,5196

8.7. Relación entre haplotipos y las razas.

La población de estudio estuvo representada por 21 diferentes razas, de las cuales los Pinscher tuvieron una relación estadísticamente significativa con el haplotipo CAAA, en cuanto a la presentación de neoplasias de la glándula mamaria, (P= 0.0096), la misma relación con evidencia estadística se detectó para los Basehound con un valor de P de 0.04. La tabla 10 muestra la evidencia de los Score de los haplotipos y los respectivos valores de P para las razas Pinscher y Basehound.

Tabla 11: Relación entre los haplotipos y la raza.

Se muestra la relación estadísticamente significativa (*) entre los haplotipos y la raza Pinscher y Basehound

Raza	Haplotipos				Score de haplotipo	P-valio
Pinscher	A	A	A	G	-1.915	0.05549
	C	A	A	A	258.817	0.00965*
	A	A	A	A	-0.19827	0.84283
	A	A	C	A	-0.99757	0.31849
Basehound	A	A	A	G	-1	0,1491
	C	A	A	A	2	0,04064*
	A	A	A	A	-0,51242	0,60836
	A	A	C	A	-0,47821	0,6325

8.8 Relación entre variante genética y la edad

Al relacionar cada variante genética en el exón 11 del gen *BRCA2* con la edad de aparición de la neoplasia mamaria en la población de estudio, se detectó que los individuos, 9.3% (7/75), tres Poodle's, dos Pinscher's y 2 Hound's, con la variante c.2401 A>C (K801Q) en condición homocigota presentaron una disminución en la mediana de la edad de aparición de la neoplasia de dos años y medio, de 8 años a 5,5 años, lo cual tuvo evidencia significativa según los análisis estadísticos realizados. (P=0,042)

Figura 5

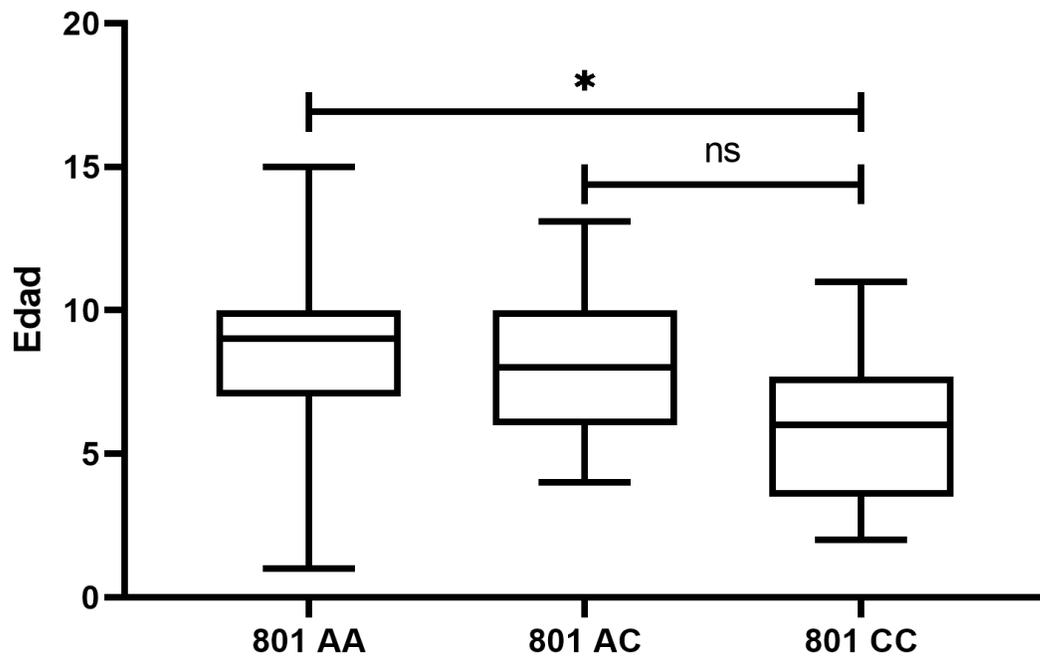


Figura 7: Se muestra la relación entre la mediana de la edad de aparición de las neoplasias mamarias en los 75 caninos estudiados y la variante genética 801 en el exón 11 del gen *BRCA2* en condición homocigota, heterocigota, y sin la variante genética (de derecha a izquierda). El * muestra relación estadísticamente significativa ($P=0.042$).

8.9 Relación entre variantes genéticas y las razas

Al relacionar alguna de las cuatro variantes genéticas del exón 11 del gen *BRCA2* analizadas en este estudio con las diferentes razas de la población no se detectó alguna relación estadística entre estas dos variables. Sin embargo los 16 Poodle's del estudio, 14 mestizos, 6 Pinscher, las tres razas más frecuentes en el estudio presentaron todos alguna de las 4 variantes genéticas analizadas en el exón 11 del gen *BRCA2*, siendo la más frecuente la variante c. 4304 A>G (p.K1435R) para los

Poodle's 75% (12/16) y para los mestizos 71,4% (10/14) y para los Pinscher la más frecuente fue la variante genética c.2401 A>C (K801Q) con un 100%.

9. Discusión

En este estudio se realizó un análisis genético para establecer la frecuencia de variantes genéticas reportadas previamente en la literatura en el exón 13 del gen *BRCA1* y en el exón 11 del gen *BRCA2*, en 75 caninos con neoplasias mamarias, también para identificar los haplotipos y determinar o establecer su relación con características como la edad, la raza y el tipo histológico.

El 54.7% de la población estaba esterilizada antes de la aparición de la neoplasia y presentó una mediana de edad de 10 años (rango 8 -11 años), y una mediana de edad de aparición de las neoplasias de 8 años (rango 6.5 – 10 años) lo que es concordante con lo reportado en la literatura, ya que la edad promedio de aparición de la neoplasia mamaria en caninos oscila entre los 6 y 10 años con promedio de 8 años (27,38). Con relación a las razas, en esta investigación las dos más comúnmente encontradas con neoplasias mamarias fueron los Poodle´s con un 21.4% y los Mestizos con un 18.7%, lo que concuerda con otros reportes, que informan una alta frecuencia de neoplasias mamarias en estas dos razas. (69–73) Los Poodle´s han sido reportados en la literatura como una de las razas con mayor predisposición al desarrollo de neoplasias mamarias. (46,48) En la actualidad los estudios genéticos orientados a la detección de polimorfismos con poblaciones sanas y enfermas de la misma raza que permitirían asociar la raza, el polimorfismo y la enfermedad (neoplasias mamarias) son limitados. En nuestra población de estudio, en los Poodle`s se encontró una alta frecuencia, 75% (12/16), para la variante c.4304A> G (p.K1435R) en el exón 11 del gen *BRCA2*; esta frecuencia en la raza Poodle es similar, aunque superior a lo reportado por otros autores en donde

la frecuencia alélica de esta variante fue inferior al 67%. (15,74) La variante c.2401 A>C (K801Q) ubicada en el exón 11 del gen *BRCA2* ha sido reportada en los Poodle's por autores como Maués T. Et al. 2018 y Borge K.S. Et al 2011, pero solo el primero de estos reportó una frecuencia del 50% en dicha raza (6 de 12 Poodle's), este hallazgo es similar a lo encontrado en este estudio, ya que de los 16 poodle's analizados, 7 presentaron la variante genética c.2401 A>C (K801Q) (44%). La variante c.4273 A>C p.T1425P en el exón 11 del gen *BRCA2* reportada previamente en la literatura por autores como Ochiai K. Et al. 2015 y Maués T. Et al 2018, fue evaluada en caninos de raza Poodle, reportando que en el estudio de Ochiai Et al. 2015, 5 de 50 Poodle's presentaron esta variantes (10%) y el reporte de Maués T. Et al 2018 indica que de los 12 Poodle's analizados ninguno presentó la variante genética c.4273 A>C p.T1425P, en este estudio 3 de 16 Poodle's (18.7%) presentaron la variante genética en mención. La variante c.2488 A>G p.1830V en el exón 11 del gen *BRCA2* en los Poodle's ha sido reportada previamente sólo por autores como Maués T. Et al. 2018, reportando una frecuencia del 25% (3/12) en esta raza, cifra superior a la encontrada en este estudio (6,3% 1/16). Los pacientes de raza Pinscher en este estudio fueron la tercera raza más común (n=6), en estos individuos la variante c.2401 A>C (K801Q) presentó una frecuencia del 100%, en la actualidad no hay reportes de frecuencia de esta variante genética en la raza Pinscher realizada por otros autores.

Es importante aclarar que, debido al limitado número de individuos de esta raza en la investigación y la carencia de controles sanos, no se realizaron análisis estadísticos orientados a establecer asociaciones entre la raza y el desarrollo de la

enfermedad neoplásica mamaria según las variantes genéticas en el exón 11 del gen *BRCA2*.

El 94.6% (71/75) de los tejidos mamarios analizados histopatológicamente fueron clasificados como malignos evidenciando una frecuencia mayor de este tipo de neoplasias mamarias en caninos respecto a las benignas, lo que concuerda con lo reportado por autores como Maués T. Et al. 2018 (15), quienes reportan un 95.8% de malignidad en sus 47 muestras de tejidos mamarios analizados. Siendo nuestra cifra superior a las reportadas por otros autores como Vascellari et al. 2016, Salas et al. 2015. , quienes reportan frecuencias del 70 y 47.5% respectivamente. (48,75)

Entre los tejidos neoplásicos mamarios malignos analizados en esta investigación el carcinoma mamario mixto fue el más frecuentemente diagnosticado con un 36%, lo que concuerda con otros autores, como Maués T. Et al. 2018, en cuanto a que es la neoplasia mamaria maligna más frecuentemente reportada en caninos, esto puede deberse al hecho de que involucra dos tipos de células diferentes en la glándula mamaria, las epiteliales y las mesenquimales, aclarando que la frecuencia de este tipo histológico en esta investigación fue inferior a la reportada en la literatura, ellos indican una frecuencia del 54,2% (26/48) del total de los tejidos analizados, siendo su tamaño muestral inferior al de este estudio (75 tejidos neoplásicos mamarios totales analizados). (15) En lo reportado por los mismos autores, el adenoma mamario es la neoplasia mamaria benigna más frecuentemente encontrada (2.1% 1/48), lo que es concordante con lo hallado en este estudio pero con una frecuencia superior (5.3% 4/75). Respecto a los otros 6 tipos histológicos malignos encontrados en este estudio en orden descendente así

el carcinoma mamario sólido simple, carcinoma mamario tubulopapilar, carcinoma mamario tubular simple, carcinoma mamario complejo, carcinoma mamario tubular, carcinoma mamario rico en lípidos, sus frecuencias difieren a lo reportado en la literatura, como por Maués T. Et al. 2018 quienes mencionan al carcinoma papilar (18.8%, n = 9/48), Carcinosarcoma (8.3%, n = 4/48), carcinoma sólido (6.2%, n = 3/48) como las neoplasias mamarias malignas más frecuentes.

En esta investigación el 96% (72/75) de los pacientes analizados presentaron al menos una de las cuatro variantes genéticas analizadas en el exón 11 del gen *BRCA2*, este hallazgo muestra que estas variantes genéticas en el gen *BRCA2* son frecuentes en caninos con neoplasias mamarias, lo que podría sugerir una relación entre las variantes genéticas ubicadas en los dominios repetitivos para la unión proteica BRCA2-RAD51, del exón 11 del gen *BRCA2* y el desarrollo de neoplasias mamarias, esta teoría ha sido propuesta previamente por otros autores. (15)

El 4% (3/75) de los pacientes analizados no presentaron las variantes genéticas analizadas en el exón 11 del gen *BRCA2*, estos individuos con razas diferentes, Springer Spaniel, Bull terrier y Pug, todos con 10 años de edad, tuvieron como tejidos mamaros neoplásicos, adenoma mamario, carcinoma mamario tubulopapilar, carcinoma mamario complejo, y no presentaron ninguna relación entre el genotipo y las características clínico-patológicas. No se descarta que presenten otras variantes genéticas germinales en el gen *BRCA2* en otras regiones codificantes, ya que en este estudio no se secuenció de forma completa dicho gen, ni se descarta otras variantes genéticas en genes diferentes a *BRCA1* y *BRCA2* adicional estudiar otras vías involucradas en el desarrollo de neoplasias mamarias

en caninos que puedan explicar la aparición de esta patología de forma no heredada, sino por ejemplo de forma espontánea.

La proteína codificada por el gen *BRCA2* está involucrada en el proceso de reparación del daño a la doble cadena del DNA por recombinación homóloga. Para el cumplimiento de esta función, forma un complejo proteico con la proteína recombinasa RAD51, interactuando con ésta a través de las regiones repetitivas y altamente conservadas denominadas BRC ubicadas en el exón 11 del gen *BRCA2*, promoviendo también el ensamblaje de la recombinasa en el sitio del daño para la reparación. (74)

En la actualidad se han reportado variantes genéticas ubicadas en los dominios repetitivos BRC del exón 11 del gen *BRCA2*, que afectan la formación del complejo proteico BRCA2-RAD51 y que han sido relacionadas con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos hembra e inclusive en humanos (18,76) El cambio de aminoácido p.T1425P generado por la variante c.4273 A>C según autores como Ochiai O. et al. 2015 (74) reduce la fuerza de unión con RAD51, y afecta la longitud total del dominio BRC afectado la función de la proteína. Los análisis en la herramienta ConSurf por Ozmen Et al. 2017. (18) evidenciaron que el aminoácido (treonina) ubicado en la posición 1425 es altamente conservado lo que sugiere respecto al cambio T1425P una mayor posibilidad de alterar la estructura de la proteína BRCA2. El análisis de los mismos autores con MutPred reporta que la modificación T1425P es el cambio con una mayor probabilidad de estar asociado con el desarrollo de neoplasias mamarias.

Con relación a la variante c.4304A> G (p.K1435R) la frecuencia detectada en este estudio (65.3%) supera a la reportada por autores como Ochiai O. Et al. 2015 (31.4%), siendo inferior a la reportada por Maués T. Et al. 2018 (70.2%). Otros autores como Ozmen Et al. 2017 reportan su detección, pero no frecuencia. Estudios previos que evalúan la unión entre BRCA2 y RAD51, concluyen que ante la presencia de esta variante genética se generó una inhibición de la autoasociación en estas dos proteínas. (18,74,77)

Las variantes genéticas ubicadas en una región altamente conservada como las BRC del exón 11 del gen *BRCA2* según autores como Hsu WL. Et al 2010 (19) tienen más probabilidades de estar asociadas a las neoplasias mamarias respecto a las variantes ubicadas en otras regiones de menos conservación genética. La variante genética c.2401 A>C (p.K801Q) ubicada en la región BRC del exón 11 del gen *BRCA2* ha sido detectada en caninos con neoplasias mamarias, atribuyéndole efecto deletéreo según los algoritmos de predicción como PolyPhen-2 y PROVEAN (14,15,19,66). En esta investigación la variante c.2401 A>C (K801Q) fue detectada con una frecuencia superior a la reportada por otros autores como Maués Et al. 2018 con 42.5% (20/47) (14,15,19),resaltando con importancia que esta variante genética en condición homocigota, se relacionó estadísticamente con la disminución en la mediana de la edad de aparición de neoplasias mamarias en nuestra población de estudio en 2,5 años. Biológicamente y según estudios previos, esta variante c. 2401 A>C (p.Q801R) genera una pérdida de metilación y según los algoritmos de predicción, genera pérdida de ubiquitinación, lo que permite concluir acerca del potencial de alteración estructural y funcional de la proteína BRCA2 en presencia

de esta variante, y lo cual podría estar relacionado con el desarrollo de las neoplasias mamarias en caninos. (18,19)

Diferentes investigaciones han relacionado al gen *BRCA1* con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos al detectar variantes genéticas en regiones codificantes y no codificantes, que pueden, según análisis de predicción alterar la estructura, funcionalidad, reducción de expresión y proceso de transcripción de la proteína BRCA1. (1,61,78–80) La región C- terminal (BRCT) del gen *BRCA1* es altamente conservada en caninos y está relacionada con funciones como activación de proceso transcripcional (62,64). QIU H. Et al. 2016 (59) han sido los únicos investigadores que han reportado la detección de la variante genética c. 4762 G>T (p.W1567STOP) ubicada en el BRCT del gen *BRCA1* en caninos con neoplasias mamarias, la cual según los autores conduce a la pérdida del dominio de repetición BRCT, ya que esta genera un codón de parada en la secuencia de aminoácidos de la proteína BRCA1. En nuestra investigación se secuenció el exón 13 del gen *BRCA1*, con el objetivo de detectar y reportar la frecuencia de la variante c. 4762 G>T (p. W1567STOP), pero ésta no se detectó en ninguno de los 75 caninos con neoplasias mamarias. Esto podría deberse a una baja frecuencia de la variante genética c. 4762 G>T (p.W1567STOP) en caninos, y dichos datos epidemiológicos se desconocen, ya que los autores QIU, H.et al. 2016 (59) no los reportan en su investigación y debido al tamaño muestral (75) en esta investigación no pudo ser detectada, por lo que se sugiere otros estudios con un mayor tamaño muestral.

En la actualidad, en el estudio de la genética aplicada al cáncer, en el de mama en caninos particularmente, no se ha establecido una relación estadísticamente

significativa entre el genotipo y el fenotipo, que busque o sirva como valor pronóstico en la enfermedad del cáncer de mama en caninos como en humanos. Autores como Maués T. Et al. en el 2018, (15) evaluaron tanto los SNPs individuales como las combinaciones resultantes entre ellos (haplotipos) en relación o en conjunto con características clínicas e histopatológicas de las neoplasias mamarias evaluadas en su estudio, reportando que no hubo relación. En este estudio se estableció por primera vez los diferentes haplotipos resultantes de las combinaciones entre los alelos de las variantes genéticas analizadas, encontrando que la combinación alélica CAAA, que corresponde al haplotipo que considera la variante genética c. 2401 A>C (Q801R) en condición homocigota, presentó una relación estadísticamente significativa con características como: la raza (Pinscher, Basehound) y con los tipos histológicos: Carcinoma mamario sólido simple y Carcinoma mamario rico en lípidos.

Fortalezas del estudio:

Este es el primer reporte de la frecuencia de variantes genéticas en los genes *BRAC1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias de glándula mamaria en el área metropolitana, Antioquia Colombia y el primer hallazgo de una relación estadísticamente significativa entre el genotipo, en genes (*BRCA1* y *BRCA2*) que confieren susceptibilidad al desarrollo de neoplasias mamarias en caninos y el fenotipo en la enfermedad de neoplasias mamarias en caninos en el área metropolitana, Antioquia Colombia.

Limitaciones:

La dificultad en la consecución de tejido mamario neoplásico y muestras sanguíneas de caninos con neoplasias mamarias no permitió obtener el N muestral calculado en el estudio. El tamaño de la población a estudiar se determinó empleando el programa estadístico Epidate ®, en el módulo de cálculo de tamaño muestral por proporción esperada, la cual fue de 10%, considerando la frecuencia más baja reportada en la literatura para las variantes genéticas de interés, y que según dicho cálculo, fue de 149.

Diferentes estudios reportan en los genes *BRCA1* y *BRCA2* otras variantes genéticas en caninos con neoplasias mamarias (15,66). En este estudio no se descarta la presencia de otras variantes genéticas debido a que no se secuenciaron todos los exones de dichos genes. Por lo tanto, se resalta la necesidad de futuros estudios para secuenciar de forma completa *BRCA1* y *BRCA2* con metodologías de secuenciamiento de nueva generación o exomas.

10. Conclusiones.

Las variantes genéticas en el gen *BRCA2* son frecuentes en caninos con neoplasias mamarias y presentaron frecuencias similares a las reportadas en la literatura.

La mediana de la edad de aparición de las neoplasias mamarias fue de 8 años, Los Poodle's fueron la raza más frecuente en este estudio, las neoplasias mamarias malignas fueron las más diagnosticadas, entre estas, el carcinoma mamario mixto fue el más comúnmente reportado en el análisis histopatológico, hallazgos similares a lo reportado en la literatura

Los pacientes analizados en el estudio que presentan la variante genética c. 2401 A>C (p.Q801R) en condición homocigota muestran una reducción de 2.5 años en la mediana de la edad de aparición de la neoplasia mamaria respecto a la mediana de la edad de aparición de neoplasia de la población en general.

En este estudio no se detectó la variante genética c. 4762 G>T (p.W1567STOP) en el exón 13 de *BRCA1*, por lo que se requieren investigaciones con mayor tamaño muestral para detectarla y relacionarla con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos.

Este es el primer estudio realizado en Colombia, y el segundo en América latina, orientado a detectar la presencia y que establece la frecuencia de variantes

genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasia mamaria, adicional el primero en detectar una relación estadísticamente significativa entre el genotipo y el fenotipo.

11. Perspectivas.

Es necesario, a favor de la adquisición de nuevo conocimiento en el campo de la genética del cáncer de mama en caninos, realizar investigaciones de tipo experimental que incluyan metodologías que permitan analizar otros tipos de alteraciones generadas por la presencia de las variantes genéticas, como lo son: modificaciones en los niveles de expresión génica y en la estructura química de la proteína, alteración en la formación de complejos proteicos de reparación al DNA, como la unión BRCA2-RAD51, en especial en presencia de la variante genética c. 2401 A>C (p.Q801R) en condición homocigota, y que a su vez no son analizados por los predictores logarítmicos utilizados con frecuencia en este tipo de investigaciones, lo que conduce a un sesgo a la hora de clasificar el daño generado por una variante genética, concluyendo benignidad ante la presencia de dicha variante lo que resulta en la limitación del conocimiento.

Se requieren próximos estudios que consideren un mayor número de pacientes caninos con neoplasias mamarias, es decir un tamaño muestral más amplio, que a su vez consideren poblaciones sanas y/o controles que permitan asociar las variantes genéticas con características como la raza, la edad y con el desarrollo de la enfermedad, posibilitando validar la información obtenida en los programas predictores referente al cambio o modificación en la proteína.

La ejecución de estudios genéticos orientados a la detección de variantes genéticas deletéreas que se relacionan con el desarrollo de neoplasias mamarias en caninos brinda información relevante para los programas de mejoramiento genético y

selección de individuos sanos para la reproducción y así disminuir la frecuencia de variantes perjudiciales en la población descendiente. Por esto las investigaciones genéticas en este tema deben considerar realizarse con líneas o razas puras con parentesco genético, con tamaños muestrales elevados, con el objetivo de poder establecer la presencia de variantes deletéreas en genes de riesgo como *BRCA1* y *BRCA2*, que puedan ser relacionadas con la raza teniendo en cuenta el factor hereditario, el cual según la información reportada en la literatura en humanos aumenta el riesgo del desarrollo de la enfermedad de neoplásia mamaria

12. Referencias

1. Enginler SO, Akiş I, Toydemir TSF, Oztabak K, Haktanir D, Gündüz MC, et al. Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Vet Res Commun*. 2014;38(1):21–7.
2. Melin M, Rivera P, Arendt M, Elvers I, Murén E, Gustafson U, et al. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. *PLoS Genet* [Internet]. 2016;12(5):1–20. Available from: [10.1371/journal.pgen.1006029](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006029)
3. Rivera P, von Euler H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol* [Internet]. 2011;48(1):132–46. Available from: [10.1177/0300985810387939](https://doi.org/10.1177/0300985810387939)
4. Balmaña J, Díez O, Rubio IT, Cardoso F. BRCA in breast cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Ann Oncol*. 2011;
5. Chandler MR, Bilgili EP, Merner ND. A Review of Whole-Exome Sequencing Efforts Toward Hereditary Breast Cancer Susceptibility Gene Discovery [Internet]. *Human Mutation*. 2016. p. 838–46. Available from: [10.1002/humu.23017](https://doi.org/10.1002/humu.23017)
6. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian S V., Nathanson KL, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015;
7. Grüntzig K, Graf R, Hässig M, Welle M, Meier D, Lott G, et al. The Swiss canine cancer registry: A retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *J Comp Pathol* [Internet]. 2015;152(2–3):161–71. Available from: [10.1016/j.jcpa.2015.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.02.005)

8. Vonholdt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, et al. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* [Internet]. 2010;464(7290):898–902. Available from: 10.1038/nature08837
9. Adams VJ, Evans KM, Sampson J, Wood JLN. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract.* 2010;51(10):512–24.
10. Redig AJ, Mcallister SS. Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. *Journal of Internal Medicine.* 2013.
11. Goldschmidt MH, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48(1):117–31.
12. Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med* [Internet]. 2008;22(4):976–84. Available from: 10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x
13. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann Oncol* [Internet]. 2015;26(7):1291–9. Available from: 10.1093/annonc/mdv022
14. Borge KS, Børresen-Dale AL, Lingaas F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Vet Comp Oncol.* 2011;9(4):241–50.
15. Maués T, El-Jaick KB, Costa FB, Araujo GEF, Soares MVG, Moreira AS, et al. Common germline haplotypes and genotypes identified in BRCA2 exon 11 of dogs with mammary tumours and histopathological analyses. *Vet Comp Oncol.* 2018;16(3):379–84.

16. Rivera PJ, 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;
17. Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, Wan F, Friebel TM, Tran T V., et al. Modification of BRCA1-associated breast and ovarian cancer risk by BRCA1-interacting genes. *Cancer Res.* 2011;
18. Ozmen O, Kul S, Risvanli A, Ozalp G, Sabuncu A, Kul O. Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. *Vet Comp Oncol.* 2017;
19. Hsu WL, Huang YH, Chang TJ, Wong ML, Chang SC. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *Vet J.* 2010;
20. 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. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2015.
21. Hicks J, Platt S, Kent M, Haley A. Canine brain tumours: a model for the human disease? *Veterinary and Comparative Oncology.* 2017.
22. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2015;370(1673):20140231. Available from: 10.1098/rstb.2014.0231
23. Meza J, Montaña A, Aguayo Á. Las Bases Moleculares del Cáncer. *Acta Univ.* 2006;16(1):40–9.
24. 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.
25. Sutter NB, Ostrander EA. Dog star rising: The canine genetic system [Internet]. *Nature Reviews Genetics.* 2004. p. 900–10. Available from: 10.1038/nrg1492
 26. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine.* 2011.
 27. Dhami MA, Tank PH, Karle AS, Vedpathak HS, Bhatia AS. Epidemiology of canine mammary gland tumours in Gujarat. *Vet World* [Internet]. 2010;3(6):282–5. Available from: 10.5455/vetworld.2010.282-285
 28. Davis BW, Ostrander EA. Domestic dogs and cancer research: A breed-based genomics approach. *ILAR J.* 2014;55(1):59–68.
 29. Pawlak A, Obmińska-Mrukowicz B, Rapak A. The dog as a model for comparative studies of lymphoma and leukemia in humans. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;
 30. Ostrander EA. Both Ends of the Leash — The Human Links to Good Dogs with Bad Genes. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;367(7):636–46. Available from: 10.1056/nejmra1204453
 31. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* (80-). 1994;
 32. Pöppel AG, de Carvalho GLC, Vivian IF, Corbellini LG, González FHD. Canine diabetes mellitus risk factors: A matched case-control study. *Res Vet Sci.* 2017;
 33. Guthrie S, Pidduck HG. Heritability of elbow osteochondrosis within a closed population of dogs. *J Small Anim Pract.* 1990;

34. Silva AE da, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural*. 2004;
35. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors [Internet]. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 2003. Available from: 10.1016/S0195-5616(03)00020-2
36. Toniti W, Buranasinsup S, Kongcharoen A, Puchadapirom P, Kasorndorkbua C. Toniti et al. 2009. 2009;10:907–12.
37. Oliveira TF, Maués T, Ramundo MS, Figueiredo AMS, de Mello MFV, El-Jaick KB, et al. TP53 gene expression levels and tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas. *J Vet Diagnostic Investig* [Internet]. 2017;29(6):865–8. Available from: 10.1177/1040638717721730
38. Sleenckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, van Ginneken C, van Brantegem L. Canine mammary tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011.
39. Owen LN. A comparative study of canine and human breast cancer. *Investigative and Cell Pathology*. 1979.
40. Martín De Civetta MT, Civetta, JD. Carcinogénesis. *Salud Publica Mex*. 2011;
41. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 1986;
42. Baioni E, Scanziani E, Vincenti MC, Leschiera M, Bozzetta E, Pezzolato M, et al. Estimating canine cancer incidence: Findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. *BMC Vet Res*. 2017;13(1):1–9.
43. Vascellari M, Baioni E, Ru G, Carminato A, Mutinelli F. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs

- and cats. BMC Vet Res [Internet]. 2009;5(39):1–9. Available from: 10.1186/1746-6148-5-39
44. Cortinas C. Cáncer: herencia y ambiente. La Cienc para todos [Internet]. 2013; Available from: [https://scholar.google.es/scholar?start=620&q=\(adolesc*+OR+joven*\)+AND+\(sexual*+comport*+OR+riesgo*+OR+infección*+transmisión+sexual+OR+enfermedad*+OR+ETS+OR+sida+OR+VIH+OR+embaraz*\)+AND+\(program*+OR+evaluac*+OR+eficac*+OR+efectivid*+OR+metaanal](https://scholar.google.es/scholar?start=620&q=(adolesc*+OR+joven*)+AND+(sexual*+comport*+OR+riesgo*+OR+infección*+transmisión+sexual+OR+enfermedad*+OR+ETS+OR+sida+OR+VIH+OR+embaraz*)+AND+(program*+OR+evaluac*+OR+eficac*+OR+efectivid*+OR+metaanal)
45. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. Vet Comp Oncol [Internet]. 2009;7(3):162–72. Available from: 10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x
46. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. Vet Pathol [Internet]. 2011;48(1):85–97. Available from: 10.1177/0300985810389480
47. Ariyaratna H, de Silva N, Aberdein D, Kodikara D, Jayasinghe M, Adikari R, et al. Clinicopathological diversity of Canine Mammary Gland Tumors in Sri Lanka: A one-year survey on cases presented to two veterinary practices. Vet Sci. 2018;
48. Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. PLoS One [Internet]. 2015;10(5):e0127381. Available

from: 10.1371/journal.pone.0127381

49. Rosciani AS, Merlo WA, Insfrán RM, Rodríguez YN. Valor pronóstico de la última clasificación histológica de tumores mamarios caninos. *Rev Vet.* 2015;
50. Canadas A, Santos M, Nogueira A, Assis J, Gomes M, Lemos C, et al. Canine mammary tumor risk is associated with polymorphisms in RAD51 and STK11 genes. *J Vet Diagnostic Investig.* 2018;30(5):733–8.
51. Hómez de Delgado B. Hormonas en la mama: De la fisiología a la enfermedad. *Rev venez endocrinol metab.* 2008;
52. Brown SB, Hankinson SE. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids.* 2015.
53. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.
54. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters.* 2015.
55. Inoue M, Shiramizu K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. *J Comp Pathol.* 1999;
56. Rodríguez-Lara V, Báez-Saldaña R, Peña-Mirabal E, González-Sánchez I, Cerbón-Cervantes MA, Esparza-Silva AL, et al. Estrógenos y su influencia en el cáncer pulmonar. *Rev la Fac Med.* 2015;
57. Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: A novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;
58. Park JW, Lee SH, Woo GH, Kwon HJ, Kim DY. Downregulation of TXNIP

- leads to high proliferative activity and estrogen-dependent cell growth in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;
59. QIU H, LIN D. Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of *BRCA1* in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci*. 2016;78(6):943–9.
 60. Lim HY, Im KS, Kim NH, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Vet J*. 2015;203(3):326–31.
 61. Hu YF, Miyake T, Ye Q, Li R. Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain. *J Biol Chem*. 2000;
 62. Monteiro ANA, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;
 63. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008;14:1232–9. Available from: doi: 10.3201/eid1408.080287
 64. Szabo CI, Wagner LA, Francisco L V., Roach JC, Argonza R, King MC, et al. Human, canine and murine BRCA1 genes: Sequence comparison among species. *Hum Mol Genet*. 1996;
 65. Hsu WL, Huang YH, Chang TJ, Wong ML, Chang SC. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *Vet J* [Internet]. 2010;184(3):351–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.022>

66. Ozmen O, Kul S, Risvanli A, Ozalp G, Sabuncu A, Kul O. Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. *Vet Comp Oncol.* 2017;15(4):1479–86.
67. 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. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2015.
68. Enginler SO, Akiş I, Toydemir TSF, Oztabak K, Haktanir D, Gündüz MC, et al. Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Vet Res Commun.* 2014;
69. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 Cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005;
70. Toríbio JM de ML, Lima AE, Filho EFM, Ribeiro LGR, D'Assis MJMH, Teixeira RG, et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de salvador, Bahia. *Rev Ceres.* 2012;
71. Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, Marques BMFPP, Figuera RA, Irigoyen LF, et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesqui Veterinária Bras.* 2010;
72. Zatloukal J, Lorenzová J, Tichý F, Nečas A, Kecová H, Kohout P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Vet Brno [Internet].* 2005;74(1):103–9. Available from: <https://doi.org/10.2754/avb200574010103>
73. Egenvall A, Bonnett BN, Öhagen P, Olson P, Hedhammar Å, 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. *Prev Vet Med.* 2005;
74. Ochiai K, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Udagawa C, Kato Y, Watanabe M, et al. Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomed Res.* 2015;
75. Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med.* 2016;
76. Yoshikawa Y, Morimatsu M, Ochiai K, Nagano M, Yamane Y, Tomizawa N, et al. Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. *J Vet Med Sci.* 2005;
77. Yoshikawa Y, Ochiai K, Morimatsu M, Suzuki Y, Wada S, Taoda T, et al. Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. *PLoS One.* 2012;
78. Qiu HB, Sun WD, Yang X, Jiang QY, Chen S, Lin DG. Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. *Res Vet Sci* [Internet]. 2015;103:143–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.10.003>
79. Tsuchida S, Ikemoto S, Tagawa M. Microsatellite Polymorphism in Intron 14 of the Canine BRCA1 Gene. *J Vet Med Sci.* 2001;
80. 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):1541–3.

13. Anexos.

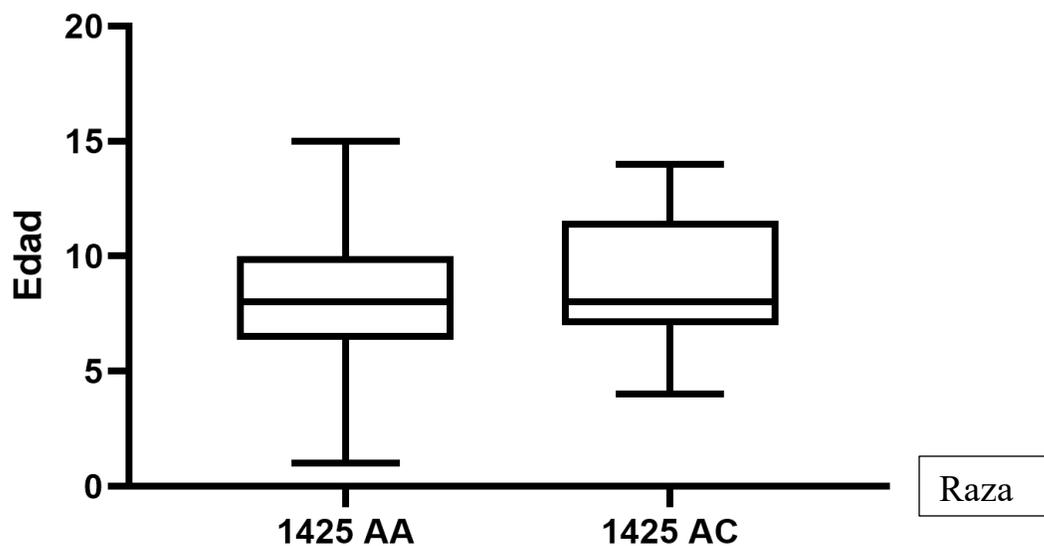
Anexo 1: Características físico-patológicas en los 75 caninos con neoplasias mamarias participantes en el estudio y las variantes.

Número de caso	Raza	W1567Stop G>T	W1567Stop G>T	K801Q A>C	K801Q A>C	I830V A>G	I830V A>G	T1425P A>C	T1425P A>C	K1435R A>G	K1435R A>G	Tipo histológico	Grado
1	Cocker Spaniel	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	3
2	N/A	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	2
3	Criollo	G	G	A	A	A	G	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	2
4	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
5	Maltes	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	2
6	Fox terrier	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	2
7	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
8	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	3
9	Pastor Aleman	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
10	Springer Spaniel	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	3
11	Pinscher	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
12	Schnauzer	G	G	A	A	A	G	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
13	Daschund	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
14	Bull dog ingles	G	G	A	C	A	A	A	C	A	A	Carcinoma mixto mamario	1
15	Labrador	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	3
16	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
17	Springer Spaniel	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
18	Beagle	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	3
19	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	3
20	Dalmata	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
21	Pinscher	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
22	Shit Ztu	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
23	Pinscher	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mixto mamario	2
24	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
25	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	1
26	Pit bull	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	1
27	Poodle	G	G	A	A	A	G	A	A	A	G	Carcinoma mixto mamario	2
28	Afghano	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	3
29	Bull dog frances	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario sólido simple	2
30	Daschund	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	3
31	Poodle	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario sólido simple	3
32	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario sólido simple	3
33	Poodle	G	G	A	C	A	A	A	C	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	3
34	Bull dog ingles	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario sólido simple	2
35	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mamario sólido simple	3
36	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario sólido simple	2
37	Basehound	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	3
38	Pinscher	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	3
39	Bull terrier	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario sólido simple	2
40	Poodle	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario sólido simple	1
41	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario sólido simple	3
42	Shit Ztu	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
43	Poodle	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
44	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubulopapilar	3
45	Weimaraner	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
46	Daschund	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
47	Bull terrier	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
48	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	2

Número de caso	Raza	W1567Stop G>T	W1567Stop G>T	K801Q A>C	K801Q A>C	I830V A>G	I830V A>G	T1425P A>C	T1425P A>C	K1435R A>G	K1435R A>G	Tipo histológico	Grado
49	Labrador	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	2
50	Pug	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
51	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	2
52	Yorkshire terrier	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubulopapilar	1
53	Pinscher	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubulopapilar	2
54	Poodle	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubulopapilar	2
55	Shit Ztu	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mamario tubular simple	1
56	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubular simple	1
57	Springer Spaniel	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubular simple	1
58	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubular simple	2
59	Criollo	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubular simple	1
60	Poodle	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario tubular simple	2
61	Cocker Spaniel	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario complejo	2
62	Fox terrier	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Carcinoma mamario complejo	3
63	Pug	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario complejo	1
64	Cocker Spaniel	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario complejo	2
65	Dalmata	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	Carcinoma mamario complejo	2
66	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	C	A	A	Carcinoma mamario tubular	1
67	Pit bull	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario tubular	2
68	Criollo	G	G	A	A	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario tubular	2
69	Boxer	G	G	A	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario rico en lípidos	2
70	Poodle	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Carcinoma mamario rico en lípidos	2
71	Pinscher	G	G	C	C	A	A	A	A	A	A	Carcinoma mamario rico en lípidos	2
72	Poodle	G	G	A	C	A	A	A	A	A	G	Adenoma	
73	Springer Spaniel	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	Adenoma	
74	Labrador	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	Adenoma	
75	Criollo	G	G	A	A	A	G	A	A	A	G	Adenoma	

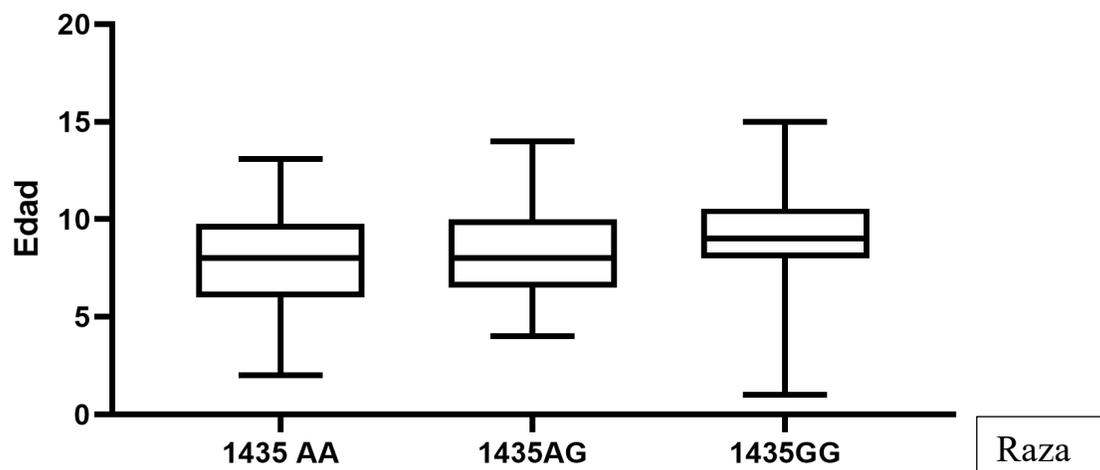
El anexo 1 muestra las variables de los 75 pacientes caninos con neoplasias mamarias participantes en el estudio.

Anexo 2: Relación entre variante genética c.4273 A>C p.T1425P y la edad de aparición de las neoplasias mamarias en la población de estudio.



Relación entre la edad de aparición de las neoplasias mamarias en los 75 caninos estudiados y la variante genética 1425. 1425 AA población sin la variante genética, 1425 AC población con la variante genética en condición heterocigota

Anexo 3: Relación entre variante genética 4304 A>G (p.K1435R) y la edad de aparición de las neoplasias mamarias en la población de estudio.



Relación entre la edad de aparición de las neoplasias mamarias en los 75 caninos estudiados y la variante genética 1435. 1435 AA población sin la variante genética, 1435 AG población con la variante genética en condición heterocigota, 1435GG en condición homocigota

Anexo 4: Relación de los haplotipos con el efecto de las covariables edad y esterilizado.

Haplotipos				Frecuencia haplotipo	Score haplotipo	P- val
K801Q	I830V	T1425P	K1435R			
A	A	C	A	0,06452	1,41670	0,15657
A	A	A	G	0,38710	0,96550	0,33429
A	A	A	A	0,21774	0,23938	0,81081
C	A	A	A	0,30645	1,79091	0,07331

Se evidencia en el anexo 4 la no relación entre los diferentes haplotipos y covariables como edad y esterilización, según el Score haplotipo y valor de P

Anexo 5: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

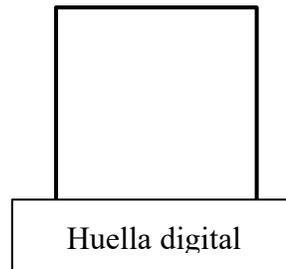
Proyecto: Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico.

Yo, _____, con cédula de ciudadanía N° _____ de _____, en calidad de propietario del canino: _____, en acto consciente autorizó a los profesionales en el área de la salud, médicos veterinarios, quienes realizan el proyecto de investigación titulado: Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico, para que colecten de él una muestra sanguínea de 2 ml de la vena yugular (derecha o izquierda externa) o cefálica (de cualquiera de los miembros torácicos), utilizando para ello una jeringa de 2 milímetros y aguja # 23G1/2, con las medidas antisépticas y las técnicas de veno-punción (colecta sanguínea) adecuadas. Adicional a esto autorizó a la corporación universitaria Remington y sus patólogos veterinarios adscritos al proyecto: Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico, para que realicen un estudio histopatológico de la muestra de tejido mamario neoplásico, muestra que será aportada por la clínica, consultorio, centro veterinario del cual es paciente el canino: _____, dicho tejido será aportado de forma secundaria al procedimiento “mastectomía radical o parcial” programado de forma rutinaria y realizado por los profesionales de la salud, médicos veterinarios adscritos a la clínica, consultorio o centro veterinario. Todo esto con la finalidad de hacer parte del proyecto titulado: Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico, el cual busca reunir evidencia científica sobre las características histopatológica y genéticas de las neoplasias mamarias en caninos en la ciudad de Medellín, llevado a cabo por la Corporación universitaria Remington y su grupo de investigación científico GINVER, y otras entidades nacionales e internacionales.

La veno-punción es una técnica de recolección de muestra sanguínea para su análisis, en particular para el proyecto, servirá como fuente para la extracción de DNA del paciente, la cual es habitual en la medicina clínica de los caninos, alteraciones como: flebitis, hematoma, trombosis y celulitis podrían generarse, por lo que los ejecutores del proyecto se comprometen a salvaguardar el bienestar

animal, así como salvo-guardar los datos personales, la información suministrada por los propietarios, es decir, los datos personales y del paciente, y muestras de tejido mamario neoplásico y muestra sanguínea del paciente, dichos datos no serán revelados, ni publicados en los resultados del proyecto, solo serán materia de investigación por parte de la Corporación Universitaria Remington y otras entidades nacionales e internacionales. Así también se aclara que el proyecto no exige la ejecución de la mastectomía parcial o radical del paciente para la colecta de la muestra de tejido mamario, sino que dicha muestra será aportada de forma secundaria al procedimiento establecido por la clínica, centro veterinario o consultorio, tratante del paciente y que haya programado dicho procedimiento como rutinario para la salud del paciente.

Además de lo anterior soy consciente que al momento que decida retirarme del proyecto estoy en plena libertad de hacerlo. Para constancia de lo anterior se firma en el municipio de Medellín Antioquia a los _____ días del mes de _____ del año _____



Propietario

Cc: _____

Anexo 6: Formato empleado para obtener la información clínico patológica de los 75 caninos con neoplasias mamarias

Proyecto: Detección de variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en caninos con neoplasias mamarias en el Área metropolitana – Antioquia, Colombia y su correlación con el tipo histológico

FECHA:			
DATOS PROPIETARIO:			
1. Estrato socio-económico:		2. Propietario fuma (si/no):	
DATOS PACIENTE:			
1. Nombre:	2. Sexo:	3. Peso (Kgs):	4. Edad (meses/años):
5. Raza:	6. Fecha diagnóstico:	7. Dieta (concentrado/barf/casera):	8. Ejercicio (si/no):
9. Esterilizado (si/no):	10. Edad aparición neoplasia (meses/años):	11. Edad de esterilización(años/meses):	12. Preñez (si/no):
13. Número de gestaciones:	14. Número de partos:	15. Tiempo de lactancia:	16. Edad retiro de neoplasia:
17. Suplementación hormonal (si/no):	18. Piómetra (si/no):	19. Quistes foliculares (si/no):	20. Neoplasias ováricas (si/no):

21. Otras neoplasias diagnosticadas (¿Cuál?):	22. Casos familiares (si/no):	23. Glándula (s) mamarias afectadas:	24. Número de masas mamarias:
---	-------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------