

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 02/06/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Estudo dos genes *RAD51* e *BRCA2* como alvos preditivos em carcinoma
inflamatório mamário de cadelas, análise da expressão do *RAD51* e
quantificação molecular em linhagens celulares neoplásicas de cães**

TAMIRES GONELI WICHERT TEODORO

BOTUCATU-SP

Junho-2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE MEDICINA
VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Estudo dos genes *RAD51* e *BRCA2* como alvos preditivos em carcinoma
inflamatório mamário de cadelas, análise da expressão do *RAD51* e
quantificação molecular em linhagens celulares neoplásicas de cães**

TAMIRES GONELI WICHERT TEODORO

Tese apresentada
junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Teodoro, Tamires Goneli Wichert.

Estudo dos genes RAD51 e BRCA2 como alvos preditivos em carcinoma inflamatório mamário de cadelas, análise da expressão do RAD51 e quantificação molecular em linhagens celulares neoplásicas de cães / Tamire Goneli Wichert Teodoro. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Renée Laufer Amorim

Coorientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50503006

1. Mamas - Câncer. 2. Neoplasias Inflamatórias Mamárias. 3. Genes BRCA2. 4. Rad51 Recombinase. 5. Cães. 6. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: BRCA2; Cães; Câncer de mama; Estabilidade genética; RAD51.

Nome do Autor: Tamires Goneli Wichert Teodoro

Título: Estudo dos genes *RAD51* e *BRCA2* como alvos preditivos em carcinoma inflamatório mamário de cadelas, análise da expressão do *RAD51* e quantificação molecular em linhagens celulares neoplásicas de cães

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Renée Laufer-Amorim
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dra. Priscila Emiko Kobayashi
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dra. Angelica Terezinha Barth Wouters
Membro
Departamento de Medicina Veterinária -DMV-FZMV-
UFLA

Prof.Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Membro
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Dr. João Pedro Vieira da Rocha
Membro
Department of Microbiology and Molecular Genetics,
University of California, Davis

Data da defesa: 02/06/2023

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima por toda iluminação, força e fé, que todos os dias nos guiam pelos caminhos que são colocados durante esta breve jornada.

A toda minha família, por sempre acreditar nos meus sonhos e sempre me incentivar, para que em momentos de fraqueza eu seguisse com força para continuar. Por estarem sempre ao meu lado para rir em momentos felizes, chorar com pequenas derrotas e comemorar cada conquista. Tenho enorme alegria em pertencer a esta família e devo tudo o que sou hoje a eles, em especial ao meu pai Eduardo, e minha mãe Simone. Saibam que gratidão ainda é pouco para expressar tudo o que sinto por vocês. E à minha adorada irmã Thais, e amada companheira de vida Heloísa, tenho só amor e alegria por ter vocês em minha vida.

À minha orientadora Prof. Renée Laufer Amorim, pela excelente orientação, não apenas acadêmica, mas de vida. Como sempre ouço dizer aos novos alunos de pós-graduação “saibam bem escolher seu orientador” e isso eu não tenho alguma dúvida de que fizemos certo, pois sou feliz por ter escolhido a Prof. Renée e por ela ter me escolhido e confiado em mim. Agradeço imensamente por ter essa oportunidade em tê-la tanto em minha vida acadêmica, mas também em minha vida.

Ao meu co-orientador Prof. Carlos Eduardo Fonseca Alves, pela enorme paciência, pelo respeito e amizade.

À professora Angelica Wouters, por todos esses anos caminhando nessa jornada patológica junto comigo, a quem devo toda gratidão pelos ensinamentos, que são a base da minha breve caminhada como patologista.

Aos amigos antigos e aqueles que fiz durante essa breve caminhada pelo doutorado. A todos em Davis, que me acolheram como uma família e assim os tenho como minha família nos Estados Unidos.

A todos do Heyer-Laboratory na UC DAVIS, que por duas vezes me acolheram e me ensinaram muito, coisas que antes jamais imaginaria que poderia aprender. E em especial ao Dr. Wolf, que desde o início me disse que

o objetivo era eu crescer profissionalmente. E ao grande amigo que fiz João (Jao), tenho a imensa certeza de que tua amizade e parceria no laboratório fez uma enorme e positiva diferença para minha vida, assim como para este trabalho.

A CAPES, pela bolsa de doutorado concedida durante esses anos. Agradeço pela oportunidade de ter recebido bolsa de Capacitação e do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, bolsa PDSE/CAPES 88887.570734/2020-00.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Glândula Mamária Canina, Carcinoma Inflamatório Canino.....	16
Figura 2: Revisão dos diferentes tipos de danos e vias de reparos de DNA.....	19
Figura 3: Resumo das vias de reparo em quebras duplas de fita de DNA	20
Figura 4: Via de reparo de quebras duplas de fita de DNA por meio da recombinação homóloga.....	22
Figura 5: Estrutura genômica do gene BRCA2 em cão e posições das variações genéticas dentro do Éxon 11.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

CIM – Carcinoma Inflamatório Mamário

DSB – *Double Strand Break*

NHEJ – *Non-Homologous End-Joining*

RH – Recombinação Homóloga

FFPE – Formalin Fixed Paraffin Embedded

IHC - Imunohistoquímica

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I.....	12
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Carcinoma Mamário	13
2.1.1 Carcinoma Inflamatório Mamário	15
2.2 Estabilidade Genômica	16
2.2.1 Mutações de DNA	17
2.2.2 Reparo de quebras duplas de fita de DNA	18
2.2.3 Mecanismos de Reparo de DNA	19
2.2.4. Recombinação Homóloga	22
2.1.3. BRCA2 e RAD51	23
OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO II – TRABALHO CIÊNTIFICO 1	27
1. Introduction	28
2. Material and Methods	29
3. Results	31
4. Discussion	35
5. Conclusion.....	36
References.....	37
CAPÍTULO III – TRABALHO CIÊNTIFICO 2	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos	43
3. Resultados	47
4. Discussão	52
5. Conclusão.....	53
Referências.....	54
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS	59

TEODORO T.G.W. **Estudo do uso dos genes *RAD51* e *BRCA2* como preditivos em carcinoma inflamatório mamário de cadelas, análise da expressão do *RAD51* e quantificação molecular em linhagens celulares neoplásicas de cães.** Botucatu, 2023, 63 p. Tese (Doutorado) _ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As neoplasias de glândula mamária estão entre as neoplasias mais comuns em humanos e cães sendo que, nas cadelas, aproximadamente 53,3% são malignas. Variantes de tumores mamários malignos em cadelas, assim como em humanos, podem ter origem em mutações genéticas. Em humanos é estimado que 45 a 65% das mulheres com mutações no gene *BRCA2* podem desenvolver algum tipo de neoplasia maligna de mama aos 70-80 anos. Em cães, diversas variações nas repetições de BRC já foram identificadas em tumores mamários. Dentre os diversos tipos de carcinoma mamário em cães o carcinoma inflamatório mamário se caracteriza como entidade clinicopatológica com curso clínico fulminante e manifestação repentina. Em humanos e em cães o carcinoma inflamatório mamário é também considerado uma forma agressiva de câncer de mama. Baseado nas semelhanças clínicas e histológicas tem sido proposto que o carcinoma mamário inflamatório de cadelas seja utilizado como modelo de estudo para humanos. Este trabalho visa caracterizar, pela técnica de imuno-histoquímica, a expressão das proteínas *BRCA2* e *RAD51* em amostras de carcinomas inflamatórios mamários caninos, comparando-as com glândulas mamárias caninas sem lesão e com adenomas mamários, a fim de estabelecer essas proteínas como alvos preditivos. Também foram realizados a técnica da PCR e o sequenciamento do gene *BRCA2* para a identificação de possíveis mutações nestas amostras e assim associar os dados das imunoexpressões com possíveis mutações encontradas. Abundância da expressão de moléculas *RAD51* foi observada por Western-Blotting em diferentes linhagens celulares tumorais caninas, auxiliando no entendimento desta proteína em cães.

Palavras-chave: Câncer de mama, estabilidade genética, *BRCA2*, *RAD51*, cães

TEODORO T.G.W. Study of the use of the RAD51 and BRCA2 genes as predictive targets in inflammatory canine mammary carcinoma, analysis of RAD51 expression and molecular quantification in dog tumor cell lines. Botucatu, 2023, 63 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Mammary neoplasms are among the most common tumors in humans and dogs. In female dogs, the most frequent tumors are mammary neoplasms, of which approximately 53.3% are malignant. Variants of malignant breast tumors, as in humans, can originate from genetic mutations. In humans, it is estimated that 45 to 65% of women with mutations in the BRCA2 gene may develop some type of breast cancer at 70-80 years of age. In dogs, several variations in BRC repeats have already been identified in canine mammary tumors. Among dogs' different mammary carcinomas, inflammatory mammary carcinoma is a clinicopathological entity with a fulminant clinical course and sudden manifestation. In humans and dogs, inflammatory mammary carcinoma is also considered an aggressive form of breast cancer. Based on clinical and histological similarities, it has been proposed that inflammatory mammary carcinoma in female dogs be used as a study model for humans. This work aims to characterize, using the immunohistochemical technique, the expression of BRCA2 and RAD51 proteins in samples of canine mammary inflammatory carcinomas, comparing them with mammary glands without lesions and mammary adenomas to establish these proteins as predictive targets. The PCR and sequencing of the BRCA2 gene were also carried out to identify possible mutations and thus associate the immunoexpression data with possible mutations found. Abundant expression of RAD51 molecules was observed in different canine tumor cell lines by Wester-Blotting. It aims to assist in the understanding of this protein in dogs.

Keywords: Breast cancer, genetic stability, BRCA2, RAD51, dogs

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O tumor de glândula mamária é uma das neoplasias mais comuns em humanos e em cães. Em cadelas, os cânceres de mama podem constituir cerca de metade de todos os tipos de câncer (MOULTON *et al.*, 1970; GILBERTSON *et al.*, 1983; PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2010). Em nenhuma outra espécie mamífera é relatado o desenvolvimento natural de tumores de glândula mamária com incidência tão elevada como ocorre em cadelas. Os tumores mamários em cadelas têm grande importância na veterinária, devido a possibilidade terapêutica e maior sobrevivência desses animais, assim como os tumores nesses animais servem de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (MARTINS; FERREIRA 2003). Os tumores malignos de glândula mamária em cadelas representam cerca de 50% das neoplasias malignas na espécie (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento dos carcinomas mamários é multifatorial (BORGE *et al.*, 2011). Contudo, sabe-se que há vários genes associados à incidência de tumores mamários malignos em humanos, assim como em cadelas. Em humanos, o câncer de mama possui padrão genético estabelecido, enquanto na Medicina Veterinária este padrão ainda não está completamente elucidado. Dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*, estão significativamente associados a tumores mamários malignos em cães (FORD *et al.*, 1998). A necessidade de se estabelecer um padrão genético em tumores mamários em cães se torna importante para melhor compreensão, bem como para a identificação e a seleção de possíveis genes preditivos. A seleção de

alvos preditivos tem como objetivo auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no tratamento.

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As utilizações da expressão das proteínas BRCA2 e RAD51 por meio da imuno-histoquímica apresenta significativa relevância como alvos preditivos para Carcinomas Inflamatórios Mamários Caninos, pois permite inferir sobre a estabilidade genômica das amostras analisadas e assim nortear o protocolo terapêutico a ser utilizado. Por exemplo, em casos de mutações do gene *BRCA2* é recomendada a utilização de PARPi como tratamento.

No entanto, são necessários maiores estudos para o entendimento de mutação pontuais e, assim, conhecer a significância dessa alteração nas funções das vias estudadas.

A quantificação das moléculas de RAD51 em células caninas disponibiliza um novo dado sobre o funcionamento molecular dessa proteína e

da via de Reparo Homólogo em cães. O conhecimento de que cães possuem aproximadamente 7×10^4 moléculas de RAD51 por célula, abrem-se novos caminhos para o entendimento dessas vias de Reparo Homologo em cães.

REFERÊNCIAS

- 1.ANDERS, C.; ADAMO, B.; KARGINOVA, O.; DEAL, A.M.; RAWAL, S.; DARR, D.; SCHORZMAN, A.; SANTOS, C.; BASH, R.; KAFRI, T.; CAREY, L.; MILLER, C.R.; PEROU, C.M.; SHARPLESS, N.; ZAMBONI, W.C. Pharmacokinetics and Efficacy of PEGylated Liposomal Doxorubicin in an Intracranial Model of Breast Cancer. **Plos One**, V.8(5), e61359, 2013.
- 2.BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D.; VIENS, P. Gene expression profiling of inflammatory breast cancer. **Cancer**, v.116, p.2783-2793,2010.
- 3.BIANCO, P.R.; TRACY, R.B.; KOWALCZYKOWSKI, C.S. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. **Front. Biosci**, v.3, p.D570–D603,1998.
- 4.BIGNELL, G.; MICKELM, G.; STRATTON, M.R.; ASWORTH, A.; WOOSTER, R. The BrC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. **Hum Mol Genet**, v.6, p.53-58, 1997
- 5.BORGE, K.S.; BØRRESEN-DALE, A.L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumor. **Vet Comp Oncol**, v.9, n.4, p.241–250, 2011.
- 6.BROOKER, R.J. **Genetics analysis and principles**. New York: McGraw-Hill, 2021, 7th ed, chap 19, p.472.
- 7.BROSE, M.S.; REBBECK, T.R.; CALZONE, K.A.; STOPFER, J.E.; NATHANSON, K.L.; WEBER, B.L. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. **J Natl Cancer Inst**, v.94, p.1365-1372, 2002.
- 8.SOUZA, C.H.M.; TOLEDO-PIZA, E.; LAUFER-AMORIM R.; BARBOZA, A.; TOBIAS, K.M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **CVJ**, v.50, p. 506-510, 2009 .
- 9.CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis, and treatment of canine mammary tumors. **Braz J Vet Pathol**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.
- 10.CHRISP, C.E.; SPANGLER, W.L. **The malignant canine mammary tumor as a model for the study of human breast cancer**. In: SHIFRINE, M.; WILSON, F.D. The Canine as a Biomedical Research Model: Immunological, Hemato- logical and Oncological Aspects. Oak Ridge (TN): Technical Information Center/U.S. Department of Energy (Dist. by National Technical Information Service/U.S. Department of Commerce, Springfield, VA), 1980;p. 331–49.
- 11.CRITCHLOW, S.E.; JACKSON, S.P. DNA end-joining: from yeast to man. **Trends Biochem Sci**, v.23, p.394–398, 1998.
- 12.CONSTANTINESCU, G.M.; SCHALLER, O. **Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature**. Stuttgart, Germany: Ferdinand Enke; 1992.
- 13.DAVIES, A.A.; MASSON, J.Y.; MCILWRAITH, M.J.; STASIAK, A.; VENKITARAMAN, A.R.; WEST, S.C. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. **Mol Cell**, v.7, p.273–282, 2001.
- 14.ENGINLER, S.O.; AKIS, I.; TOYDEMIR, T.S.; OZTABAK, K.; HAKTANIR, D.; GUNDUZ, M.C.; KIRSAN, I.; FIRAT I. Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. **Vet Res Commun**, v.38:1, p21–27, 2014.
- 15.FRESE K. Comparative pathology of breast tumors in domestic animals. **Verh Dtsch Ges Pathol**, v.69, p.152–70, 1985.

- 16.FORD, D.; EASTON, D.F.; STRATTON, M.; NAROD, S.; GOLDGAR, D.; BISHOP, D.T.; WEBER, B.; LENOIR, G.; CHANG-CLAUDE, J.; TEARE, M.D.; ARASON, A.; SCHERNECK, S.; PETO, J.; REBBECK, T.R.; TONIN, P.; NEUHAUSEN, S.; BARKARDOTTIR, R.; EYFJORD, J.; PONDER, B.A.; GAYTHER, S.A. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. **Am J Hum Gen**, v.62, p.676–689, 1998.
- 17.GILBERTSON, S.R.; KURZMAN, I.D.; ZACHRAU, R.E.; HURVITZ A.I.; BLACK, M.M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Vet Pathol**, v.20, p.127–142, 1983.
- 18.GRIFFITHS, A.J.F.; DOEBLEY, J.; PEICHEL, C.; WASSARMAN, D.A. **DNA damage, repair, And mutation. Introduction to Genetic Analysis**, 12ed, W.H. Freeman and Company, New York, 2020, pp. 515-523.
- 19.GOLDSCHMIDT, M.; PENA, L.; RASOTTO, R. Classification and grading canine mammary tumors. **Vet Pathol**, v.48, n.1, p.117-131, 2011.
- 20.GOLDSCHMIDT *et al.* Tumor of the mammary gland. In: Meuten D.J. **Tumors in domestic animals**. Wiley Blackwell (ed.), Ames, Iowa, 5^a ed., p.723-729, 2017.
- 21.HAGA, S.; NAKAYAMA, M.; TATSUMI, K.; MAEDA, M.; IMAI, S.; UMESAKO, S.; YAMAMOTO H; HILGERS, J.; SARKAR, N.H. Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors. **Oncol Rep**, v.8:6,p.1215–1219, 2001.
- 22.HALL, J.M; LEE, M.K.; NEWMAN, B.; MORROW, J.E.; ANDERSON, L.A.; HUEY, B.; KING, M.C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v.250, p.1684–1689, 1990.
- 23.TAYMAZ-NIKEREL, H.; KARABEKMEZ, M.E.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. **Plos One**, v.8:13672, 2018.
- 24.HUSSAIN, S.; SAXENA, S.; SHRIVASTAVA, S.; MOHANTY, A.K.; KUMAR, S.; SINGH, R.J.; KUMAR, A.; WANI, S.A.; GANDHAM, R.K.; KUMAR, N.; SHARMA, A.K.; TIWARI, A.K.; SINGH, R.K. Gene expression. Profiling of spontaneously occurring canine mammary tumours: Insight into gene networks and pathways linked to cancer pathogenesis. **Plos One**, v.13, n.12, p.1-30, 2018.
- 25.HSU, W.; HUANG, Y.; CHANG, T.; WONG, M.; CHANG, S. Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. **Vet J**, v.184, p.351-356, 2010.
- 26.JEGGO, P.A. DNA breakage and repair. In: HALL, J.C.; FRIEDMANN, T.; DUNLAP, J.C.; GIANNELLI, F. **Advances in Genetics**, vol. 38, Academic Press, San Diego, 1998, pp. 185–218.
- 27.KIM, S.; KIM, S.; KIM, B.; RAH, S.; CHUNG, S.M.; IM, M.; KIM; U. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. **Exp Mol Med**, v.38, p.535–545, 2006.
28. LAERE, S.; AUWERA, I.V.; VAN DE EYNDEN, G.G.; FOX, S.B.; BIANCHI, F.; HARRIS, A.L.; VAN DAM, P.; VAN MARCK, E.; VERMEULEN, P.B.; DIRIX, L.Y. Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v.93, p.237-246, 2005.
- 29.LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S.; KARLSSON, E.K.; JAFFE, D.B.; KAMAL, M.; *et al.* Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v.438:7069, p.803–819, 2005.

- 30.MARCONATO, L.; ROMANELLI, G; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G.; FINOTELLO, R.; VERGANTI, S.; VALENTI, P.; CIARAMELLA, L.; ZINI, E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). **J Am Vet Med Assoc**, v.235, n.8, p.967-972, 2009.
- 31.MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Sci Vet**, v.31, p.189-191, 2003.
- 32.MIKI, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v.266, p.66–71, 1994.
- 33.MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J., ed. Tumors in Domestic Animals. 4th ed. Ames: Iowa State Press; 2002:575–606, 764.
- 34.MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E.; *et al.* **Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat**. Vol 7. Washington, DC: Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization; 1999.
- 35.MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility** 57 (Suppl.), 439–443, 2001.
- 36.MORRISON, C.; TAKEDA, S. Genetic analysis of homologous DNA recombination in vertebrate somatic cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v.82, p.817–831, 2000.
- 37.MOULTON, J.E.; TAYLOR, D.O.; DORN, C.R.; ANDERSEN, A.C. Canine mammary tumors. **Vet Pathol**, v.23, p.289–320, 1970.
- 38.NEWMAN, B.; MILLIKAN, R.C.; KING, M.C. Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. **Epidemiol Rev**, v.19, p.69-79, 1997.
- 39.NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. **Double-strand break and recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae***. In: NICKOLOFF, J.A.; HOEKSTRA, M.F. (Eds.), DNA Damage and Repair: DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukaryotes, vol. 1, Human Press, Totowa, NJ, 1998, pp. 335–362.
- 40.OCHIAI, K.; MORIMATSU, M.; YOSHIKAWA, Y.; SYUTO, B.; HASHIZUME K. Brca2 C-terminus interacts with Rad51 and contributes to nuclear focus formations in double-strand break repair of DNA. **Biomed Res**, v.25, n.6, p.269-275, 2004.
- 41.OCHIAI, K.; YOSHIKAWA, Y.; OONUMA, T.; TOMIOKA, Y.; HASHIZUME, K.F.; MORIMATS, M. Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. **Vet J**. v.190, p.293-295, 2011.
- 42.PELLEGRINI, L.; YU, D.S.; LO, T.; ANAND, S.; LEE, M.; BLUNDELL, T.L.; VENKITARAMAN, A.R. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. **Nature**, V.420, P.287–293, 2002.
- 43.PEÑA, L.; PEREZ-ALENZA, M.D.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; NIETO, A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. **Breast Cancer Res Treat**, v.78, p.141-148, 2003.
- 44PÉREZ-ALENZA, M.D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). **J Am Vet Med Assoc**, v.219, n.8, p.1110-1114, 2001.

45. PÉREZ-ALENZA, M.D.; JIMÉNEZ, A.; NIETO, A.I.; PEÑA, L. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. **Breast Cancer Res**, v.6, n.4, p.R300-R307, 2004.
46. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chem Biol**, v.17(5), p.421-33, 2010.
47. RAJAN, J.V.; MARQUIS S.T.; GARDNER, H.P.; CHODOSH, L.A. Developmental expression of Brca2 colocalizes with Brca1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. **Dev Biol**, v.184, p.385–401, 1997.
48. RAPOSO, T.P.; ARIAS-PULIDO, H.; CHAHER, N.; FIERING, S.N.; ARGYLE, D.J.; PRADA, J.; PIRES, I.; QUEIROGA, F.L. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. **Semin Oncol**, v.44, p.288-300, 2017.
49. REHM, S.; STANISLAUS, D.J.; WILLIAMS, A.M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v.80, p.233–245, 2007.
50. RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; FALL, T.; HÄGGSTRÖM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; EULER, E. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Res**, v.69, n.22, p.8770-8774, 2009.
51. SANTOS, M.; MARCOS, R.; FAUSTINO, A.M.R. Histological study of canine mammary gland during the oestrous cycle. **Reprod Dom Anim**, v.45, p.146–154, 2010.
52. SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINEHATA, K.; YAZAWA, M.; ISHIZAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **Am J Vet Res**, v.62(3), p.433–9, 2001.
53. SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Vet Pathol**, v.48, p.85–97, 2011.
54. SUSANECK S.; *et al.* Inflammatory mammary carcinoma in the dog. **J Am Anim Hosp Assoc**, v.19, p. 971-976, 1983.
55. THOMPSON, L.H.; SCHILD, D. The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells, **Bio Chem**, v.81, p.87–105, 1999.
56. THOMPSON, L.H.; SCHILD, D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. **Mutat Res**, v.477, p.131–153, 2001.
57. VAN DEN BOSCH, M.; LOHMAN, P.H.M.; PASTINK, A. DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Biol Chem**, v.383, p.873–892, 2002.
58. VOS, J.H.; VANDENINGH, T.S.G.A.M.; MISDORP, W.; MOLENBEEK, R.F.; VAN MIL, F.N.; RUTTERMAN, G.R.; IVAYI, D.; RAMAEKERS, F.C. Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours. **Vet Q**, v.15, p.102–107, 1993.
59. WOOSTER, R.; WEBER, B.L. Breast, and ovarian cancer. **N Engl J Med**, v.348, p.2339–2347, 2003.

60.YOSHIKAWA, Y.; MORIMATSU, M.; OCHIAI, K.; NAGANO, M.; TOMIOKA, Y.; SASAKI, N.; HASHIZUME, K.; IWANAGA, T. Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. **Am J Vet Res**, v. 69, p.1323–1328, 2008.