

EXPRESIÓN DE *BRCA1* EN MUJERES CON NEOPLASIAS EPITELIALES DE OVARIO DEL ESTADO CARABOBO, VENEZUELA

ÁNGEL FERNÁNDEZ, EDDY MORA, JESÚS VILLEGAS, ZUNILDE SOLORZANO, ALDO REIGOSA

INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO", VALENCIA, VENEZUELA

RESUMEN

Entre el 5 % al 10 % de los tumores de ovario y mama son atribuidos a mutaciones heredadas en el gen *BRCA1*, que codifica una proteína con el mismo nombre, *BRCA1*. **OBJETIVO:** Evaluar la expresión de proteína *BRCA1* a través de la técnica de inmunohistoquímica, en mujeres con neoplasias epiteliales de ovario diagnosticadas en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" Valencia, Venezuela, en el período 2001-2014. **MÉTODO:** Se realizó un estudio de tipo descriptivo, transversal, de campo y retrospectivo. Se estudió la expresión de proteína *BRCA1* utilizando la inmunohistoquímica en 97 tumores epiteliales de ovario (54 benignos y 43 malignos). **RESULTADOS:** El 94 % de los tumores benignos presentaron disminución de expresión de la proteína en el núcleo y citoplasma de las células ováricas, por su parte, en los tumores malignos fue de 75 %. **CONCLUSIÓN:** Nuestro estudio demuestra que la inmunohistoquímica mostró ser una técnica capaz de detectar satisfactoriamente la expresión nuclear y citoplasmática de *BRCA1*. La validación de los resultados obtenidos, requiere estudios de biología molecular para complementar los objetivos alcanzados a través de la inmunohistoquímica.

PALABRAS CLAVE: *BRCA1*, ovario, neoplasia, inmunohistoquímica.

SUMMARY

Between 5 % to 10 % of the breast and the ovarian tumors are attributed to inherited mutations in the *BRCA1* gene, which encodes a protein with has the same name, *BRCA1*. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of the *BRCA1* protein through the immunohistochemistry procedure, in women with the epithelial ovarian neoplasms diagnosed at the Institute of Oncology "Dr. Miguel Perez Carreno" of Valencia, in Venezuela country, during the period from 2001 to 2014. **METHOD:** Is a descriptive study, cross sectional and retrospective field was performed. The *BRCA1* expression using immunohistochemistry protein in 97 epithelial ovarian tumors (benign 43 and malignant 54) was studied for us. **RESULTS:** In 94 % of the benign tumors had decreased protein expression in the nucleus and the cytoplasm of the ovarian cells, meanwhile, in the malignant tumors was 75 %. **CONCLUSION:** Our study demonstrated that the immunohistochemistry was shown to be a technique capable of successfully detecting the nuclear and the cytoplasmic expression of the *BRCA1*. The validation of the results obtained, requires for molecular biology studies to complement the objectives achieved through the immunohistochemistry.

KEY WORDS: *BRCA1*, ovarian, neoplasia, immunohistochemistry.

Recibido: 26/09/2016 Revisado:18/10/2016

Aceptado para publicación:19/11/2016

Correspondencia: Dr. Ángel Fernández. Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", Valencia,

Estado Carabobo. Tel: +58-0426-7309525. E-mail: angelbiouc@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario representa la séptima neoplasia más recurrente en las mujeres y es el segundo cáncer ginecológico más común, responsable de aproximadamente 140 000 muertes al año en todo el mundo ⁽¹⁾. En Venezuela, ocupa la tercera posición en la esfera ginecológica ⁽²⁾. Las lesiones derivadas del epitelio ovárico, representan las dos terceras partes de todos los tumores primarios de ovario ⁽³⁾. Entre el 75 %-85 % de las lesiones derivadas del epitelio presentan un comportamiento benigno, el resto tiene una conducta incierta y otros se malignizan con el tiempo ^(4,5).

Actualmente, se desconoce exactamente cuáles son las causas de la mayoría de los tumores de ovario, sin embargo, se considera un origen molecular en el interior de las propias células y un origen externo, cuya iniciación y desarrollo se relacionan con diversos factores, como la edad, nuliparidad, infertilidad, estrógenos, herencia y medio ambiente, quienes constituyen algunos de los factores etiológicos independientes para el desarrollo de esta patología ⁽⁶⁻¹¹⁾.

Aproximadamente, del 5 % al 10 % de todos los casos de cáncer de ovario son atribuidos a síndromes hereditarios con transmisión autosómica dominante asociado a la mutación en los genes *BRCA 1* y *BRCA 2* (*Breast Cancer*, por sus siglas en inglés), ambos son los factores de riesgo genético conocidos más estrechamente asociados al cáncer de ovario y mama. Las mujeres con una mutación *BRCA1* tienen un riesgo aproximado del 12 %-60 % para desarrollar cáncer de ovario, en comparación con el riesgo general de la población el cual es de aproximadamente 2 % ⁽¹²⁾.

BRCA1 (localizado en el cromosoma 17) y *BRCA2* (cromosoma 13), pertenecen al grupo de los genes supresores de tumores, cuya función clave es el mantenimiento de la integridad del

ácido desoxirribonucleico (ADN). Estos genes codifican proteínas, las cuales están implicadas en la reparación de roturas del ADN de doble cadena. Asimismo, son miembros de una compleja red de proteínas asociadas a múltiples funciones, como la regulación de la transcripción, remodelado de la cromatina, control del ciclo celular, regulación de centrosomas, inducción de la apoptosis y ubiquitinización, entre otros ^(7,13). De modo que la inhibición del *BRCA1* causa un aumento de la proliferación de células del epitelio ovárico tanto normales como cancerosas ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación del ADN son los métodos ideales para la evaluación del gen *BRCA*. Sin embargo, estos análisis son costosos, lo que ha determinado el empleo de otras técnicas, como por ejemplo, la inmunohistoquímica (IHQ) ⁽¹⁸⁻²¹⁾. Finalmente, el propósito de esta investigación fue evaluar la proteína *BRCA1* en matrices de tejidos a través de la IHQ en mujeres con tumores epiteliales benignos y malignos de ovario, considerando que no se han divulgado estudios en el país sobre la expresión del gen *BRCA1* en mujeres con cáncer o con patología ovárica benigna.

MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, de campo y retrospectivo. Se conformó una muestra no aleatoria, de tipo intencional, con seguimiento en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia, Venezuela, entre los años 2001-2014, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: a. Sexo femenino b. Diagnóstico de lesiones benignas (serie benigna) o malignas (serie maligna) epiteliales de ovario. c. Disponibilidad de las preparaciones histológicas y bloques de parafina respectivos correspondiente al diagnóstico inicial en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica

del Instituto.

Para la realización de la investigación, se contó con la aprobación del Comité de Ética y de la Comisión de Investigación del IOMPC. Asimismo, se obtuvo el dictamen inicial favorable de la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

Construcción de la matriz de tejidos. Las muestras tisulares se fijaron en formol y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina, se obtuvieron secciones histológicas de 4 μm de espesor que posteriormente se colorearon con hematoxilina-eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcando esas mismas áreas en el bloque de parafina, a fin de construir las matrices de tejido.

Las matrices de tejido y la IHQ se realizaron en el CIMBUC, siguiendo el siguiente procedimiento: se prepararon los bloques receptores o bloques únicamente de parafina. Seguidamente, se ubicó la serie de bloques donantes y separaron en grupos. En cada tumor se seleccionaron dos zonas diferentes en el bloque de tejido (bloque donante). Se estableció el orden de estos bloques en una planilla que sirvió después para su lectura en el microscopio. Luego, se realizó el troquelado de los bloques.

Con la aguja hueca se extrajo un cilindro de parafina del bloque receptor dejando el espacio donde se introducen los cilindros obtenidos de los bloques donantes. Con otra aguja de menor calibre se obtuvo el cilindro con el material de la zona marcada del bloque donante que se introdujo en el bloque receptor. Los cilindros fueron colocados al mismo nivel que el bloque de parafina para facilitar el corte de todos ellos. Al culminar el proceso de troquelado de todos los bloques, se llevó el nuevo bloque en la estufa a una temperatura de 45° durante 5 min para que la parafina de los cilindros y del bloque receptor se amoldaran y la superficie se alisara (Figura 1). Finalmente, se procedió a realizar la técnica de IHQ.

Inmunohistoquímica. Se utilizó el método inmunohistoquímico de la estreptavidina biotina-peroxidasa, con el sistema *Immunon de DakoCytomation®* según el protocolo indicado por la casa comercial. Luego de la desparafinación e hidratación de las muestras, la recuperación antigénica se realizó en baño de agua (*Isotemp Water Bath, modelo Isotemp 205, Fisher Scientific®*), colocando las preparaciones en vasos coplin con buffer citrato a pH 6 por 40 min, precalentado a 95-99°C. Una vez terminada la recuperación antigénica, se efectuó la incubación con el anticuerpo monoclonal primario *BRCA1* (clon MS110), previamente diluido con la solución *Van Gogh Yellow*. Las

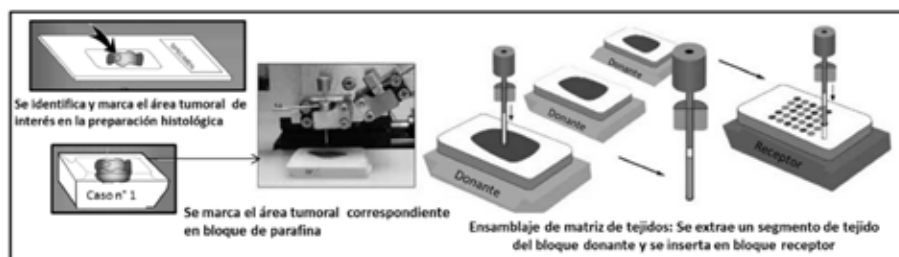


Figura 1. Representación esquemática de la construcción de matrices de tejidos.

muestras se lavaron con tampón fosfato salino y se añadió el anticuerpo secundario conjugado. Por último, el revelado de la reacción se realizó con la aplicación del cromógeno diaminobencidina durante 5 min. Finalmente, se llevó a cabo la contra tinción de las secciones tisulares con hematoxilina.

Interpretación de los resultados del estudio inmunohistoquímico. Para realizar la valoración de la expresión de *BRCA1* en tumores de ovario, se consideró los estándares establecidos en diversas publicaciones internacionales ⁽²²⁻²⁵⁾, constituyendo un resultado positivo cuando exista >10 % de inmunexpresión nuclear y refiriendo el resultado negativo cuando haya expresión en ≤10 % en los núcleos de las células tumorales. Diversos trabajos han indicado la presencia de *BRCA1* en el citoplasma. En este sentido, se considerará, de igual forma al marcaje nuclear, un resultado positivo cuando exista >10 % de inmunexpresión citoplasmática y negativo cuando ocurra expresión en ≤10 % de los citoplasmas de las células tumorales.

Con una especificidad mayor al 90 %, en la literatura se ha publicado una correlación entre la amplificación del gen *BRCA1* utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la expresión de *BRCA1* por IHQ. Asimismo, la ausencia de amplificación debido a un gen anómalo (inducido por alteración de la metilación del promotor del gen o por mutaciones) se ha relacionado con una pérdida de la expresión de la proteína utilizando el anticuerpo monoclonal *BRCA1* (clon MS110) ⁽²³⁻²⁵⁾.

Análisis estadístico. El análisis de los datos recogidos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 22 (IBM *Statistical Package for Social Sciences*, Inc., Chicago, IL). Los resultados fueron expresados en frecuencias y porcentajes. Para establecer la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de *BRCA1* y la ubicación subcelular (núcleo y citoplasma) se utilizó la prueba Chi Cuadrado, considerando

significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

La edad media de las mujeres al momento de diagnóstico para la serie benigna fue de 43,11 años (rango de 15-79 años). Un 41 % tenía menos de 40 años y un 59 % igual o más de 40 años (Cuadro 1). Por su parte, en la serie maligna la media fue de 52,84 años (rango de 25-79 años). El 81 % de estas poseía una edad superior o igual a 40 años (Cuadro 2). En relación al subtipo histológico, el más frecuente fue el seroso para ambas series, benigna (80 %) y maligna (67 %). Alguna de las mujeres incluidas en este estudio poseían antecedentes familiares de cáncer.

La Figura 2 y 3 muestran ejemplos representativos de los patrones de expresión de *BRCA1* en matrices de tejidos y utilizando la inmunohistoquímica.

La expresión de *BRCA1* en los tumores benignos y malignos de ovario se presenta en el Cuadro 3. Más de la mitad de todos los casos benignos presentaron pérdida de la expresión del gen (59 % y 57 % de núcleo/citoplasma, respectivamente). En cambio en la serie maligna, menos de la mitad de los casos exhibieron disminución de la expresión del marcador (42 % y 47 % de núcleo/citoplasma, respectivamente).

Cabe destacar, que la intensidad de la tinción nuclear y en algunos casos citoplasmática fue homogénea y relativamente alta. Además, se observó tinción nuclear en las células del estroma y en los linfocitos de las secciones donde las células tumorales no tenían tinción para *BRCA1*, pudiéndose utilizar como control interno. Por otra parte, como se evidencia en el Cuadro 4, en 29 de 54 casos de tumores benignos (94 %), hubo una expresión nuclear y citoplasmática negativa, a su vez, en los casos malignos la negatividad en ambas localizaciones subcelulares se presentó en el 75 % de los casos, con $P < 0,001$.

Cuadro 1. Características clínico-patológicas de la serie benigna.

Variable		n (%)
Edad (años): media (rango)		43,11 (15-79)
Total de número de casos		54 (100)
Edad en años	<40	22 (41)
	≥40	32 (59)
Histología	Seroso	43 (80)
	Mucinoso	8 (15)
	Otros tipos	3 (5)
Antecedentes de familiares con cáncer (n= 48)	No	27 (56)
	Si	21 (44)
Antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario (n= 21)	No	19 (92)
	Si	2 (8)
Antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario (n= 2)	Primer grado	2 (100)
	Segundo grado	0 (0)

Cuadro 2. Características clínico-patológicas de la serie maligna.

Variable		n (%)
Edad (años): media (rango)		52,84 (25-79)
Total de número de casos		43 (100)
Edad en años	<40	8 (19)
	≥40	35 (81)
Histología	Seroso	29 (67)
	Mucinoso	5 (12)
	Endometroide	5 (12)
	Otros tipos	4 (9)
Antecedentes de familiares con cáncer (n= 39)	No	27 (69)
	Si	12 (31)
Antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario (n= 12)	No	6 (50)
	Si	6 (50)
Antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario (n= 6)	Primer grado	2 (33)
	Segundo grado	4 (67)

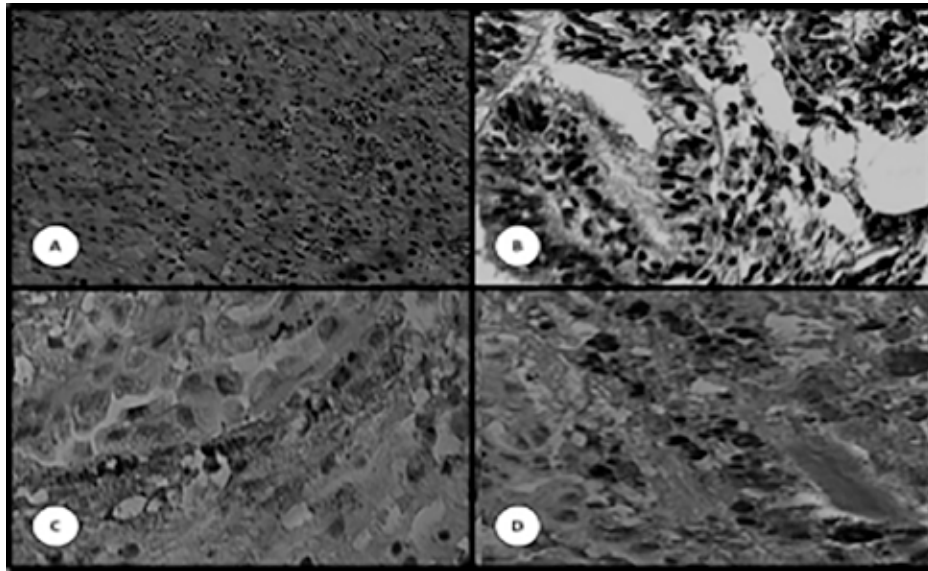


Figura 2. Expresión de BRCA1 por IHQ en matrices de tejidos. Serie benigna: (A) Citoplasma negativo, núcleo negativo. (B) Citoplasma negativo, núcleo positivo. (C) Citoplasma positivo, núcleo negativo y (D) Citoplasma positivo, núcleo positivo. Aumento original de 200x.

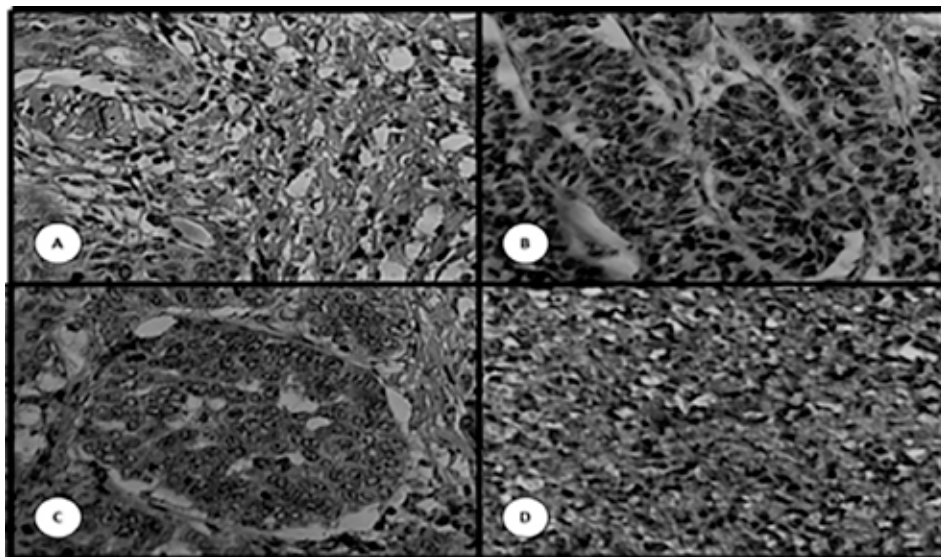


Figura 3. Expresión de BRCA1 por IHQ en matrices de tejidos. Serie maligna: (A) Citoplasma negativo, núcleo negativo. (B) Citoplasma negativo, núcleo positivo. (C) Citoplasma positivo, núcleo negativo y (D) Citoplasma positivo, núcleo positivo. Aumento original de 200x.

Cuadro 3. Expresión de *BRCA1* por inmunohistoquímica.

Serie	Resultado	[n (%)]	
		Nuclear	Citoplasmática
Benigna	Negativo	32 (59)	31 (57)
	Positivo	22 (41)	23 (43)
	Total	54 (100)	54 (100)
Maligna	Negativo	18 (42)	20 (47)
	Positivo	25 (58)	23 (53)
	Total	43 (100)	43 (100)

Cuadro 4. Relación de la localización de *BRCA1* con su expresión por inmunohistoquímica.

Serie	Localización	Resultado	[n (%)]		P
			Negativo	Positivo	
Benigna	Nuclear	Negativo	29 (94)	3 (13)	0,001
		Positivo	2 (6)	20 (87)	
		Total	31 (57)	23 (43)	
Maligna	Nuclear	Negativo	15 (75)	3 (13)	0,001
		Positivo	5 (25)	20 (87)	
		Total	20 (47)	23 (53)	

DISCUSIÓN

La detección de la disminución de la proteína *BRCA1* en tumores de ovario tiene un valor pronóstico y terapéutico para las mujeres que lo padecen, por ende, recientes investigaciones certifican la factibilidad del uso de la IHQ como un método más económico y rápido para la evaluación de la expresión de esta proteína, en comparación con las técnicas actuales de análisis del ADN ⁽²⁴⁻³⁰⁾.

En relación a las variables clínico-patológicas incluidas en este estudio, se observa que la edad media de las mujeres con tumores benignos fue de 43,11 años, mientras que para las mujeres con

diagnóstico de cáncer fue de 52,84 años. Estos hechos concuerdan con otras publicaciones en donde la media se encuentra alrededor de los 40 años para el diagnóstico de un tumor benigno y entre 50 y 70 años para tumores malignos ^(1,4). Asimismo, según Daly y cols. ⁽³⁰⁾, las neoplasias de ovario hereditarias asociadas a mutaciones en el gen *BRCA1* tienden a aparecer a una edad más temprana que el cáncer de ovario esporádico (es decir, de 10 a 15 años antes), sumado a ello existe el riesgo de padecer de otros tipo de tumores.

La frecuencia de los subtipos histológicos para ambas series fue similar a los encontrados en diversas publicaciones, en donde predominaron los tumores serosos ⁽³¹⁻³⁷⁾. Múltiples trabajos

sugieren que en el subtipo seroso se puede demostrar una mayor pérdida de expresión de *BRCA1* en comparación con los otros subtipos celulares⁽³³⁾. En contraste con estas investigaciones, en este estudio se evidenció que menos de la mitad de los casos malignos mostraron pérdida de la expresión de la proteína. En la literatura consultada, no se encontró referencias en relación con la pérdida de expresión del gen *BRCA1* en los tumores serosos de naturaleza benigna.

Los intentos de definir el significado pronóstico del estado de la mutación *BRCA1* en el cáncer de ovario han producido resultados contradictorios⁽³⁸⁻⁴¹⁾. En este trabajo, se observó una mayor pérdida de expresión en los tumores benignos con respecto a los malignos, lo que coincide con Sirisabya y col.⁽²⁹⁾, quienes no encontraron correlación entre la expresión del gen *BRCA1* y los tumores malignos. Por su parte, en otros estudios como los de Pradhatmo y cols.⁽³⁷⁾ y Werness y col.⁽⁴⁰⁾, sí encontraron una relación entre estos últimos.

Teniendo en cuenta el hecho que aún no se tienen estudios preliminares publicados en Venezuela respecto a la expresión de *BRCA1* en la población femenina venezolana, se requieren otras investigaciones con series más grandes, para llegar a conclusiones sobre su posible utilidad pronóstica y/o predictiva.

Además, con los resultados obtenidos en este estudio no se puede concluir *a priori* que la IHQ haya fallado en la detección del estado de *BRCA1*, generando posibles falsos negativos, debido a que es probable que en algunos casos la causa de la ausencia de expresión sea debida a la calidad del material histológico. Para la correcta interpretación de los resultados, debe contemplarse que se valoró por primera vez la proteína *BRCA1* en el CIMBUC, la disponibilidad de los reactivos era limitada para poder repetir las reacciones; no se contó con estudios de biología molecular para poder corroborar los

resultados de la IHQ, y en definitiva, los mismos factores que influyen en el resultado de la IHQ (fijación de la muestra, almacenamiento de las mismas, recuperación antigénica, tipo de anticuerpo, sistema de medición y variabilidad de interpretación entre los observadores), los cuales también pudieron incidir en los resultados obtenidos⁽³⁷⁻⁴⁰⁾.

En cuanto a la localización de *BRCA1*, se ha descrito que puede encontrarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células epiteliales ováricas. La expresión exclusivamente nuclear podría considerarse que representa el fenotipo normal para el estado de *BRCA1*, debido a que la localización habitual de esta es el núcleo de la célula, en donde se encarga del mantenimiento de la integridad del genoma, control del ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN^(39,42). Sin embargo, en años anteriores se creía que *BRCA1* se encontraba solamente en el núcleo y que la tinción citoplasmática era un artefacto técnico. Actualmente, se sabe que debido a las mutaciones que afectan al gen, la proteína *BRCA1* no entra al núcleo, permaneciendo en el citoplasma de la célula^(43,44).

En este estudio se encontró un porcentaje importante de expresión de la proteína tanto en el núcleo como el citoplasma, lo cual está en concordancia con algunos estudios anteriores que utilizaron la IHQ⁽⁴²⁻⁴⁶⁾. Por ejemplo, Saeed y col.⁽³⁶⁾, quienes evaluaron la especificidad y sensibilidad de la IHQ como método de cribado para la evaluación de la expresión del gen *BRCA1*, llegaron a la conclusión de que el anticuerpo monoclonal (clon MS110) era el único anticuerpo cuya positividad se correlaciona significativamente con los resultados de la PCR⁽³⁹⁾.

En la actualidad, existen posibles ventajas de este análisis en la práctica clínica, considerando que en las mujeres con cáncer, una reducción de la expresión de la proteína *BRCA1* podría estar asociada al desarrollo de cáncer de mama

bilateral y de ovario, lo cual hace necesario el monitoreo exhaustivo a fin de evitar futuras complicaciones en las mujeres ya afectadas con la enfermedad. Asimismo, la detección de una posible mutación del gen, permitiría realizar la pesquisa de alteraciones genéticas en los familiares, para la prevención en estos, contribuyendo de esta forma con la mujer y el entorno familiar que la rodea ^(32,45,46).

Finalmente, es necesario continuar investigando las estrategias dirigidas a la detección precoz de las neoplasias asociadas a los genes *BRCA*. La validación de los resultados obtenidos en el presente trabajo, requiere de estudios de biología molecular para complementar los objetivos alcanzados a través de la IHQ, lo que probablemente permitirá avanzar en el establecimiento de una conducta preventiva individualizada y aproximarnos a un diagnóstico precoz de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal que labora en el Servicio de Anatomía Patológica del IOMPC y a la Lic. Mirlan Remanton y Mai Lyng Hung del CIMBUC, encargadas de los cortes histológicos y realización de la técnica de inmunohistoquímica, respectivamente.

REFERENCIAS

- Sarmiento F, Santillán J, Mendieta H, Hernández M. Navarra. NF- κ B e IKK asociadas con baja respuesta al tratamiento con compuestos de platino en cáncer epitelial de ovario. *Rev Med Inv.* 2014;2:174-181.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de mortalidad 2012. Disponible en: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=11:anuarios-demortalidad.
- Sharma S, Shalini R, Tusha S, Neerja G, Sarla A, Basu D. Role of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in epithelial ovarian cancer in Indian population: A pilot study. *Int J Biochem Mol Biol.* 2014;5:1-10.
- Bajo J, Xercavins M, Vicens L. José María Fundamentos de Ginecología. España: Médica Panamericana; 2009.
- Jonathan S. Ginecología de Novak. 15ª edición. España: McGraw-Hill; 2013.
- Yuan-Yuan F, Fang-Fang B, Yi-Ming Z, Wu-Ping S, Chun-Yan L, Qian L, et al. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) may affect DNA methyltransferase 1 through regulation of BRCA1 in ovarian cancer. *Am J Cancer Res.* 2015;5:1199-1206.
- Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type I and Type II. *Biomed Res Int.* 2014;934261.
- Okamoto T, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Kondoh H, Amano Y, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2013;54:35-49.
- Lim D, Oliva E. Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma. *Pathology.* 2013;45:229-242.
- Chene G, Dauplat J, Radosevic-Robin N, Cayre A, Penault-Llorca F. Tu-be or not tu-be: That is the question... about serous ovarian carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013; 88:134-143.
- Flesken-Nikitin A, Hwang C, Cheng C, Michurina T, Enikolopov G, Nikitin A. Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche. *Nature.* 2013; 495:241-245.
- Scumaci D, Tammè L, Fiumara C, Pappaianni G, Concolino A, Leone E, et al. Plasma proteomic profiling in hereditary breast cancer reveals a BRCA1-specific signature: Diagnostic and functional implications. *PLoS One.* 2015;10:e0129762.
- Jiang Q, Greenberg R. Deciphering the BRCA1 Tumor suppressor network. *J Biol Chem.* 2015;17:17724-17732.
- Trainer A, Thompson E, James PA. BRCA and beyond: A genome-first approach to familial breast cancer risk assessment. *Discov Med.* 2011;12:433-443.
- Van der Groep P, Van der WE, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2011;34:71-88.
- Chiang H, Elledge R, Larson P, Jatoi I, Li R, Hu Y. Effects of radiation therapy on breast epithelial cells in BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9:25-29.
- Marth C, Hubalek M, Petru E, Polterauer S, Reinthaller A, Schauer C, et al. AGO Austria recommendations for genetic testing of patients with ovarian cancer.

- Wien Klin Wochenschr. 2015;127:652-654.
18. Rademakers S, Rijken P, Peeters W, Nijkamp M, Barber P, Van der Laak J, et al. Parametric mapping of immunohistochemically stained tissue sections; a method to quantify the colocalization of tumor markers. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011;34:119-129.
 19. Prasad K, Tiwari A, Ilanthodi S, Prabhu G, Pai M. Automation of immunohistochemical evaluation in breast cancer using image analysis. *World J Clin Oncol*. 2011;2:187-194.
 20. Fernández A, Reigosa A. Clasificación molecular del cáncer de mama, obtenida a través de la técnica de hibridación in situ cromogénica (CISH). *Invest Clin*. 2013;54:406-416.
 21. Meisel J, Hyman D, Garg K, Zhou Q, Dao F, Bisogna M, et al. The performance of BRCA1 immunohistochemistry for detecting germline, somatic, and epigenetic BRCA1 loss in high-grade serous ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2014;25:2372-2378.
 22. Popovska S, Ivanov I, Dineva T, Jordanov A, Kovacheva K, Kamburova Z, et al. Morphologically and immunohistochemically based screening criteria for selection of patients with possible mutation of BRCA1 gene in primary ovarian cancer. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2014;53:21-28.
 23. McAlpine J, Porter H, Köbel M, Nelson B, Prentice L, Kalloger S, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations correlate with TP53 abnormalities and presence of immune cell infiltrates in ovarian high-grade serous carcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25:740-750.
 24. Lesnock J, Darcy K, Tian C, DeLoia J, Thrall M, Zahn C, et al. BRCA1 expression and improved survival in ovarian cancer patients treated with intraperitoneal cisplatin and paclitaxel: A Gynecologic Oncology Group Study. *Br J Cancer*. 2013;108:1231-1237.
 25. Carser J, Quinn J, Michie C, O'Brien J, McCluggage G, Maxwell P, et al. BRCA1 is both a prognostic and predictive biomarker of response to chemotherapy in sporadic epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;123:492-498.
 26. El-Aty A, El-Hafez A, El-Tantawy D, Hamdy R. No association between BRCA1 immunohistochemical expression and tumor grade, stage or overall survival in platinum-treated epithelial ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:4275-4279.
 27. Skytte A, Waldstrøm M, Rasmussen A, Crüger D, Woodward E, Kølvrå S. Identification of BRCA1-deficient ovarian cancers. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90:593-599.
 28. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, Hahnen E, Hauke J, Bluemcke B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet*. 2016;53:465-471.
 29. Sirisabya N, Manchana T, Termrungrueang W, Triratanachai S, Charuruks N, Tresukosol D. Prevalence of BRCA1 Expression in epithelial ovarian cancer: Immunohistochemically study. *J Med Assoc Thai*. 2007;90:9-14.
 30. Daly M, Pilarski R, Axilbund J, Berry M, Buys S, Crawford B, et al. Genetic/familial high-risk assessment: Breast and ovarian. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14:153-162.
 31. Garg K, Levine D, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord A, et al. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:138-146.
 32. Bolton K, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus S, Karlan B, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*. 2012;307:382-390.
 33. Lorusso D, Cirillo F, Mancini M, Spatti G, Grijuela B, Ditto A, et al. The different impact of BRCA mutations on the survival of epithelial ovarian cancer patients: A retrospective single-center experience. *Oncology*. 2013;85:122-127.
 34. Lan V, Thuan T, Thu D, Uyen N, Ha N, To T. Methylation profile of BRCA, RASSF1A and ER in Vietnamese women with ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:7713-7718.
 35. Bai X, Fu Y, Xue H, Guo K, Song Z, Yu Z, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic epithelial ovarian carcinoma: Association with low expression of BRCA1, improved survival and co-expression of DNA methyltransferases. *Oncol Lett*. 2014;7:1088-1096.
 36. Saeed S, Akram. Epithelial ovarian cancer: Epidemiology and clinic-pathological features. *Profesional Med J*. 2012;19:1040-1045.
 37. Pradjatmo H, Dasuki D, Anwar M, Mubarika S, Harijadi. Methylation status and immunohistochemistry of BRCA1 in epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:9479-9485.
 38. Boyd J, Sonoda Y, Federici M, Bogomolny F, Rhei E, Maresco D, et al. Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA*. 2000;283:2260-2265.

39. Bolton K, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus S, Karlan B, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA*. 2012;307:382-390.
40. Werness B, Parvatiyar P, Ramus S, Whittemore A, Garlinghouse-Jones K, Oakley-Girvan I, et al. Ovarian carcinoma in situ with germline BRCA1 mutation and loss of heterozygosity at BRCA1 and TP53. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1088-1091.
41. Vaz F, Machado P, Brandao R, Laranjeira C, Eugenio J, Fernandes AH, et al. Familial breast/ovarian cancer and BRCA1/2 genetic screening: The role of immunohistochemistry as an additional method in the selection of patients. *J Histochem Cytochem*. 2007;55:1105-1113.
42. Kashima K, Oite T, Aoki Y, Takakuwa K, Aida H, Nagata H, et al. Screening of BRCA1 mutation using immunohistochemical staining with C-terminal and N-terminal antibodies in familial ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res*. 2000;91:399-409.
43. Thrall M, Gallion H, Kryscio R, Kapali M, Armstrong D, DeLoia JA. BRCA1 expression in a large series of sporadic ovarian carcinomas: A Gynecologic Oncology Group study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:166-171.
44. Wilson CA, Ramos L, Villaseñor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet*. 1999;21:236-240.
45. Swisher E, Gonzalez R, Taniguchi T, Garcia R, Walsh T, Barbara Goff B, et al. Methylation and protein expression of DNA repair genes: Association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. *Mol Cancer*. 2009;8:38-48.
46. Henderson B. The BRCA1 breast cancer suppressor: Regulation of transport, dynamics, and function at multiple subcellular locations. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:796808.