



Estudio de la expresión del gen BRCA 1 en tumores de mama esporádicos y su implicancia clínica.

Juan Andrés Zanetti

Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Nora Artagaveytia, MD, PhD

Prof. Adj. Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Udelar.

Montevideo, 5 de Diciembre de 2012

Glosario

Resumen	3
Introducción	3-6
Objetivos	6
Materiales y métodos	7
Extracción de ARN	7
Extracción de ARN de tejido parafinado	7
Cálculo de concentración, pureza e integridad del ARN	8
Retrotranscripción	8
Amplificación de GAPDH	8
PCR Semicuantitativa	9
Real Time PCR	10
Cuantificación relativa de BRCA 1	10
Genes de referencia	11
Primers y sondas	11-12
Curvas estándar para BRCA 1 y β Actina	12
Eficiencia de reacción	12-13
Cálculo de la expresión relativa de BRCA 1	13
Análisis estadístico	13
Resultados	13-22
Discusión	23-28
Conclusiones	28
Bibliografía	28-31

Resumen

El Cáncer de Mama es un importante problema de salud pública en el Uruguay y en el Mundo, y representa la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en el Uruguay. Múltiples son los factores involucrados en la carcinogénesis mamaria entre los que se destacan vías de señalización alteradas, presencia y/o ausencia de receptores hormonales, sobreexpresión de genes y pérdida de funcionalidad de proteínas claves en el funcionamiento de las células de las glándulas mamarias. Entre estas proteínas se destaca BRCA 1 la cual participa de la reparación de ADN de doble cadena (DSB), control de ciclo celular, regulación de la apoptosis, entre otras. Mutaciones germinales de BRCA 1 predispone a las mujeres a desarrollar cáncer de mama y ovario. En los tumores de mama esporádicos son muy poco frecuentes estas mutaciones. En cambio, se han reportado niveles reducidos o nulos de la expresión de la proteína. En este trabajo se pretenden estudiar los niveles de ARNm de BRCA 1 y analizar si este parámetro podría ser utilizado como un factor pronóstico en la evolución de la enfermedad, agresividad tumoral o para la caracterización de los diferentes fenotipos tumorales. La identificación y caracterización de fenotipos tumorales permitirá al clínico optar por tratamientos específicos y más adecuados para cada caso, beneficiándose tanto el sistema de salud como la paciente portadora aumentando la eficacia del tratamiento y disminuyendo las morbilidades.

Palabras claves: Cáncer de mama, BRCA 1, Real Time PCR.

Introducción

El Cáncer de Mama es un importante problema de salud pública en el Uruguay. Su incidencia es de 71,38 casos por 100 000 y representa la primera causa de muerte por cáncer en la mujer (22,92 casos por 100 000)¹.

Las bases del cáncer mamario aún siguen sin conocerse completamente pero son varios los factores que participan en el proceso de la carcinogénesis. Entre ellos se encuentran los estrógenos, los factores polipeptídicos (FCP) y sus receptores, así como proteínas intracelulares que participan en vías de señalización como AKT y mTOR^{2,3} y otras con múltiples funciones destacándose la proteína BRCA 1. El gen BRCA 1 (BRCAst CAnCER 1) fue identificado en 1994. Se sospechaba que mutaciones en un gen ubicado en el cromosoma 17q predisponía a las mujeres a desarrollar cáncer de mama y ovario. Fue así entonces que mediante un mapeo genético usando marcadores moleculares se identificó el gen BRCA 1⁴. Sin embargo sólo entre un 5 y 10% de los cánceres de mama son hereditarios y la mayoría de ellos corresponden a mutaciones germinales en el gen BRCA 1⁵. Mutaciones somáticas en BRCA 1 en tumores de mama esporádicos son raras⁶.

Los tumores de mama pueden ser clasificados en subgrupos dependiendo de patrones de expresión génica, específicamente receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y el estado del receptor HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) que en algunos tumores se encuentra sobreexpresado⁷. Los tumores de fenotipo basal son RE negativo, RP negativo y HER2 negativo y expresan citoqueratinas basales como CK-5/6, CK-14

y CK-17⁸. Los tumores “triple negativos” también son RE negativo, RP negativo y Her2 negativo. Por más que algunos autores los clasifiquen como fenotipo basal otros sostienen que son entidades diferentes⁹. Los tumores luminales fueron caracterizados por estudios de microarreglos y se vio que expresaban grandes cantidades de citoqueratinas luminales y marcadores genéticos característicos de células epiteliales luminales de tejido mamario normal¹⁰. Se clasifican en dos tipos luminal A son tumores RE positivos con bajo grado histológico mientras que los luminal B son RE positivos con alto grado histológico¹¹. Los tumores HER2 positivos son tumores que muestran amplificación y alto grado de expresión del gen ERBB2⁷. Por último se encuentran los tumores con mutación en el gen BRCA 1 denominados tumores BRCA 1. Los tumores “basal-like” y “triple negativos” esporádicos difieren de los heredo-familiares en la ausencia de mutaciones del gen BRCA 1. Sin embargo, en éstos tumores se pueden reconocer características fenotípicas similares a los hereditarios, que son como “sellos” de la disfunción de BRCA 1¹².

El transcripto de BRCA 1 tiene un tamaño de 7.8 Kb, contiene 24 exones y codifica para una proteína de 1863 aminoácidos que se traduce en varios órganos incluyendo la mama y el ovario⁴. La proteína posee en el extremo N-terminal un dominio en dedo de cinc y en el extremo C-terminal dos dominios BRCT repetidos en tándem donde se unen fosfoproteínas específicas, fosforiladas por ATM/ATR kinasas que se activan por daño en el ADN¹³. Se han reportado mutaciones germinales sin sentido en el extremo C-terminal que afecta la estructura del dominio BRCT, predisponiendo a la enfermedad por pérdida de función de la proteína¹⁴. La pérdida de los dominios BRCT de BRCA 1 lleva a la formación de tumores en ratones¹⁵.

El dominio en dedo de cinc es un dominio muy conservado entre las proteínas que interaccionan directa o indirectamente sobre el ADN. Esta estructura permitió predecir su función como factor de transcripción cuando fue descubierta en 1994⁴. Este dominio proteico está formado por una hélice α que es la que reconoce el ADN y se inserta en el surco mayor, y una lámina β que es presentada al ADN. El átomo de cinc está coordinado por dos residuos de histidina en la hélice α y dos residuos de cisteína en la lámina β . Esta organización estabiliza la estructura y es indispensable para la unión al ADN¹⁶. Este dominio proteico aparte de su capacidad de reconocimiento y unión al ADN es el responsable de la actividad E2 ubiquitina ligasa de BRCA 1¹⁷. La proteína BARD 1 (BRCA 1 Associated Ring Domain protein 1), que también posee un dominio en dedo de cinc interacciona con BRCA 1¹⁸ aumentando drásticamente la actividad ubiquitin ligasa por la formación del heterodímero BRCA1/BARD1¹⁹.

BRCA 1 es un gen supresor de tumor por las funciones que cumple la proteína en la célula. Una de las principales funciones es mantener la integridad del genoma mediante la reparación de las rupturas de doble cadena (DSB) por recombinación homóloga²⁰. Participa en los puntos de control en el ciclo celular asociada a varias proteínas como son E2F, CDC2 y ciclinas²¹ y controla los daños producidos en la fase S en G₂-M²². La función principal del punto de control en G₂-M es frenar el ciclo celular de células mutantes con daño en el ADN antes de que entren en mitosis. La pérdida de este punto de control permite a las células mutantes entrar en la fase mitótica y pasar el ADN dañado a las células hijas produciendo inestabilidad genómica²³. La transcripción de BRCA 1 es inducida a finales de la etapa G₁ y es máxima después del punto de

control G₁-S²⁴. La proteína es hiperfosforilada a finales de G₁ y en la fase S, y posteriormente desfosforilada al comienzo de la mitosis²⁵.

Xu et al. encontraron una duplicación aberrante de los centrosomas en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) mutantes para BRCA 1. Los cromosomas contenían múltiples centrosomas lo que podría afectar la segregación de los cromosomas y una consecuente aneuploidía²². También hay evidencia que muestra que BRCA 1 puede tener un rol crítico en la regulación de la apoptosis. Por lo que niveles bajos o nulos de BRCA 1 puede ser la causa de la capacidad reducida de los tumores mamarios de programar la muerte celular por apoptosis²⁶.

Por último y más recientemente se ha planteado que BRCA1 participaría del control de la migración celular y diseminación del cáncer²⁷.

Se han reportado niveles bajos de expresión de BRCA 1 en tumores de mama esporádicos en comparación con el tejido mamario normal^{28,29}, sugiriendo que niveles bajos de la proteína en la célula podría estar vinculado con el desarrollo del tumor. También se han reportado variaciones en la expresión de BRCA 1 en la progresión tumoral²⁹.

Se ha reportado que entre 9 -13% de los tumores de mama esporádicos presentan hipermetilación del promotor de BRCA 1^{30,31}. La hipermetilación de las islas CpG de los promotores está asociado al silenciamiento de genes. Una vez establecida la metilación es pasada a las células hijas durante la replicación del ADN por las metiltransferasas que mantienen el patrón de metilación en las islas CpG en el genoma³². En este sentido se ha planteado una metilación aberrante en las citocinas del promotor de BRCA 1 asociado con una hipoacetilación de histonas, condensación de la cromatina y represión transcripcional de BRCA 1 en tumores de mama esporádicos³³.

La transcripción de BRCA 1 está regulada por varios factores de transcripción entre los que se encuentra ID4 (inhibitor of DNA binding 4) que actúa como un regulador negativo, por lo que algunos estudios se han centrado en determinar correlaciones entre la expresión de BRCA 1 e ID4 como un posible mecanismo de silenciamiento de BRCA 1^{34,35}. El oncogen c-myc actúa como regulador positivo de la transcripción de BRCA 1¹³ y la proteína BRCA 1 participa en su propia regulación uniéndose directamente a su promotor disminuyendo la transcripción³⁶.

BRCA 1 participa de la transcripción de varios genes al interactuar con múltiples factores de la transcripción (activadores como represores) entre los que se encuentran p53, p300, CtIP, c-myc, E2F entre otros³⁷. La proteína BRCA 1 también formaría parte del complejo de transcripción como un componente de la holoenzima ARN Polimerasa II mediante la interacción con la enzima ARN helicasa A^{38,39}.

Chen et al. reportaron que la localización de BRCA 1 en células normales es en el núcleo mientras que en líneas celulares derivadas de tumor mamario se veía una localización aberrante de la proteína en el citoplasma⁴⁰. Se han postulado dos mecanismos mediante los cuales la proteína es transportada al núcleo. Primero se identificó una región NLS (nuclear localization signal) en el exón 11 (el más largo de BRCA 1)⁴¹ y posteriormente Chen et al⁴²

demonstraron la interacción de esta región en la proteína (aminoácidos 501-508) con la proteína importina alfa. Esto evidenciaba que la proteína BRCA 1 entra al núcleo por la vía clásica importina alfa/beta. Sin embargo Fabbro et al⁴³ reportaron que la proteína BRCA 1 también puede entrar al núcleo como heterodímero BRCA1/BARD1 independiente de NLS.

La localización aberrante de la proteína así como niveles reducidos en la expresión podrían ser la causa de la disfunción de la proteína BRCA 1 en los tumores de mama esporádicos. Conocer los niveles de expresión así como la localización de la proteína permitirá caracterizar aún más los distintos fenotipos tumorales, brindando nuevas herramientas a los clínicos para el diseño de tratamientos. Tratamientos más específicos permitirá optimizar los resultados, disminuir morbilidades y reducir los costos al sistema de salud. El avance de la ciencia y el conocimiento de la biología tumoral permitirá identificar nuevos potenciales blancos moleculares para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Objetivos Generales

Contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que están en la base de la carcinogénesis mamaria así como a la búsqueda de parámetros pronósticos de la enfermedad.

Objetivos específicos

1. Estudiar los niveles de expresión del gen BRCA 1 por RT-PCR semicuantitativa en tumores de mama esporádicos.
2. Cuantificar el transcripto de BRCA 1 por Q-RT-PCR (Real Time PCR) en las muestras tumorales.
3. Relacionar la expresión del gen BRCA 1 con la localización subcelular de la proteína.
4. Correlacionar la expresión del gen BRCA 1 con parámetros clínico-patológicos así como con otros biomarcadores estudiados previamente en el laboratorio.

Materiales y métodos

Para el estudio se incluyeron 59 pacientes portadoras de cáncer de mama. La inclusión y el seguimiento de las pacientes es realizado en coordinación con la Unidad de Mastología y Servicio de Oncología Clínica del Hospital de Clínicas y con el Servicio de Curieterapia del Centro Hospitalario Pereira Rosell (CHPR). Las muestras fueron obtenidas por el laboratorio para la determinación de receptores hormonales mediante técnicas bioquímicas. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Los tejidos tumorales fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Para el estudio también se usaron tumores fijados en formalina embebidos en parafina (FFPE).

Los tumores FFPE representaron 8 muestras del total y fueron de fenotipo “triple negativo”. También se cuenta con el tejido mamario normal alejado del tumor de 5 de esos 8 casos. Se realizaron cortes del bloque de parafina de $8\ \mu\text{m}$ de espesor para la extracción de ARN y cortes de $5\ \mu\text{m}$ que fueron fijados en un portaobjeto para determinar la localización de la proteína BRCA 1 mediante inmunofluorescencia.

Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total usando la solución Trizol (Life Technologies) basada en la técnica de Tiocianato de Guanidina y fenol cloroformo descrita por Chomczynski y Sacchi⁴⁴. El Trizol es una solución monofásica compuesta de fenol (donde los ácidos nucleicos son insolubles) y tiocianato de guanidina (agente desnaturante de proteínas). El Trizol es agregado directamente al tejido facilitando la homogenización. La adición de cloroformo al homogenizado y posteriores centrifugaciones permite la separación de la solución en una fase orgánica y una fase acuosa. El ARN se encuentra exclusivamente en la fase acuosa por lo que se recupera esta fase. A partir de la fase orgánica se puede extraer ADN y proteínas. El ARN es precipitado agregando isopropanol y centrifugando a 4°C . El pellet obtenido se lava con etanol 75% y luego se deja secar a temperatura ambiente. Luego el pellet es resuspendido en agua libre de ARNasas.

Extracción de ARN de tejido parafinado

El desparafinado se realizó mediante técnicas estándar usando xileno y alcohol. Se siguió un protocolo empleado para la extracción de miRNA a partir de tejido parafinado publicado por Zhihai Ma et al⁴⁵ con alguna modificación. Las extracciones se realizaron a partir de un corte/tumor de aproximadamente $8\ \mu\text{m}$. Para el desparafinado se incubó el corte en un tubo eppendorf con 1 ml de xilol a 50°C por 15 min seguido de centrifugación 5 min a 13000g y posterior remoción del xilol. Se repite el procedimiento para asegurar la eliminación completa del tejido. Luego se lava con etanol 100%, 70% y 50% y se centrifuga 5 min a 13000g entre los distintos lavados. Con los sucesivos lavados se eliminan los restos de xilol y parafina y se rehidrata el tejido al aumentar la cantidad de agua en la solución. Se deja secar el pellet a temperatura ambiente para eliminar los restos de etanol y luego se incubó con buffer de

digestión (10mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS; pH 8) conteniendo 300µg/ml de Proteinasa K a 55°C por 5 horas con agitación constante. Luego se procede a la extracción con Trizol.

Cálculo de concentración, pureza e integridad del ARN

La concentración de los ARN obtenidos se midió por espectrofotometría a 260nm y se calculó su concentración a partir de la relación $1 \text{ UA}_{260\text{nm}} = 40 \text{ µg/ml}$. También se midió la absorbancia a 280nm y se realizó el cociente $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ para determinar la contaminación con proteínas.

Posteriormente se verificó la integridad de los ARNs en gel de agarosa 0,8% en TBE 0,5 X con Bromuro de etidio para su visualización. Los geles se expusieron a la luz ultravioleta en el equipo Kodak Gel Logic 212 Imaging System.

Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó a partir de 1µg de ARN utilizando primers randomizados (hexámeros) como cebadores. La ventaja de la utilización de primers randomizados es que se hibridizan en varias regiones de los ARNs asegurando que se copien todos los ARNs y en toda su extensión. Los primers randomizados copian todo el ARN celular a diferencia de los oligo dT que son selectivos para ARNm ya que son complementarios con la cola poli A.

La reacción de retrotranscripción se realizó en un volumen final de 20µl con 1 µg de ARN, 0,2µg de primers randomizados (Fermentas), 200 U de RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas), 1 mM dNTPs (de cada uno), inhibidor de ARNasas 1 U (RiboLock™ Fermentas) y el buffer de la enzima.

El protocolo utilizado para la reacción consistió en diferentes pasos: 5 min a 65°C para eliminar estructuras secundarias en el ARN y los primers, seguido del agregado a temperatura ambiente del mix con el buffer, dNTPs y la enzima y 1 hora a 42°C para la copia del ARN. Por último 10 min a 70°C para la inactivación de la enzima. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C para su posterior amplificación.

En las reacciones de retrotranscripción se incluyeron controles positivos correspondientes a ARN de células MDA MB 231, línea celular derivada de cáncer mamario.

Amplificación de GAPDH

Para verificar que los cDNA obtenidos eran de buena calidad, se amplificó el gen GAPDH en todas las muestras. El diseño de los primers, cuyas secuencias se encuentran en la tabla 1, permite identificar contaminaciones con ADN. La secuencia de los primers fue publicada por Leygue et al⁴⁶. El protocolo utilizado para la amplificación fue 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturalización), 45 seg a 55°C (annealing) y 1 min 15 seg a 72°C (extensión) y una elongación final de 10 min a 72°C. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl utilizando Super Hot Master Mix 2X (Bioron), 0,8 µM de cada primer y 2µl de cDNA. En cada corrida se incluyeron blancos de reacción.

PCR Semicuantitativa

La semicuantificación se realizó mediante la lectura de bandas de los productos de PCR del gen de interés y un gen de referencia. En esta técnica se usó como gen de referencia el gen de la $\beta 2$ microglobulina cuyo amplicón tiene un tamaño menor que el de GAPDH por lo que es más adecuado para la semicuantificación relativa. Se puso a punto la PCR de manera que sea posible la amplificación de ambos genes a la misma temperatura de annealing de los primers y las mismas condiciones de ciclados. Se amplificaron ambos genes a la vez, pero en tubos separados. Para determinar la cantidad de ciclos a realizar se tuvo en cuenta: evitar llegar a la fase "plateau" para poder visualizar diferencias de expresión entre las distintas muestras y que la cantidad de ciclos sea suficiente para lograr detectar la expresión del BRCA 1 en tumores con muy baja expresión.

La secuencia de los primers utilizados para amplificar el BRCA 1 y la $\beta 2$ microglobulina se encuentran detallados en la tabla 1. Los primers para el BRCA 1 fueron publicados por Roberta Bartolucci et al⁴⁷ y los de la $\beta 2$ microglobulina por Sylvie Chevillard et al⁴⁸.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l utilizando Super Hot Master Mix 2X (Bioron), 0,5 μ M de cada primer y 2 μ l de cDNA. En cada corrida se incluyeron blancos de reacción tanto para el BRCA 1 como para la $\beta 2$ microglobulina.

El protocolo utilizado para la amplificación fue 5 min a 95°C, 29 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturalización), 30 seg a 60°C (annealing) y 1 min a 72°C (extensión) y una elongación final de 10 min a 72°C. Para las muestras de tejido parafinado se ajustó el protocolo aumentando los ciclos a 35. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Biometra®T1.

Una vez obtenidos los productos de las PCR se corrieron 10 μ l en geles 2,5% de agarosa con Buffer TBE 0,5 X con el agregado de GelGreen™ (Biotium) para su visualización. A diferencia del Bromuro de Etidio el GelGreen™ no es mutagénico ni citotóxico al ser una molécula que no tiene la capacidad de atravesar las membranas. El GelGreen™ se intercala en el ADN y puede ser visualizado con un transiluminador absorbiendo la luz UV entre 250 y 300nm. Tiene un pico de emisión cercano a los 540nm (color verde en el espectro visible). Junto con las muestras se corrió un marcador de peso molecular ("ladder") de 50 bases entre banda y banda para verificar el tamaño de los productos. Los geles se corrieron en una cuba de electroforesis a 100V.

Los geles se expusieron a luz ultravioleta y fueron fotografiados usando el equipo Kodak Gel Logic 212 Imaging System para su posterior análisis. El tiempo de exposición a la luz UV durante la toma de la fotografía fue de 2 segundos.

Para el análisis de las bandas se utilizó el software Kodak Molecular Imaging V 5.0.1.27. Este software mide la intensidad de las bandas presentes en la fotografía del gel. Para el análisis de las intensidades de las bandas se eligió el parámetro Intensidad Neta que determina la intensidad de la banda sustrayendo el "background" del gel. Se realizó la lectura para cada banda dos veces y se realizó el cociente entre la intensidad del BRCA 1 y $\beta 2$ microglobulina

para normalizar la expresión. Luego se hizo un promedio entre los cocientes obtenidos para cada lectura. Los resultados se expresan en UI (unidades arbitrarias de intensidad).

Real Time PCR

La cuantificación del gen BRCA 1 se realizó mediante la técnica Real Time PCR utilizando sondas TaqMan. Las sondas TaqMan son diseñadas para hibridizar con una hebra de la secuencia blanco cerca de la región donde se hibridiza uno de los primers. Éstas poseen un fluorocromo en el extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Como las dos moléculas (reportero y quencher) se encuentran próximas una de la otra, la fluorescencia del reportero es "quencheada" por lo que no se detecta fluorescencia. El mecanismo que permite este apagado de la señal es el FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), donde el "quenching" ocurrirá cuando el reportero y el quencher se encuentren en el mismo oligonucleótido a una distancia aproximada de 100 Å. Una vez que la polimerasa comienza a extender se encontrará con el extremo 5' de la sonda. La enzima Taq DNA polimerasa tiene actividad 5'-3' nucleasa, por lo que degradará el extremo 5' de la sonda y liberará el fluorocromo a la solución. Como consecuencia de la liberación, el reportero y el quencher se separan detectándose la fluorescencia emitida por el reportero⁴⁹. La fluorescencia aumenta exponencialmente en el transcurso de la amplificación y es detectada y procesada en tiempo real. Se obtienen gráficas de fluorescencia en función del número de ciclos de la PCR. Se pueden distinguir tres fases. Una fase inicial donde la fluorescencia está por debajo del nivel de detección del equipo, luego una fase exponencial y por último la fase "plateau" donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral o "threshold" que representa el punto a partir del cual se produce un aumento significativo de la fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo⁵⁰. El ciclo umbral o Ct (por su nombre en inglés threshold cycle) es determinado por el punto de corte entre la línea umbral ("threshold") y la curva de amplificación, dicho de otra forma, es el número de ciclos requeridos para alcanzar la fluorescencia umbral. El "threshold" puede ser determinado manualmente por el investigador o automáticamente por el software y será utilizado para el cálculo de las concentraciones. En este estudio, en todos los casos el "threshold" fue fijado automáticamente por el software.

Cuantificación Relativa de BRCA 1

La cuantificación por Real Time PCR puede ser determinada en valores absolutos (cuantificación absoluta) o valores relativos (cuantificación relativa). La cuantificación absoluta utiliza curvas de calibración externas (plásmidos recombinantes, oligonucleótidos sintéticos) así como internas y es utilizada en los casos que es necesario determinar el número exacto de copias presentes en la muestra. La cuantificación relativa se basa en la comparación entre la expresión de un gen de interés y un gen de referencia y la expresión del mismo gen en una muestra problema y una muestra control. La cuantificación relativa es suficiente en la mayoría de los estudios fisiológicos y patológicos⁵¹.

Genes de referencia

Para la cuantificación relativa del transcripto de BRCA 1 se utilizó la β Actina como gen de referencia. La expresión del gen de referencia debe ser constante en el tejido en estudio o bajo las condiciones experimentales. Dada la importancia del uso de de éstos genes varios estudios se han centrado en tratar de identificar genes de referencia en distintos tejidos o bajo distintas condiciones experimentales^{52,53}. Los genes de referencia pueden ser agrupados según su función. Entre ellos se encuentran (i) genes estructurales: β -Actina, proteína ribosomal L 13 y α -tubulina; (ii) genes relacionados al metabolismo de las células: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), porfobilinógeno desaminasa (PBGD), gliceroaldeído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y fosfolipasa A2; (iii) genes relacionados con la transcripción: TATA-Box binding protein (TBP) y ARN polimerasa II, (iv) y un cuarto grupo que incluyen los genes que no entran en las categorías anteriores que son: Albumina, β 2 microglobulina y Peptidil propil isomerasa A⁵².

Como el nivel de expresión de un gen de referencia es constante, variaciones en el Ct del normalizador pueden atribuirse a diferencias en la eficiencia de la reacción de retrotranscripción, diferencias en la pureza del ARN, su integridad, o variaciones en la cantidad de ARN de la que se parte. Esta variación va a afectar al normalizador y al gen de interés por igual, por lo que diferencias en el Ct del normalizador puede ser usado para corregir cualquier variación en el Ct del gen de interés que no sean debidas a variaciones en el nivel de expresión.

Es importante elegir un gen normalizador que tenga un nivel de expresión y una eficiencia de amplificación que sea similar a la del gen de interés⁴⁹.

Primers y sondas

Para la cuantificación del gen BRCA 1 se utilizaron los primers y sondas publicados por Roberta Bartolucci et al⁴⁷. La secuencia de los primers y de la sonda para β -Actina también fueron publicados en el mismo trabajo. En la tabla 1 se muestran las secuencias de los primers y sondas utilizados, así como los fluoróforos y quenchers de las sondas. Mediante el programa Oligo Explorer 1.2 se calcularon las temperaturas de melting y se verificó que los primers y las sondas no presentaran estructuras secundarias ni complementariedad. No se observó ningún tipo de estructura secundaria relevante ni complementariedad entre ellos, consigo mismo ni con las sondas.

Tabla 1: Secuencia de primers y sondas. En la tabla se muestran las secuencias de los primers y sondas utilizados. F: forward, R: reverse. Se detallan los fluoróforos y quenchers utilizados en las sondas, el tamaño del amplicón y la región donde hibridizan los primers.

GEN	PRIMERS	SONDAS	REGION A AMPLIFICAR	Referencia
BRCA 1	F: 5' GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA 3' R: 5' GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGGT 3'	5'CCACTCAGCAGAGGG 3' MGB-FAM	EXON 11-12 Amplicón 69 pb	(47)
β-ACTINA	F: 5' TGAGCGCGGCTACAGCTT 3' R: 5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'	5'ACCACCACGGCCGAGCGG 3' TAMRA-FAM	EXON 3 Amplicón 59 pb	(47)
β2 micro-globulina	F: 5' TTCACCCCACTGAAAAAGATGA 3' R: 5' GGCATCTTCAAACCTCCATGATG 3'	SIN SONDA	EXON 2-3-4 Amplicón 120 pb	(48)
GAPDH	F: 5' ACCCACTCCTCCACCTTTG 3' R: 5' CTCTTGTGCTCTTGCTGGG 3'	SIN SONDA	EXON 7-8 Amplicón 178 pb	(46)

La cuantificación del transcripto de BRCA 1 se realizó en el equipo RotorGene 3000 del Instituto Pasteur de Montevideo. Las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 µl utilizando SensiMix™ II Probe Kit 2X (Bioline), 0,1 µM de sonda, 0,3 µM de primers y 4 µl de cDNA. Las reacciones se hicieron en tubos separados para el BRCA 1 y β-ACTINA ya que ambas sondas poseen el mismo fluoróforo (FAM). Todas las muestras se hicieron por duplicado.

El protocolo utilizado para la amplificación fue el siguiente: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C para las muestras de tejido congelado y 50 ciclos para las muestras de tejido desparafinado.

Curvas estándar para BRCA 1 y β Actina

Se realizaron curvas estándar para el gen de interés como para el gen de referencia. Las curvas se realizaron a partir de diluciones seriadas de cDNA obtenido de células MDA MB 231 en cultivo. Estas células expresan el gen BRCA 1 en niveles similares a la β-Actina. El rango de diluciones utilizado para la construcción de las curvas fue desde 10^0 – 10^{-3} , de manera de abarcar el mayor rango posible de expresión del gen de interés. Los puntos de la curva se hicieron por duplicado y en algunos casos el punto más diluido (10^{-3}) por triplicado, ya que este punto es el que presenta mayor variación.

Eficiencia de reacción

La eficiencia de la amplificación se establece a partir de las curvas de calibración. Ésta es una forma simple, rápida y reproducible para determinar el promedio de las eficiencias de las reacciones. También permite conocer la sensibilidad de la técnica así como la robustez del ensayo. La eficiencia de amplificación se determina a partir de la pendiente de la curva del

logaritmo de la concentración inicial del estándar (variable dependiente) y el Ct (variable independiente). La eficiencia se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$E=10^{-1/p_{\text{end}}} - 1 \quad (1)$$

Teóricamente la eficiencia máxima corresponde al 100% o a un valor de 1, donde la cantidad del producto de PCR se duplica en cada ciclo durante la fase exponencial⁵⁴. Eficiencias del 100% indican que las condiciones de la PCR son óptimas; los primers elegidos, la pureza del molde, así como el tamaño del amplicón son los adecuados⁵¹.

Cálculo de la expresión relativa de BRCA 1

El método de 2 Curvas Estándar fue el elegido para el cálculo de la expresión relativa de BRCA 1. Para ello se incluyó en cada corrida la curva estándar del gen de interés y la del gen de referencia. En las corridas donde no fue posible incluir las curvas estándar, se corrió algún punto de la curva (10^{-1}) para ser utilizado como estándar. Para el análisis de los resultados se importó en estos casos, una curva estándar de otra corrida corregida con la muestra estándar incluido en dicha corrida. El estándar es importante incluirlo ya que corrige la intersección de la curva (con el eje Y) según cuantos ciclos fueron necesarios para que la reacción fuera visible.

Se incluyeron blancos de reacciones (No Template Control) en las distintas corridas.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos por Real Time PCR y por PCR semicuantitativa se utilizó el programa SPSS (12.0.0, EE.UU.). Se realizaron estudios de correlación de variables entre la expresión del transcritto de BRCA 1 con la localización de la proteína así como con biomarcadores estudiados previamente en el laboratorio. Para estos análisis se aplicaron el test correlación de rangos de Spearman y el test de Mann-Whitney. El valor de significación establecido fue $P < 0,05$.

Resultados

Se logró cuantificar y semicuantificar el transcritto de BRCA 1 en todas las muestras tumorales incluidas en el estudio. Se obtuvo ARN de todas las muestras tumorales, tanto de las muestras congeladas como de los cortes de los tejidos en bloque de parafina (FFPE). Los rendimientos de ARN obtenidos en las extracciones de tejido parafinado no fueron muy buenos, por lo que la integridad del ARN no pudo ser visualizada en todas las muestras. Las cantidades de ARN obtenidos no coincide con la cantidad de material disponible en el tejido en la mayoría de los casos (ver tabla 3). Algunos tejido tumorales poseían buena cantidad de células tumorales (50-80% en 10 campos/sección) y algunas mamas normales buena cantidad de túbulo, sin embargo la cantidad de ARN obtenido en estas muestras es similar al obtenido en muestras con muy poca cantidad de material (<20% en 10 campos/sección). Se destaca la cantidad de ARN obtenido en la muestra 5650 T. Si bien el tejido presenta buena cantidad de masa

tumoral, el protocolo de extracción fue el mismo que se utilizó para las otras muestras, obteniéndose un rendimiento bastante superior. En los casos que la cantidad de ARN obtenido fue menor a 1 µg, las reacciones de retrotranscripción se realizaron con 0,8 µg de ARN (ver tabla 3). Para aumentar el rendimiento se podría haber agregado glicógeno para la precipitación del ARN.

La cantidad de ARN obtenido a partir de los tejidos congelados era suficiente por lo que se verificó su integridad en todos los casos. Se midieron las absorbancias a 260nm y 280nm de todos los ARNs y se determinó la pureza de los mismos. En las tablas 2 y 3 se detallan las concentraciones de los ARN de las distintas muestras, el estado del ARN, la pureza de los mismos y los valores de expresión relativa del gen BRCA 1 obtenidos por las dos técnicas empleadas: PCR Semicuantitativa y Real Time PCR. La amplificación con GAPDH no mostró contaminación con ADN en ninguna muestra y se obtuvieron bandas de amplificación en todos los casos incluidos.

Estudio de sensibilidad de la técnica PCR Semicuantitativa

Se realizó un estudio de sensibilidad de la técnica a partir de diluciones seriadas de cDNA de células MDA MB 231 para el gen β2 microglobulina así como para BRCA 1. En la reacción de PCR realizada a partir de la dilución 1/1000 del cDNA no se observa producto de amplificación para ninguno de los dos genes. Por lo tanto el nivel mínimo de detección de las diluciones fue (10^{-2}).

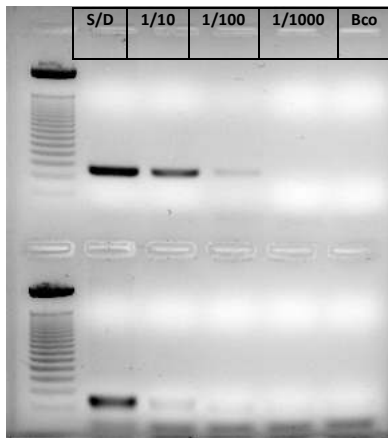


Figura 1: Estudio de sensibilidad de la técnica PCR semicuantitativa. Se corrieron los productos de amplificación del gen BRCA 1 y β2 microglobulina para una serie de diluciones de cDNA obtenido a partir de ARN de células MDA MB 231 en gel de agarosa 2,5 %. Arriba β2 microglobulina de izquierda a derecha: ladder, cDNA sin diluir (S/D), dilución 1/10, dilución 1/100, dilución 1/1000 y blanco (Bco). Abajo BRCA 1 de izquierda a derecha: ladder, cDNA sin diluir (S/D), dilución 1/10, dilución 1/100, dilución 1/1000 y blanco (Bco). Se observa como la intensidad de las bandas se hace más tenue al aumentar la dilución.

Los productos de las PCR de las distintas muestras fueron corridos en geles de agarosa 2,5 % para su posterior análisis. En la siguiente figura (Fig. 2) se muestra uno de los geles donde se corrieron 11 muestras. A partir de la siguiente imagen se realizó el análisis de intensidades de bandas. El valor de expresión relativa obtenido para el BRCA 1 para cada muestra se encuentra en la tabla 2.

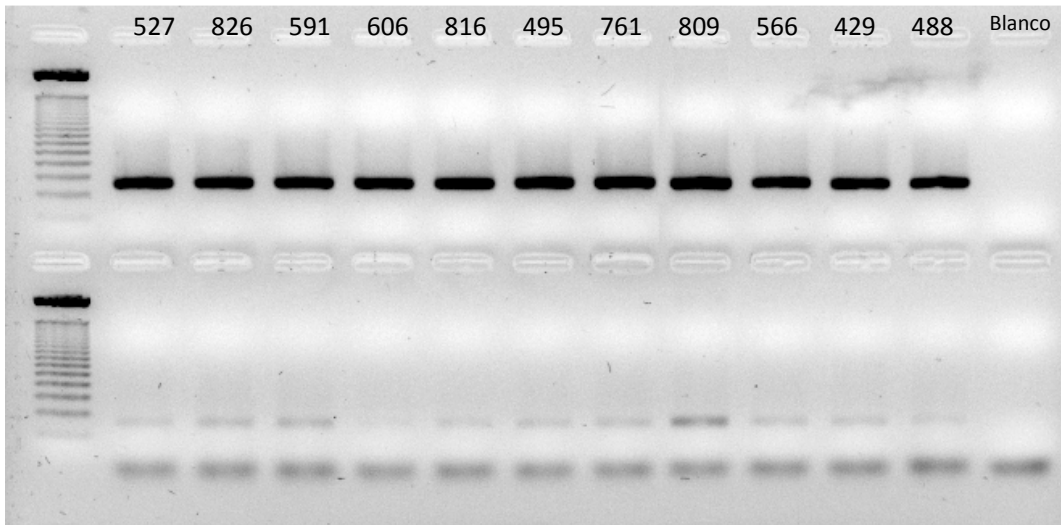


Figura 2: Gel de agarosa 2,5 % con los productos de BRCA 1 y $\beta 2$ microglobulina obtenidos para once muestras tumorales. Arriba banda correspondiente a $\beta 2$ microglobulina, abajo banda correspondiente a BRCA 1. En el extremo superior se indica el número de cada muestra. Observar diferencias en las intensidades de banda para BRCA 1 para las distintas muestras, reflejando diferentes niveles de expresión.

Real Time PCR

Curva de amplificación y curva estándar para β ACTINA

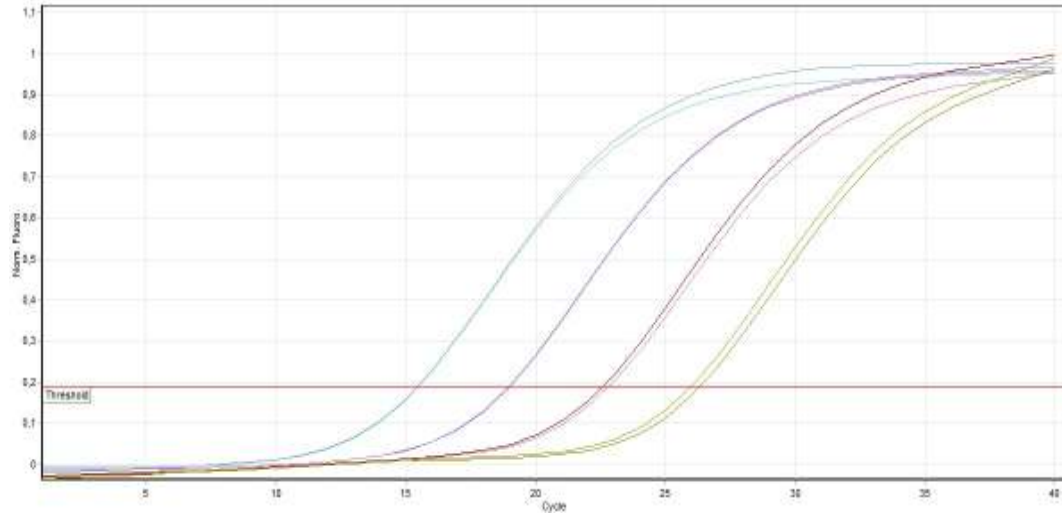


Figura 3a: Curva de amplificación de los estándares para B Actina. Se grafica la fluorescencia en función de los ciclos de la PCR. Las curvas que se observan corresponden a los duplicados de los estándares: 10^0 (celeste), -10^1 (violeta), -10^2 (rojo), -10^3 (amarillo). La línea roja horizontal corresponde al "threshold" fijado por el software.

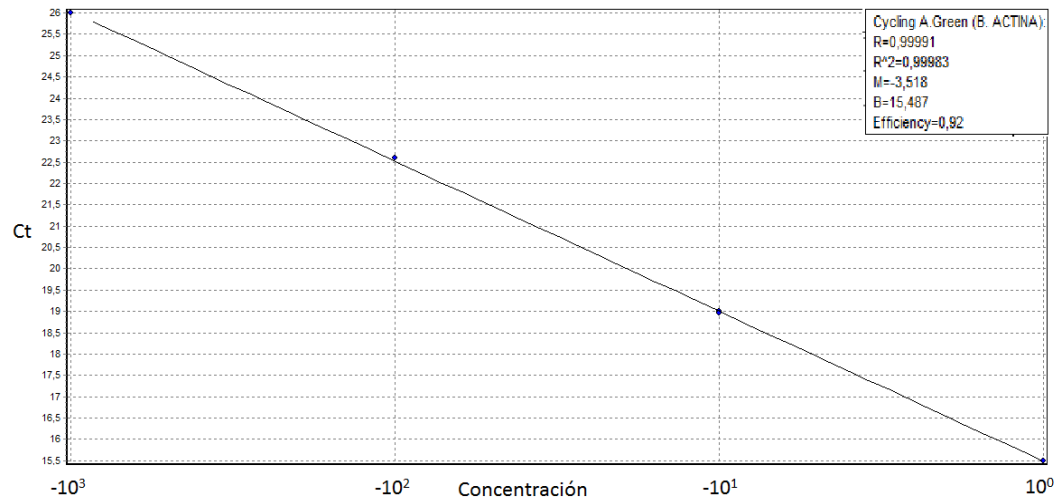


Figura 3b: Curva estándar para el gen β Actina. Se grafican los valores de Ct en función de la concentración de los estándares utilizados. A partir de la curva se obtiene la eficiencia de la reacción que para este caso es de 0,92 (92%). También se muestran los valores de R^2 , la pendiente (M) y la intersección con el eje Y (B).

Curva de amplificación y curva estándar para BRCA 1

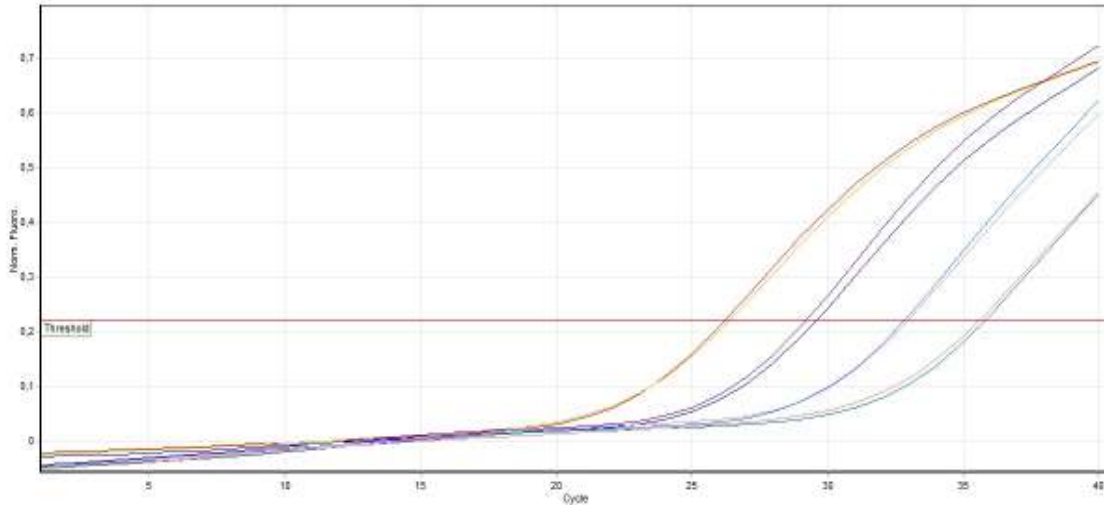


Figura 4a: Curva de amplificación de los estándares para BRCA 1. Se grafica la fluorescencia en función de los ciclos de la PCR. Las curvas que se observan corresponden a los duplicados de los estándares: 10^0 (rojo-amarillo), 10^{-1} (bordeaux-violeta), 10^{-2} (celeste-lila), 10^{-3} (rosado-verde). La línea roja horizontal corresponde al “threshold” fijado por el software.

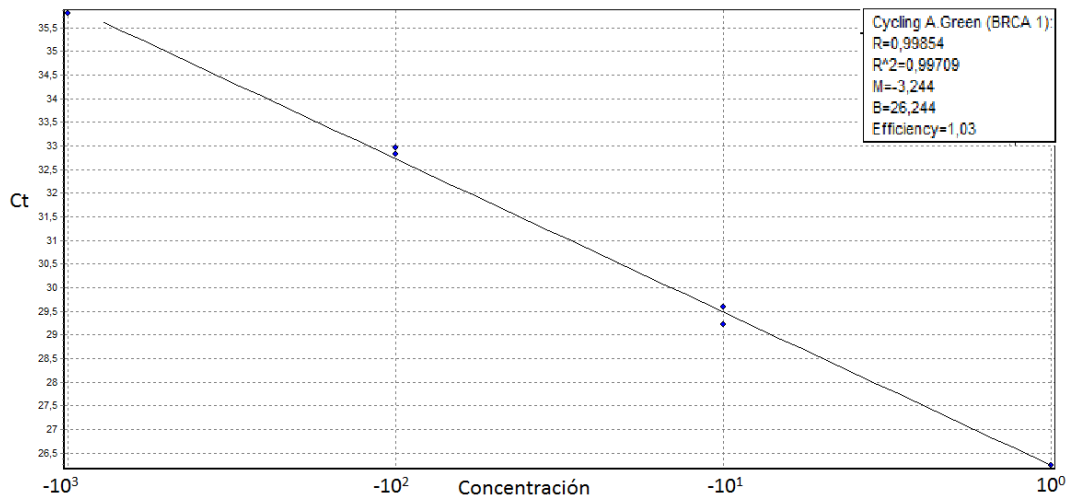


Figura 4b: Curva estándar para el gen BRCA 1. Se grafican los valores de Ct en función de la concentración de los estándares utilizados. A partir de la curva se obtiene la eficiencia de la reacción que para este caso es de 1,03 (103%). También se muestran los valores de R^2 , la pendiente (M) y la intersección con el eje Y (B).

En la siguiente tabla se muestran los resultados de expresión relativa del transcrito de BRCA 1 obtenidos por RT-PCR semicuantitativa y Real Time PCR para cada muestra tumoral. También se incluyen los valores de concentración de cada muestra, la relación de la absorbancia A_{260}/A_{280} y la calidad del ARN. La tabla fue construida según “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments”⁵⁴.

Tabla 2: Valores de expresión relativa del BRCA 1 obtenidos para las distintas muestras tumorales.

Se muestran los valores obtenidos por cada técnica: Real Time PCR (QRT-PCR) y por PCR semicuantitativa (Semicuantitativa). Se muestra la concentración de cada muestra expresada en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, la relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ y la integridad del ARN que fue clasificada como Media, Buena y Muy Buena. ND: No Disponible.

Muestra	ARN	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$	QRT-PCR	Semicuantitativa
741	Buena	1,10	2,46	0,13	0,19
445	Buena	1,69	1,84	0,13	0,20
282	Buena	0,53	1,71	0,09	0,34
517	Buena	2,80	2,00	0,25	0,30
786	Media	0,93	1,57	0,36	0,30
625	Buena	1,91	2,21	0,16	0,18
446	Muy Buena	1,22	2,38	0,65	0,23
827	Buena	2,97	1,99	0,24	0,26
837	Buena	0,98	1,82	0,37	0,21
527	Media	0,46	1,79	0,32	0,09
826	Media	2,81	1,98	0,24	0,13
591	Media	2,40	1,95	0,51	0,14
606	Media	1,26	2,10	0,09	0,07
816	Media	1,17	2,04	0,25	0,09
495	Buena	1,13	2,16	0,17	0,09
761	Media	0,84	1,92	0,23	0,11
809	Muy Buena	0,97	2,51	0,15	0,25
566	Media	1,42	2,10	0,61	0,13
429	Media	1,29	1,45	0,29	0,12
488	Muy Buena	1,00	2,22	0,17	0,07
807	Muy Buena	0,63	1,66	0,40	0,49
824	Muy Buena	2,01	1,96	0,14	0,10
772	Media	1,16	2,28	0,96	0,13
817	Buena	1,79	1,68	0,49	0,31
479	Media	0,51	1,63	0,36	0,14
701	Media	1,62	2,12	0,32	0,23
789	Buena	2,04	1,95	0,27	0,17
725	Muy Buena	0,50	ND	1,19	0,27
714	Media	0,35	ND	1,35	0,27
709	Buena	0,50	ND	0,37	0,35
602	Muy Buena	0,50	ND	0,92	0,20
603	Muy Buena	0,50	ND	0,17	0,22
607	Media	0,50	ND	0,21	0,09
633	Muy Buena	0,50	ND	1,12	0,29
665	Muy Buena	0,50	ND	4,03	0,71
677	Muy Buena	0,50	ND	0,38	0,23
601	Muy Buena	0,50	ND	0,86	0,25
569	Muy Buena	2,21	2,34	0,89	0,22
708	Muy Buena	2,52	2,16	1,04	0,28
576	Muy Buena	3,70	2,12	2,34	0,31
707	Muy Buena	1,70	2,48	0,67	0,08
586	Buena	2,12	ND	0,25	0,04
844	Buena	0,48	5,93	0,17	0,18
753	Muy Buena	0,89	2,13	0,23	0,07
719	Media	0,51	6,59	0,21	0,11
717	Media	0,34	10,37	0,86	0,05
682	Muy Buena	1,49	2,43	0,40	0,11
444	Media	0,35	2,67	0,32	0,08
419	Media	0,62	2,85	1,12	0,06
408	Muy Buena	0,65	2,89	0,56	0,07
406	Muy Buena	0,75	2,21	0,25	0,07

La expresión del gen BRCA 1 en los tejidos FFPE fue cuantificada únicamente por Real Time PCR. Los valores de expresión relativa obtenidos en el tejido tumoral como en el tejido mamario normal alejado del tumor se muestran en la tabla 3. También se muestran los rendimientos obtenidos en la extracción de ARN.

Tabla 3: Valores de expresión relativa del gen BRCA 1 obtenidos por Real Time PCR para los tumores FFPE con fenotipo “triple negativo” y los respectivos tejidos mamarios normales. Se muestran los valores de expresión relativa obtenidos para los tejidos FFPE (QRT-PCR). También se muestra la relación Abs_{260}/Abs_{280} , la concentración de cada muestra, el total de ARN extraído y una breve descripción del tejido al microscopio óptico de campo claro con tinción de eosina y hematoxilina. Muy buena cantidad (>80% en 10 campos/sección), buena cantidad (50-80% en 10 campos/sección), poca cantidad (20-50% en 10 campos/sección) y muy poca cantidad (<20% en 10 campos/sección). T (Tumor), M (Mama normal).

Muestra	QRT-PCR	Abs_{260}/Abs_{280}	[$\mu g/\mu l$]	Total ARN (μg)**	Descripción del tejido al M.O.
5650 T	0,37	1,900	0,822	12,330	Buena masa tumoral
5650 M *	0,73	1,083	0,065	0,975	Muy pocos túbulos, mucho tejido adiposo y fibroso
7190 T	1,39	1,830	0,228	3,420	Buena masa tumoral
7190 M *	-	1,050	0,070	1,050	Muy pocos túbulos
12236 T	0,32	1,820	0,088	1,320	Buena masa tumoral
12013 T *	0,59	1,825	0,146	2,190	Buena masa tumoral
12013 M *	0,70	1,198	0,097	1,455	Buena cantidad de túbulos
1456 T *	0,45	1,765	0,060	0,900	Buena masa tumoral
1456 M *	1,53	1,054	0,078	1,170	Muy pocos túbulos
9517 T *	0,54	1,460	0,181	2,715	Buena masa tumoral
9517 M *	0,38	1,167	0,077	1,155	Muy pocos túbulos, mucho tejido adiposo
10279 T *	0,45	1,078	0,069	1,035	Buena masa tumoral
2641 T *	0,63	1,068	0,079	1,185	Buena masa tumoral

* Las RT de estas muestras se hicieron con 0,8 Ug de ARN

**Los ARNs se resuspendieron en 15 Ul de agua libre de ARNasas

Análisis de los valores de expresión de BRCA 1 en las muestras tumorales

El análisis de los datos obtenidos por RT-PCR semicuantitativa mostró una mediana de expresión de BRCA 1 de 0,18 UI con un rango de 0,04 a 0,71 UI. El análisis de los valores obtenidos por Real Time PCR mostró una mediana de 0,33 con un rango de 0,09 a 4,03.

Se correlacionaron los valores obtenidos por ambas técnicas para una misma muestra mediante el test de Spearman y se obtuvo una correlación con un $p=0,028$.

La siguiente gráfica (Fig. 5) fue construida a partir de los valores obtenidos por ambas técnicas para una misma muestra. Se observa una tendencia positiva mostrando correlación entre los valores obtenidos por ambas técnicas.

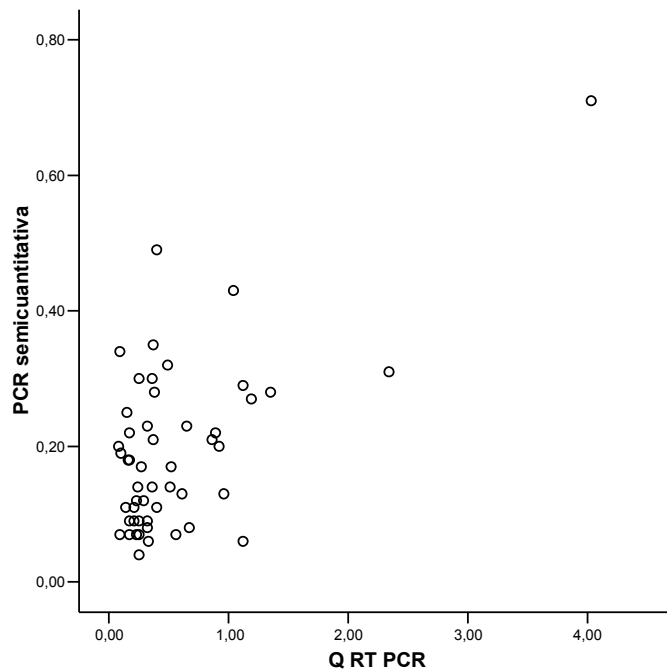


Figura 5: Gráfica de distribución de los valores de expresión relativa de BRCA 1 obtenidos para una misma muestra por Real Time PCR y RT- PCR semicuantitativa. En el eje de las ordenadas se representan los valores de expresión relativa de BRCA 1 obtenidos por la técnica PCR semicuantitativa y en el eje de las abscisas los valores obtenidos mediante Real Time PCR (Q RT PCR).

Correlación de la expresión de BRCA 1 con parámetros clínico-patológicos y con otros parámetros estudiados.

Se correlacionó la expresión de BRCA 1 con marcadores de la vía endócrina como son los receptores de estrógenos y de progesterona, así como de la vía parácrina, tales como el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (REGF) y AKT-fosforilada, no encontrándose correlaciones significativas (Test de Correlación de Spearman, $p=NS$).

Se analizó también la relación entre la expresión de BRCA 1 obtenida por Real Time PCR con la recaída de las pacientes. Se vio que las mujeres que recayeron en la enfermedad presentaban niveles más bajos de expresión de BRCA 1 (5/42) que las pacientes que no recayeron (37/42) (Mann-Whitney, $p=0,009$). Si bien el número total de las pacientes es alto, son pocas las pacientes que recayeron siendo necesario aumentar la población estudiada para darle mayor poder estadístico al análisis. No se encontraron correlaciones significativas con otros parámetros clínico-patológicos (tamaño tumoral, compromiso ganglionar, edad de la paciente, grado histológico).

Diferencias de expresión de BRCA 1 en tumores con distintos fenotipos y entre el tejido tumoral y el tejido mamario normal alejado del tumor.

No se encontraron diferencias en la expresión de BRCA 1 en los tumores con fenotipo “triple negativo” y tumores con otros fenotipos. Los tumores con fenotipo “triple negativo” presentaron una media de expresión de BRCA 1 de $0,59 \pm 0,34$ mientras que el resto de los tumores presentó una media de expresión de $0,55 \pm 0,64$.

También se comparó la expresión de BRCA 1 en los tumores “triple negativos” y en el tejido mamario normal alejado del tumor. De las 5 parejas con las que se contaba con tejido tumoral y tejido mamario normal una fue descartada (7190). De las 4 parejas restantes en 3 casos la mama normal presentó mayor expresión de BRCA 1 que el tumor.

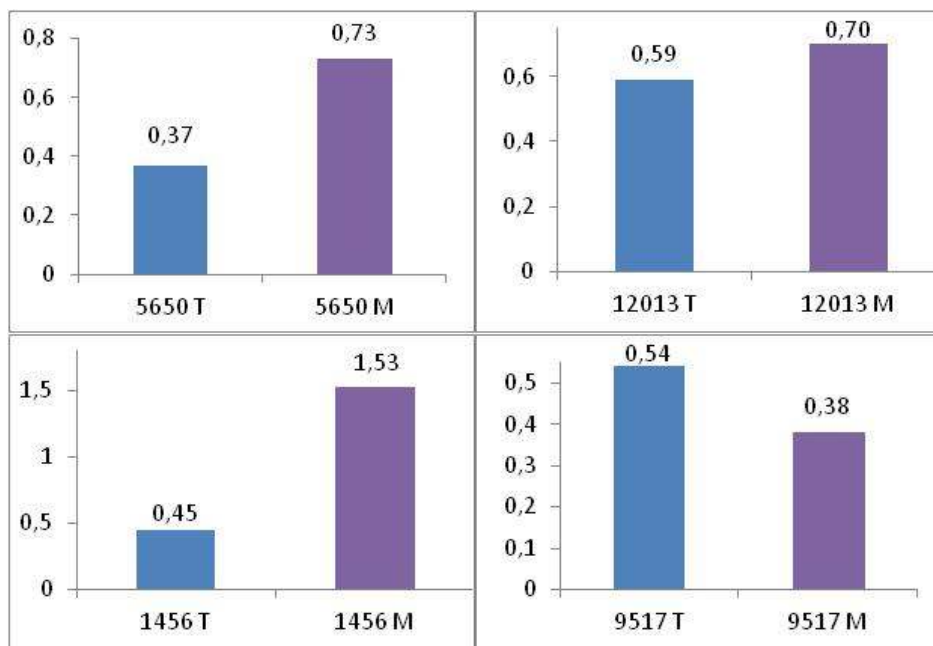


Figura 6: Comparación entre las expresión de BRCA 1 en los tumores “triple negativos” y el tejido mamario normal alejado del tumor. Las barras violetas corresponden a la expresión de BRCA 1 en el tejido mamario normal (M) y las barras azules a la expresión en el tejido tumoral (T). Debajo de cada gráfica se especifica el número de muestra.

Expresión del gen BRCA 1 y localización de la proteína en tumores con fenotipo “triple negativo” y en los tejidos normales alejados del tumor.

Se correlacionó la expresión del gen BRCA 1 con la localización de la proteína en tumores con fenotipo “triple negativo” y en el tejido mamario normal adyacente al tumor. A partir de las fotos obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia (Olympus BX61, módulo confocal FV-300) se valoraron para cada muestra, 3 secciones de tejido tumoral y normal (3-5 campos/sección) en experimentos independientes. La localización nuclear de BRCA 1 se verificó mediante las herramientas Multiplane view (Fluoview v.4.3) y Orthogonal views (ImageJ v.1.44p). Se calculó el porcentaje de células con focos nucleares en los distintos campos y se hizo un promedio. Se correlacionó la expresión del gen BRCA 1 con dicho valor mediante un estudio de correlación de variables no encontrándose ninguna relación (Test de Correlación de Spearman, $p=NS$).

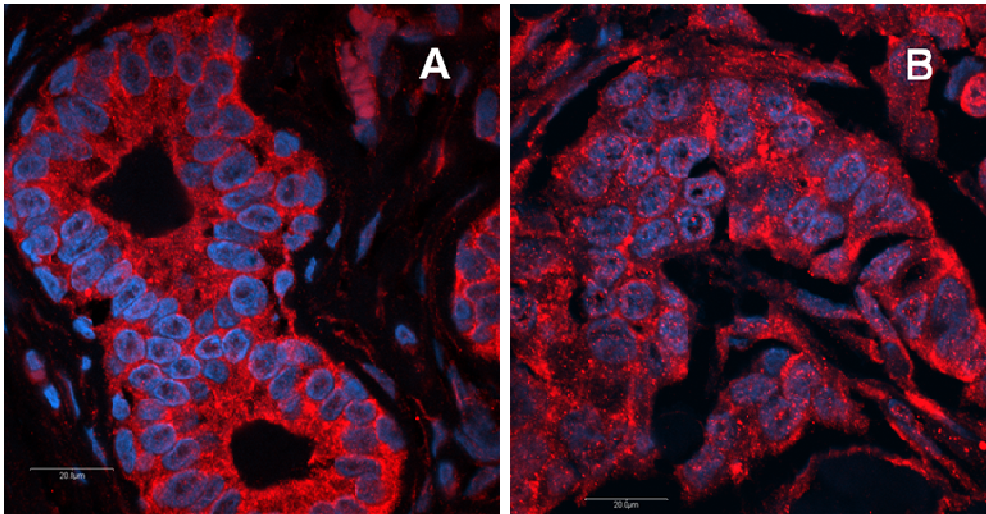


Figura 7: Imágenes de inmunofluorescencia de tejido de mama tumoral triple negativo y su correspondiente tejido mamario normal alejado del tumor. A Imágen de microscopio confocal mostrando inmunofluorescencia con anti-BRCA1 (c-20), Alexa Fluor 546 y contratinción de los núcleos con DAPI (azul) en secciones de tejido de mama normal (12013 M) fijado en formaldehído e incluido en parafina (5 μ m). **B** Imágen de microscopio confocal mostrando inmunofluorescencia con anti-BRCA1 (c-20) y Alexa Fluor 546 (rojo) y contratinción de los núcleos con DAPI (azul) en secciones de tejido de mama tumoral triple negativo (12013 T) fijado en formaldehído e incluido en parafina (5 μ m). Barra de escala: 20 μ m. Inmunofluorescencia: 120X (inmersión en aceite). Nota: se observa la pérdida de estructura glandular en el tejido mamario tumoral.

Discusión

Se logró cuantificar y semicuantificar el transcripto de BRCA 1 mediante las dos técnicas empleadas. Para determinar la sensibilidad de ambas técnicas y sus limitaciones, se realizaron diluciones seriadas de cDNA de células MDA MB 231 en un rango de 1 hasta 1/1000 y se realizó la semicuantificación por PCR a tiempo final así como la cuantificación por Real Time PCR de esas diluciones. Por la técnica Real Time PCR todas las diluciones pudieron ser cuantificadas y se vio que se mantenía la linealidad de la curva estándar así como la eficiencia de la reacción para ambos genes al aumentar la dilución (Fig. 3b y 4b). En cambio la PCR semicuantitativa mostró limitaciones en la semicuantificación de la dilución 1/1000 ya que no se obtuvo banda para ninguno de los dos genes (Fig. 1). Por lo tanto el nivel mínimo de detección de la curva estándar de diluciones fue 10 veces mayor (10^{-3}) mediante la técnica Real Time que por la RT-PCR semicuantitativa (10^{-2}).

PCR Semicuantitativa

A pesar de las limitaciones de la técnica todas las muestras pudieron ser semicuantificadas, incluso las muestras con menor expresión de BRCA 1.

Las intensidades de las bandas obtenidas para el BRCA 1 presentaron gran variación entre las distintas muestras. Asumiendo que se partió de la misma cantidad de ARN en todas las reacciones de retrotranscripción (1 μ g), que no hubo diferencias en las eficiencias de las reacciones y que la integridad del ARN y su pureza eran óptimas en todos los casos, y dado que la expresión del gen de referencia fue constante, las diferencias en la intensidad de las bandas del BRCA 1 corresponderían exclusivamente a diferencias de expresión en las distintas muestras. En algunas muestras la banda obtenida era prácticamente invisible a simple vista, sin embargo mediante el análisis de imagen fueron detectadas y se determinó un valor de intensidad neta reproducible en las distintas lecturas. Los valores de intensidad calculados por el software son coherentes con las intensidades de las bandas visualizadas en los geles y reproducibles, mostrando que el parámetro elegido para la lectura de las bandas fue adecuado.

Para normalizar la expresión del BRCA 1 se utilizó el gen β 2 microglobulina. La β 2 microglobulina presenta un orden mayor de expresión comparado con el BRCA 1 según los valores obtenidos de la lectura de las bandas. Se observa una expresión prácticamente constante del gen β 2 microglobulina en las diferentes muestras tumorales reflejando una expresión constitutiva del gen. Las pequeñas diferencias en la intensidad de las bandas se pueden deber a la cantidad de ARN del que se parte para la retrotranscripción, las eficiencias de las reacciones, así como el estado del ARN y su pureza en las distintas muestras. Estas variables afectan a ambos genes por igual por lo que el gen de referencia es utilizado para normalizar la expresión del gen de interés.

Con respecto a la especificidad de las reacciones se observa una gran especificidad tanto para la $\beta 2$ microglobulina como para BRCA 1. Se obtuvo un único producto de amplificación para cada gen con sus tamaños esperados. Para la $\beta 2$ microglobulina se obtuvo una única banda de 120 pb y para el BRCA 1 el tamaño de la banda obtenido es cercano al esperado de 69 pb (Fig. 2). A pesar de ello, se requiere la secuenciación de los productos de amplificación para confirmar su especificidad.

Real Time PCR

Se logró poner a punto la técnica para ambos genes obteniendo eficiencias de reacción similares y cercanas a 1 (100% de eficiencia).

Si bien la eficiencia promedio para la β actina dio un poco más baja ($0,92 \pm 0,03$) que para el BRCA 1 ($0,96 \pm 0,09$), la desviación estándar para este valor es mayor que para la β actina. Las eficiencias de las reacciones fueron muy buenas y se mantuvieron en las diferentes corridas. Esto nos dice que el experimento es robusto y reproducible.

Es importante destacar que en las corridas donde se importaron las curvas estándar se asume que la eficiencia de la reacción no varía. Tras realizar varias curvas estándar en corridas diferentes y observar que la eficiencia se mantenía constante, se asume que la eficiencia no varía.

Los valores de Ct obtenidos para la β actina en las muestras eran menores que los de BRCA 1 en la mayoría de los casos, reflejando una mayor expresión, ya que existe una relación inversa entre el Ct y la concentración del mensajero. En todos los casos los valores de Ct obtenidos estaban comprendidos dentro del rango de concentraciones estudiado para los dos genes. Es importante abarcar el mayor rango posible, ya que si una muestra presenta valores de expresión muy altos o muy bajos que se encuentran por fuera del rango estudiado, esos valores no deberían ser considerados porque no se conoce el comportamiento de la curva en los extremos.

Muestras con Ct muy alto tampoco deberían ser tenidas en cuenta (Ct mayores a 40) por la baja eficiencia de la reacción⁵⁴. Los cDNA de ARNs de tejidos FFPE fueron los que presentaron los Ct más altos probablemente por el estado deteriorado del ARN.

La fijación con formalina provoca modificaciones covalentes al ARN adicionando grupos monometilol a las bases, fija las interacciones entre proteínas y los ácidos nucleicos y produce ruptura de las hebras de ADN y fragmentación del ARN⁴⁵. Generalmente el ARN obtenido a partir de estos tejidos se encuentra altamente degradado por lo que los resultados obtenidos deben ser interpretados con mucho cuidado. A pesar de los efectos negativos que tiene esta técnica de conservación sobre el ARN, son cada vez más los estudios de expresión génica que utilizan este tipo de tejidos ya que son más fácil de acceder que los tejidos frescos. Por lo que sería necesaria la implementación de un protocolo de fijación de tejidos en formalina embebidos en parafina de manera de conservar el ARN lo mejor posible.

Real Time vs PCR semicuantitativa

La PCR semicuantitativa permite estimar el nivel de expresión de un gen. Muchas son las variables que afectan el resultado; desde eficiencias de reacción, cantidad del producto sembrado, la corrida en el gel, el método elegido para visualizar las bandas y capturar la foto y el software utilizado para la lectura de las bandas.

En cambio, la Real Time PCR al no estar sujeta a estas variables, por ser más sensible y por detectar la amplificación en tiempo real, permite obtener resultados más certeros que pueden ser utilizados con fines clínicos. Se pueden establecer parámetros donde por encima o debajo de un valor definido uno podría predecir la evolución de la enfermedad, probabilidad de recaídas incluso respuesta a tratamientos.

Esta técnica podría ser implementada en cualquier laboratorio de diagnóstico, como una herramienta más para ser usada con fines clínicos

El estudio de correlación entre los valores de expresión de BRCA 1 obtenidos por Real Time y RT-PCR semicuantitativa (Fig. 5) muestra una tendencia positiva, reflejando una concordancia entre los valores obtenidos por ambas técnicas para una misma muestra. Analizando el gráfico se identifican dos muestras (282 y 419) que presentan valores muy distintos con una técnica y con la otra.

La muestra 282 presenta uno de los mayores valores de expresión en la semicuantificación (0,34), sin embargo con la cuantificación por Real Time el valor obtenido corresponde a la expresión más baja (0,09). Se vuelve a analizar esa muestra en particular y se ve que el valor de concentración obtenido por Real Time PCR para la β actina es muy elevado en comparación con las demás muestras. Al realizar el cociente entre la concentración obtenida para el BRCA 1 y la β actina se obtiene un valor cercano a cero. Esta muestra debe repetirse ya que el valor obtenido de expresión relativa por Real Time no concuerda con el valor obtenido por la semicuantificación y no estaría representando la expresión de BRCA 1.

La otra muestra que se aparta de la distribución de los puntos en la correlación es la 419. La concentración calculada para el BRCA 1 por Real Time para la muestra 419 es superior a la concentración calculada para la β actina haciendo que el valor de expresión relativa sea 1,12. Este valor tampoco es coherente con el valor obtenido en la semicuantificación (0,06). En esta muestra en particular la baja concentración calculada para la β actina hace que el cociente sea mayor a 1. Por lo tanto estamos frente a otro valor de expresión relativa que es influenciado por el valor obtenido para la β actina y no refleja el nivel de expresión de BRCA 1. Esta muestra también debería repetirse para confirmar el valor obtenido. Una explicación puede surgir a partir de la integridad del ARN. La integridad del ARN para esta muestra fue clasificada como media (Tabla 2) por lo que tal vez sea éste el factor que esté interfiriendo en los resultados, llevando a subestimar la expresión de la β Actina.

Algunos autores sugieren la utilización de más de un gen como referencia (un pool de genes) de manera de obtener un factor de normalización más preciso y mayor confiabilidad en los resultados obtenidos^{52,53}.

El rango de los valores de expresión relativa de BRCA 1 obtenidos por ambas técnicas son diferentes, encontrándose comprendido uno dentro del otro. Sin embargo, las medianas obtenidas son similares y reflejan niveles bajos de expresión de BRCA 1.

El estudio comparativo de expresión entre los tumores con fenotipo “triple negativo” y el tejido mamario normal alejado del tumor indica que parecería ser mayor la expresión de BRCA 1 en la mama normal que en el tumor, como fue publicado por Yang et al²⁸ y Thompson et al²⁹. Pero no es posible afirmar que la expresión en el tejido mamario normal es mayor que en el tejido tumoral porque el número de muestras pareadas con las que se contaba es muy reducido. También sería necesaria la cuantificación de BRCA 1 en la mama normal para definir lo que sería una expresión normal y una expresión baja. Al haber mayor transcripción de BRCA 1 en las células normales, los niveles de proteína deberían ser mayores por lo que la proteína BRCA 1 sería funcional, siempre que no hubiera otros mecanismos actuando que alteraran su función. En cambio en los tumores, los bajos niveles de expresión del gen BRCA 1 podrían implicar una disfunción de la proteína en las células debido a la baja traducción de la proteína.

Se comparó la expresión del BRCA 1 en los tumores con fenotipo “triple negativo” y en tumores con otros fenotipos. Si bien no se encontraron diferencias de expresión, son pocos los tumores “triple negativos” estudiados (8/59). Sería necesario aumentar el número de tumores analizados para poder afirmar que realmente no existen diferencias en la expresión de BRCA 1 entre el grupo de tumores “triple negativo” y el resto de los fenotipos.

La localización de la proteína BRCA 1 en los tumores mamarios también es importante de conocer ya que podría estar vinculado con la disfunción de la proteína y el desarrollo del cáncer. En este trabajo se correlacionó la expresión del transcripto de BRCA 1 con la localización de la proteína. Si bien no se encontró ninguna correlación eran pocas las muestras analizadas que contaban con las imágenes de inmunofluorescencia para realizar la correlación. Se pretende seguir realizando la inmunofluorescencia en las muestras ya analizadas por Real Time PCR para aumentar la cantidad de casos y obtener una correlación con mayor potencia estadística.

El transcripto del gen BRCA 1 pudo ser cuantificado en todas las muestras tumorales incluidas en el estudio, a diferencia de algunos trabajos donde se reporta que la expresión de BRCA 1 en algunos tumores de mama es nula⁵⁵. En este trabajo se estudió la expresión de BRCA 1 a nivel transcripcional pero no refleja necesariamente los niveles de proteína presentes en las células. La falta de concordancia entre el ARNm y la cantidad de proteína es particularmente cierto para transcriptos que codifican para proteínas que forman parte de complejos multiproteicos⁵⁴ como es caso de la proteína BRCA 1. Si bien se realizaron estudios de inmunofluorescencia para algunas muestras, lo que permite esta técnica es determinar la localización de la proteína pero no una cuantificación de la misma. Para estudiar los niveles de proteína en las muestras tumorales se podrían llevar a cabo técnicas de cuantificación de proteínas específicas como puede ser western blot o inmunoprecipitación y una posterior cuantificación por absorbancia.

Se han propuesto mecanismos post-transcripcionales que podrían regular la expresión de la proteína. Entre estos mecanismos se proponen una eficiencia reducida en la traducción o pérdida de la estabilidad de la proteína⁵⁶. Otros autores proponen que puede ser inactivada

después de traducida (mecanismos post-traduccionales) como pueden ser errores en la fosforilación³⁷ impidiendo su funcionamiento normal en la célula. Por lo tanto niveles bajos del ARNm así como mecanismos post transcripcionales que afecten la traducción de la proteína, la estabilidad o la función llevarían a una disfunción de la proteína en las células, predisponiendo a éstas a una inestabilidad en el genoma y una consecuente transformación en célula maligna y un probable desarrollo de un cáncer.

Los niveles de expresión de BRCA 1 han sido estudiados en diversos tipos de tumores ya que se ha planteado como una herramienta predictiva a la respuesta de quimioterapias. Estudios en cáncer de pulmón muestran que los niveles de expresión de BRCA 1 se correlacionan negativamente con la sensibilidad a quimioterapia con cisplatino, es decir tumores con baja expresión de BRCA 1 son más sensibles a la droga que tumores con alta expresión de BRCA 1^{47,57}. Los niveles de expresión de BRCA 1 también pueden ser usados como biomarcadores para la respuesta y sensibilidad a drogas en tumores de mama. Se ha reportado que tumores de mama con altos niveles de expresión de BRCA 1 responden favorablemente a quimioterapias que contienen antraciclina⁵⁸. Los niveles de ARNm de BRCA 1 también pueden ser usados como un marcador predictivo de sobrevida⁵⁹.

En este trabajo se presentan resultados que sugieren que la expresión de BRCA 1 podría ser utilizada como un marcador predictivo de la recaída de las pacientes. Mujeres que recayeron en la enfermedad presentaban niveles bajos de expresión de BRCA 1 (5/42) mientras que pacientes con altos niveles de BRCA 1 no recayeron (37/42).

Células deficientes en la función de BRCA 1 tienen defectuoso el mecanismo de reparación de rupturas de doble cadena lo que las hace particularmente quimiosensibles a drogas que generan este tipo de rupturas en la cadena de ADN¹² y también son altamente sensibles a inhibidores químicos de la enzima poli (ADP ribosa) polimerasa^{60,61}. Por lo que determinar la disfunción de la proteína es una herramienta fundamental para el diseño de tratamientos.

El estudio de los mecanismos que regulan, especialmente que silencian la transcripción del gen BRCA 1 en los tumores de mama esporádicos es un interesante campo para la investigación. Identificar vías que pudieran ser modificadas abriría la llave al diseño de novedosas estrategias terapéuticas para controlar la expresión de este gen³⁵.

Patrones de expresión génica determinados por microarreglos podrían ser una estrategia útil para predecir respuesta a tratamientos así como riesgo de muerte y de metástasis en pacientes portadoras de cáncer de mama. Esta estrategia sería personalizada y complementaria a los factores clínicos y patológicos usados tradicionalmente para el diseño de tratamientos (edad de la paciente, estado menopáusico, tamaño tumoral, estado ganglionar, entre otros)⁶².

El gen BRCA 1 es un gen clave en el desarrollo de los tumores mamarios. Comprender con más precisión el rol que cumple en las células, en el desarrollo del tumor, las vías en las que participa y las proteínas con las que interacciona permitirá desarrollar estrategias terapéuticas

que aumenten la eficacia de los tratamientos, disminuyan las recaídas y reduzcan las muertes por esta enfermedad.

Conclusiones

Se logró amplificar el gen BRCA 1 en todas las muestras tumorales mediante las dos técnicas empleadas. Se vio que la técnica Real Time PCR es mucho más sensible y es la más adecuada para determinar la expresión de BRCA 1 en tumores mamarios. Se obtuvieron datos preliminares que sugieren una mayor expresión de BRCA 1 en la mama normal que en el tumor, y que la expresión de BRCA 1 se correlacionaría indirectamente con la probabilidad de recaída de las pacientes; por lo que BRCA 1 se perfila como un marcador pronóstico de la evolución de las pacientes.

Agradecimientos

Un agradecimiento especial a mi tutora Dra. Nora Artagaveytia por su apoyo incondicional, a los compañeros del LRH: Msc. Gonzalo Manrique por la orientación en la técnica Real Time, Msc. Paula Cancela y Dra. Silvina Heinzein por las imágenes de inmunofluorescencia y a la Dra. Carolina Diaz por su colaboración en la parte experimental; a Jaqueline por los materiales de vidrio y a todo el Departamento Básico de Medicina. También quiero agradecer a Gonzalo Greif por la coordinación para la utilización del RotorGene en el Instituto Pasteur; y por último a mi familia y amigos por el apoyo durante esta etapa que hoy llega a su fin.

Bibliografía

1. Barrios E., Vassallo J.A, Alonso R., Garau M. & Musetti C.in *III Atlas de incidencia de cáncer en el Uruguay 2002-2006* 15 (Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2010).
2. Xiang, T. *et al.* Targeting the Akt/mTOR pathway in Brca1-deficient cancers. *Oncogene* **30**, 2443–2450 (2011).
3. Xiang, T. *et al.* Negative regulation of AKT activation by BRCA1. *Cancer Res* **68**, 10040–10044 (2008).
4. Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66–71 (1994).
5. Allain, D. C. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn* **10**, 383–395 (2008).
6. Futreal, P. A. *et al.* BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**, 120–122 (1994).

7. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
8. Livasy, C. A. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.* **19**, 264–271 (2006).
9. Reis-Filho, J. S. & Tutt, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* **52**, 108–118 (2008).
10. Rakha, E. A. *et al.* Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4772–4778 (2007).
11. Sotiriou, C. & Pusztai, L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 790–800 (2009).
12. Turner, N., Tutt, A. & Ashworth, A. Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 814–819 (2004).
13. Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V. & Boehning, D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and structural biotechnology journal* **1**, (2012).
14. Vallon-Christersson, J. *et al.* Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 353–360 (2001).
15. Ludwig, T., Fisher, P., Ganesan, S. & Efstratiadis, A. Tumorigenesis in mice carrying a truncating Brca1 mutation. *Genes Dev.* **15**, 1188–1193 (2001).
16. Watson, J. *Biología molecular del gen.* (Ed. Médica Panamericana, 2006).
17. Lorick, K. L. *et al.* RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11364–11369 (1999).
18. Wu, L. C. *et al.* Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat. Genet.* **14**, 430–440 (1996).
19. Hashizume, R. *et al.* The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* **276**, 14537–14540 (2001).
20. Scully, R. *et al.* Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol. Cell* **4**, 1093–1099 (1999).
21. Wang, H. *et al.* BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene* **15**, 143–157 (1997).
22. Xu, X. *et al.* Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* **3**, 389–395 (1999).
23. Deng, C.-X. & Brodie, S. G. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays* **22**, 728–737 (2000).
24. Vaughn, J. P. *et al.* BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells. *Cell Growth Differ.* **7**, 711–715 (1996).
25. Ruffner, H. & Verma, I. M. BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7138–7143 (1997).
26. Shao, N., Chai, Y. L., Shyam, E., Reddy, P. & Rao, V. N. Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* **13**, 1–7 (1996).
27. Coene, E. D. *et al.* A novel role for BRCA1 in regulating breast cancer cell spreading and motility. *J. Cell Biol.* **192**, 497–512 (2011).
28. Yang, Q. *et al.* BRCA1 in non-inherited breast carcinomas (Review). *Oncol. Rep.* **9**, 1329–1333 (2002).
29. Thompson, M. E., Jensen, R. A., Obermiller, P. S., Page, D. L. & Holt, J. T. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genetics* **9**, 444–450 (1995).
30. Birgisdottir, V. *et al.* Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **8**, R38 (2006).

31. Esteller, M. *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 564–569 (2000).
32. Herman, J. G. & Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042–2054 (2003).
33. Rice, J. C. & Futscher, B. W. Transcriptional repression of BRCA1 by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the BRCA1 promoter. *Nucleic Acids Res* **28**, 3233–3239 (2000).
34. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–2132 (2007).
35. Roldán, G., Delgado, L. & Musé, I. M. Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 505–510 (2006).
36. De Siervi, A. *et al.* Transcriptional autoregulation by BRCA1. *Cancer Res.* **70**, 532–542 (2010).
37. Welcsh, P. L. & King, M.-C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 705–713 (2001).
38. Scully, R. *et al.* BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5605–5610 (1997).
39. Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Nakajima, T., Wolpin, E. S. & Parvin, J. D. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat. Genet.* **19**, 254–256 (1998).
40. Chen, Y. *et al.* Aberrant Subcellular Localization of BRCA1 in Breast Cancer. *Science* **270**, 789–791 (1995).
41. Thakur, S. *et al.* Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* **17**, 444–452 (1997).
42. Chen, C.-F. *et al.* The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin-alpha Subunit of the Nuclear Transport Signal Receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 32863–32868 (1996).
43. Fabbro, M., Rodriguez, J. A., Baer, R. & Henderson, B. R. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J. Biol. Chem.* **277**, 21315–21324 (2002).
44. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
45. Ma, Z., Lui, W.-O., Fire, A. & Dadras, S. S. Profiling and Discovery of Novel miRNAs from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Melanoma and Nodal Specimens. *J Mol Diagn* **11**, 420–429 (2009).
46. Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P. H. & Murphy, L. C. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* **58**, 3197–3201 (1998).
47. Roberta Bartolucci, J. W. XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression. *Clinical lung cancer* **10**, 47–52 (2009).
48. Chevillard, S. *et al.* Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* **77**, 292–300 (1996).
49. Agilent Technologies *Introduction to Quantitative PCR - Methods and Applications Guide.* at <[http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/Brochure_Guide to QPCR_IN70200C.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/Brochure_Guide_to_QPCR_IN70200C.pdf)>
50. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).

51. Yuan, J., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**, 85 (2006).
52. Radonić, A. *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 856–862 (2004).
53. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
54. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
55. Al-Mulla, F., Abdulrahman, M., Varadharaj, G., Akhter, N. & Anim, J. T. BRCA1 Gene Expression in Breast Cancer: A Correlative Study between Real-time RT-PCR and Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **53**, 621–629 (2005).
56. Miyamoto, K. *et al.* Promoter Hypermethylation and Post-transcriptional Mechanisms for Reduced BRCA1 Immunoreactivity in Sporadic Human Breast Cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **32**, 79–84 (2002).
57. Wang, L. *et al.* ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer* **8**, 97 (2008).
58. Egawa, C. *et al.* Increased Expression of BRCA1 mRNA Predicts Favorable Response to Anthracycline-Containing Chemotherapy in Breast Cancers. *Breast Cancer Research and Treatment* **78**, 45–50 (2003).
59. Quinn, J. E. *et al.* BRCA1 mRNA Expression Levels Predict for Overall Survival in Ovarian Cancer after Chemotherapy. *Clin Cancer Res* **13**, 7413–7420 (2007).
60. Brody, L. C. Treating cancer by targeting a weakness. *N. Engl. J. Med.* **353**, 949–950 (2005).
61. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921 (2005).
62. Sotiriou, C. & Piccart, M. J. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nature Reviews Cancer* **7**, 545–553 (2007).