ANALYSIS FOR POTENTIAL PREDICTIVE FACTORS BY GENE EXPRESSION ANALYSIS OF LYMPH NODE METASTASES AND PRIMARY BREAST CARCINOMAS

***Silva RM1, Ribeiro EA1, Canto AL2, Moraes LHF3, Canevari RA1***

1 Laboratório de Biologia Molecular do Câncer, LEVB, Universidade do Vale do Paraíba, IP&D;

2 Centro de Medicina Diagnóstica, São José dos Campos, Brasil;

3 Hospital São Francisco de Assis, Departamento de Mastologia, Jacareí, Brasil.

**Resumo –** O *status* dos linfonodos axilares é o fator prognóstico mais informativo no tratamento das pacientes com câncer de mama. Contudo, atualmente na prática clínica a decisão da dissecção dos linfonodos é ainda realizada por meio da biopsia do linfonodo sentinela, o que muitas vezes pode trazer sequelas para a paciente ou originar resultados incorretos. Assim, a identificação de marcadores moleculares no tumor primário que possa permitir uma classificação mais precisa das pacientes em relação à necessidade ou não da dissecação dos linfonodos axilares, é extremamente importante para uma conduta clínica mais adequada. O objetivo deste estudo foi determinar se os genes *SERPINA1, TFF3*, *TFF1, ARD1A, NGX6 e DKK1* são marcadores preditivos em câncer de mama pela análise de expressão gênica de RT-qPCR. Para isto, foi comparado o grupo de tumores primários com envolvimento de linfonodos e tumores primários sem linfonodos acometidos, além da análise dos linfonodos correspondentes. Para todos os genes avaliados neste trabalho, apenas o gene *TFF1* apresentou uma expressão diferenciada quando comparado tumor primário e seu linfonodo correspondente, mas não se pode dizer que ele é um gene preditivo por não haver diferença estatística na comparação do tumor primário linfonodo positivo com o tumor primário linfonodo negativo.

**Palavras-chave:** expressão gênica, linfonodo axilar, câncer de mama.

**Abstract –** The status of axillary lymph nodes is the most informative prognostic factor in the treatment of patients with breast cancer. However, currently in clinical practice the decision to dissect lymph nodes is still performed through sentinel lymph node biopsy, which often can bring consequences to the patient or give incorrect results. Thus, the identification of molecular markers in the primary tumor that may allow a more accurate classification of the patients in relation to the necessity or not of axillary lymph node dissection is extremely important for a more adequate clinical management. The aim of this study was to determine if the *genes SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* and *DKK1* are predictive markers in breast cancer by the analysis of gene expression of RT-qPCR. For this, we compared the group of primary tumors with involvement of lymph nodes and primary tumors without affected lymph nodes, in addition to the analysis of the corresponding lymph nodes. For all genes evaluated in this study, only the *TFF1* gene showed a differential expression compared primary tumor and its associated lymph node, but you can’t say that it is a predictive gene because no statistical differences in lymph node positive primary tumor with lymph node negative primary tumor.

**Key words:** Gene expression, axillary lymph node, breast cancer.

1. **Introdução**

No planejamento terapêutico, o câncer de mama é o tumor mais incidente no mundo e com a maior taxa de mortalidade no gênero feminino (WHO, 2015). Considerando ambos os sexos, este tumor é o segundo tipo de câncer mais frequente do mundo e o mais comum entre as mulheres, sendo considerada a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos e a primeira em países em desenvolvimento (WHO, 2015). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa do número de casos novos de câncer de mama esperados para a população brasileira em 2016 é de 57.960 (INCA, 2016). Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade continuam elevadas, devido a uma alta quantidade de casos ainda diagnosticados em estágios mais evoluídos. Do ponto de vista histológico e genético, estes tumores são heterogêneos, constituído por uma variedade de tipos celulares e apresentando perfis genéticos diferentes mesmo considerando o mesmo tipo histológico (JORNS et al., 2014).

Pacientes com acometimento de linfonodos são consideradas como um subgrupo de prognóstico desfavorável, ou seja, com uma maior probabilidade de desenvolver metástase em órgãos distantes (Moebus et al., 2010). A busca por marcadores moleculares como fatores preditivos do acometimento de linfonodos em câncer de mama auxilia na seleção mais precisa das pacientes onde a dissecação dos linfonodos axilares é indicada em relação às pacientes onde este procedimento é desnecessário (Cheng et al., 2011). Além disso, é importante identificar e determinar se as alterações na expressão gênica que ocorrem em metástases de linfonodos axilares regionais são similares ao tumor primário para evitar a dissecação total dos linfonodos axilares (Shriver et al., 2014). Com o advento dos métodos diagnósticos moleculares baseados em PCR, em especial a técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), tem sido possível a detecção de marcadores moleculares em tumores primários de câncer de mama com significativo potencial preditivo e prognóstico em relação ao risco de metástases axilares e sistêmicas, respectivamente (Kurosumi e Takei, 2007; Shriver et al.,2014; Canevari et al., 2016).

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar o potencial preditivo dos genes *SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1* em relação ao risco das pacientes com câncer de mama desenvolver metástases axilares, e assim auxiliar na seleção mais precisa das pacientes onde a dissecação dos linfonodos axilares é desnecessária das quais onde este procedimento é indicado. Para isso, a análise de expressão gênica pela RT-qPCR foi realizada em pacientes com tumores primários com acometimento de linfonodos e pacientes com tumores primários sem envolvimento de linfonodos, além da realização da análise de expressão gênica nos linfonodos acometidos pelas células tumorais.

1. **Metodologia**
	1. **Casuística**

Neste estudo foram utilizadas 51 amostras de tumores primários, obtidas imediatamente após a cirurgia de pacientes com câncer de mama, sendo 28 tumores primários linfonodo negativo, 23 tumores primários linfonodo positivo e 11 amostras de metástases nos linfonodos axilares correspondentes. Duas comparações foram realizadas: na análise 1 foi comparado amostras de tumor primário de pacientes com acometimento de linfonodos *versus* tumor primário de pacientes linfonodo negativo; na análise 2 foi comparado o tumor primário com o linfonodo correspondente em cada paciente. Amostras de tecido normal foram obtidas de pacientes submetidas à redução mamária e serviram como controle do estudo. As amostras são provenientes do biorrepositório pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular do Câncer (Grupo LEVB) do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D – UNIVAP). O projeto obteve aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Vale do Paraíba (n° parecer 1.400.691).

* 1. **Extração do RNA e síntese do cDNA**

A extração do RNA foi realizada segundo o protocolo *RNeasy Lipid Tissue (Qiagen)*. As caracterizações quantitativas e qualitativas das amostras de RNA extraídas foram feitas pelo método de espectroscopia de absorção no ultravioleta no equipamento *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e eletroforese em gel de agarose a 1%, respectivamente. A síntese de cDNA foi realizada pelo sistema de pré-amplificação *Superscript™ IV*, que inclui os reagentes *SuperScript ® IV* / *RNaseOUT™* *Enzyme Mix, 2X First-Strand Reaction Mix*, e *Buffer* de anelamento (*Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA)*.

* 1. **Análise de RT-qPCR**

Os iniciadores para a amplificação dos genes *SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1* foram desenhados no software *Primer Express* (versão 3.0) (*PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os detalhes dos iniciadores estão na Tabela 1.

A detecção de alterações de expressão gênica pela RT-qPCR foi realizada no equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Life Technologies, USA)*. O reagente *Platinum® SYBR® Green RT-qPCR Super Mix UDG (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA)* foi utilizado nas reações de análise de expressão.

Foi realizada a curva padrão tanto para os genes alvos *SERPINA1*, *TFF3*, *TFF1, ARD1A, NGX6,* e *DKK1,* quanto para o gene endógeno *MRLP19,* possibilitando o cálculo da eficiência de amplificação dos iniciadores de cada gene bem como a definição da melhor diluição a ser utilizada no experimento. A análise da curva padrão foi realizada pelos valores de *slope* fornecidos pelo *software (Sequence Detection System software, versão 2.1, PE Applied Biosystems),* os quais estiveram próximos ao valor de -3,3, sendo este o valor esperado. A curva de dissociação, que avalia a temperatura do pico de amplificação para cada gene *versus* a intensidade da fluorescência, foi obtida para cada gene, onde foi possível averiguar se houve a presença de *primer dimers* e a presença de quaisquer contaminantes na análise. Os *thresholds* definidos foram os mesmos em todas as corridas PCR *arrays*.

Tabela 1. Detalhes dos genes utilizados na análise de RT-qPCR

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Gene | Nome do gene | Função | *Amplicon* | Sequencia dos iniciadores |
| *SERPINA1* | *Serpin Family A Member 1* | Capacidade invasiva e metastática  | 63 | *Forward*: 5’TGCCAGCTTACATTTACCCAAA3’ *Reverse*: 5’CCCAGGACGCTCTTCAGATC3’ |
| *TFF3* | *Trefoil Factor 3* | Estimula a angiogenese, promove proliferação celular e invasão linfática | 55 | *Forward*: 5’GATTGCTGCCAGGCACTGT3’*Reverse*: 5’CTTGCCGGGAGCAAAGG3’ |
| *TFF1* | *Trefoil Factor 1* | Estimula invasão celular. Gene de resposta ao estrógeno | 60 | *Forward:* 5’CATCGACGTCCCTCCAGAA3’*Reverse*: 5’CAGGCAGATCCCTGCAGAA3’ |
| *ARD1A* | *N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit* | Regulador de metástase, crescimento celular, autofagia e diferenciação celular | 57 | *Forward*: 5’CCGCCCTGCACCTCTATTC3’*Reverse*: 5’TGGGCTCCACTTCACTGATCT3’ |
| *NGX6* | *Transmembrane Protein 8B* | Regula proliferação celular, aumenta adesão celular, migração e invasão celular | 58 | *Forward*: 5’CCGTGCGCCAGGAAAAC3’*Reverse*: 5’CTCAAGGGCACCTCGTGAGT3’ |
| *DKK1* | *Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1* | Modulador da Via de Sinalização Wnt, induz apoptose e crescimento celular | 96 | *Forward*: 5’TCTGTTTGTCTCCGGTCATCAG3’*Reverse*: 5’TCTGTTTGTCTCCGGTCATCAG3’ |
| *MRLP19* | *Mitochondrial Ribosomal Protein L19* | Proteína ribossomal mitocondrial mamária | 70 | *Forward*: 5’TCTCGACACCTTGTCCTTCGA3’*Reverse*: 5’CAGAGATCAGGAAGAGGACTTGGA3’ |

* 1. **Análise dos resultados e análise estatística**

As análises estatísticas que compararam as características clinicopatológicas (idade, tipo histológico, grau histológico, estado de ER, PGR, HER2 e Ki-67 por IHQ (Imunohistoquímica), estadiamento tumoral e tamanho do tumor) com a presença ou ausência de envolvimento linfonodal foram realizadas utilizando o *IBM SPSS Software* estatístico versão 20.0 e teste qui-quadrado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em *P*≤0,05.

A análise da expressão relativa para cada gene alvo e a consequente obtenção dos QR (quantificação relativa ou *fold change*) foi realizada pelo método Delta Delta Ct (PFAFFL, 2001). Os valores médios dos Cts obtidos para os genes alvos foram comparados com a média dos Cts do gene endógeno e posteriormente normalizados pela média das amostras normais para a obtenção dos valores de QR.

O QR ou *fold change* (2^(- Delta Delta Ct)), que consiste no valor da expressão do gene normalizado (2^(- Delta Ct)) nas amostras do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado (2^(- Delta Ct)) na amostra do grupo controle (não tumoral), foi calculado para cada gene. Este cálculo é dado pela fórmula: 2^(-DDCt). Os valores de *fold-change* maior que dois indica um aumento de expressão para o gene alvo, e o *fold-change* menor que 0,5 indica diminuição de expressão gênica, com grau de significância de *p- value* < 0,05 (teste *t* de *Mann Whitney*).

1. **Resultados**
	1. **Características clínico-patológicas**

Em um estudo prévio de nosso grupo (Paula et al., 2015), onde se utilizou as mesmas amostras e critérios de avaliação, foi realizada a análise das características clinico-patológicas das pacientes, onde os resultados obtidos estão descritos a seguir. A idade média dos pacientes ao diagnóstico foi de 57 anos (53-60 anos). De acordo com dados clínico-patológicos, 53% dos pacientes eram linfonodo negativos e 47% linfonodo positivos, sendo o número médio de linfonodos metastáticos de 6,04% (faixa 1-21). A idade média no momento do diagnóstico não diferiu significativamente entre aquelas com metástase linfonodal e sem metástase linfonodal, 53 e 60 anos, respectivamente.

Os pacientes foram escolhidos com base na disponibilidade da amostra em vez de parâmetros clínicos, assim os tumores analisados ​​representam uma variedade de tipos de tumor e características patológicas. A maioria dos espécimes foi de pacientes com ductal invasivo (84%), predominantemente T1 e T2 (90%). A maioria dos pacientes apresentaram ER positivo (80%), PgR (78%) e HER2 (50%) positivo. Duas pacientes foram diagnosticados com câncer de mama em estágio IV; um paciente veio a óbito e outros quatro desenvolveram metástases à distância alguns meses após o diagnóstico. Nenhum dos achados patológicos avaliados diferiu significativamente entre os grupos (tumores primários em mulheres com status de linfonodos negativo e positivo: idade (*P* = 0,2047), tipo histológico (*P* = 0,2609), grau histológico (*P* = 1,0000), ER (*P* = 0,6889), PGR (*P* = 0,4411), HER2 (*P* = 0,2734) e Ki-67 (*P* = 0,4221) status, fase tumoral (*P* = 0,6492) e tamanho do tumor (*P* = 1,0000). Estes resultados indicaram que as características clinicopatológicas das amostras analisadas não estão relacionadas à presença ou ausência de metástase linfonodal (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínico-patológicos de 51 amostras tumorais de 49 pacientes com carcinomas mamários primários relacionados ao estado de linfonodos axilares

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Características** | ***n*** | **Linfonodo positivo** | **Linfonodo negativo** |
|  |  | ***n* (%)** | ***n* (%)** |
| **Idade** | **49** |  |  |
| ≤ 50 anos |  | 9 (18%) | 5 (10%) |
| >50 anos |  | 14 (29%) | 21 (43%) |
| **Histologia** | **51** |  |  |
| Ductal invasivo |  | 21 (42%) | 21 (42%) |
| Outros |  | 3 (6%) | 6 (8%) |
| **Grau histológico** | **46a** |  |  |
| 1 e 2 |  | 13 (28%) | 14 (30%) |
| 3 |  | 10 (20%) | 9 (18%) |
| **Status do receptor de Estrógeno** | **35a** |  |  |
| ER - |  | 2 (6%) | 5 (14%) |
| ER + |  | 11 (31%) | 17 (49%) |
| **Status do receptor de Progesterona** | **45a** |  |  |
| PgR - |  | 4 (9%) | 6 (13%) |
| PgR + |  | 9 (20%) | 26 (58%) |
| **Status do HER2**  | **32a** |  |  |
| HER2 - |  | 4 (13%) | 12 (38%) |
| HER2 + |  | 8 (25%) | 8 (25%) |
| **Status do Ki67** | **27a** |  |  |
| Ki67 (> 25%) |  | 4 (15%) | 5 (19%) |
| Ki67 (≤ 25%) |  | 5 (19%) | 13 (48%) |
| **Estadiamento do tumor** | **48a** |  |  |
| T1 e T2 |  | 19 (40%) | 24 (50%) |
| T3 e T4 |  | 3 (6%) | 2 (4%) |
| **Tamanho do tumor** | **47a** |  |  |
| ≤ 2 cm |  | 10 (21%) | 11 (23%) |
| > 2 cm |  | 13 (28%) | 13 (28%) |

a Informações sobre o câncer não foi disponibilizada para todas pacientes

* 1. **Expressão Gênica**

Neste estudo, a expressão dos seis genes (*SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1*), selecionados a partir de um estudo recente de Shriver (2014), foi avaliada através da técnica de RT-qPCR e foram realizada duas análises de comparação: na análise 1 foi comparado amostras de tumor primário de pacientes com acometimento de linfonodos versus tumor primário de pacientes linfonodo negativo; e na análise 2 foi comparado o tumor primário com o linfonodo correspondente em cada paciente.

Na comparação entre o grupo de pacientes com tumores primários sem acometimento de linfonodos (n = 28 amostras) com o grupo de pacientes com tumores com envolvimento de linfonodos (n = 23 amostras) (Análise 1), para todos os genes avaliados, não foi detectada diferença significativa (P < 0,05).

Na comparação entre os tumores primários (n = 11 amostras) com os linfonodos correspondentes (n = 11 amostras) das mesmas pacientes (Análise 2), se observou diferença significativa apenas para o gene *TFF1* (P < 0,05). Em amostras de tumor primário, três amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,01 a 0,48), em sete amostras foi possível observar aumento de expressão (QR = 2,36 a 336,01) e uma amostra apresentou expressão normal. Nas amostras de linfonodos das pacientes, sete amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,01 a 0,02), em quatro amostras foi possível observar aumento de expressão (QR = 13,91 a 297,26) e nenhuma amostra apresentou expressão normal. Quando comparado os dois grupos foi observada diferença significativa (P = 0,0209).

Os dados referentes à Análise 1 e 2 estão descritos e estão ilustrados na Tabela 3 e Figura 3 e 4.

Tabela 3. Valores de *p value* referentes a comparação da expressão gênica do grupo de amostras da Análise 1 e da Análise 2 (teste de Mann Whitney).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Gene** | ***p value* Análise 1** | ***p value* Análise 2** |
| ***SERPINA1*** | 0,3518 | 0,4194 |
| ***TFF3*** | 0,2606 | 0,2540 |
| ***TFF1*** | 0,9124 | 0,0209 |
| ***ARD1A*** | 0,4108 | 0,5614 |
| ***NGX6*** | 0,6809 | 0,7089 |
| ***DKK1*** | 0,9727 | 0,0971 |

Figura 3. Comparação entre as médias dos níveis de expressão dos genes *SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1* dos tumores primários linfonodo positivo *versus* linfonodo negativo pela análise de RT-qPCR (Análise 1).

QR: quantificação relativa do gene. TP: tumor primário

Figura 4. Comparação entre as médias dos níveis de expressão dos genes *SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1* dos tumores primários e linfonodos correspondentes pela análise de RT-qPCR (Análise 2).



QR: quantificação relativa do gene. TP: tumor primário

1. **Discussão**

 A população brasileira é uma das populações mais heterogêneas em todo o mundo. Por esta razão, as análises moleculares de expressão gênica pode levar a identificação de novos marcadores moleculares específicos para a população brasileira (Canevari et al., 2016). Poucos estudos na literatura (revisado por Paula et al., 2015) avaliam o potencial de novos marcadores moleculares em metástases de linfonodos de câncer de mama. E esta busca por novos genes expressos nos carcinomas mamários é de grande importância, dado a grande heterogeneidade deste tipo de tumor.

 Além disso, a pesquisa de marcadores moleculares pouparia mulheres com baixo risco de metástase linfonodal a partir de procedimentos cirúrgicos desnecessários, como o DLNA (Dissecação dos linfonodos axilares).

 O significado biológico da presença de envolvimento dos linfonodos e sua utilidade na orientação da terapia adjuvante e sistêmica tem sido objeto de muitos resultados discordantes. Para este fim, as assinaturas moleculares e os estudos de expressão em genes individuais encontraram resultados de significância de genes diferencialmente expressos em carcinoma mamário e foram capazes de estratificar pacientes com e sem metástase de linfonodos (Bertuci et al., 2000; Huang et al., 2003; Abba et al., 2007).

 Bertuci et al. (2000) usou *arrays* de cDNA, estudando os níveis quantitativos de expressão de mRNA de 176 genes candidatos em 34 carcinomas mamários primários ao longo de três direções: comparação de amostras tumorais, correlação de dados moleculares com características prognósticas histoclínicas convencionais e correlações gênicas. Não foi encontrada correlação com a idade dos pacientes, tamanho do tumor, tipo histológico e grau. No entanto, a expressão de genes foi diferencial em tumor com metástase de nódulos linfáticos e de acordo com o estatuto de receptor de estrogénio; a expressão do *ERBB2* foi fortemente correlacionada com o estado dos linfonodos (*p* <0,0001) e com o *GATA3* com a presença de receptores de estrogênio (*p* <0,001). Assim, os resultados identificaram novas formas de agrupar tumores de acordo com o resultado e novos alvos potenciais de carcinogênese. O estudo mostrou que o uso sistemático de testes de matriz de cDNA é muito promissor para melhorar a classificação do câncer de mama em termos de prognóstico e quimiossensibilidade e além de fornecer novos alvos terapêuticos potenciais.

 Huang et al. (2003) analisaram os dados de *microarrays* de DNA de amostras de tumores mamários primários, utilizando-se análises estatísticas não-lineares para avaliar múltiplos padrões de interação de grupos de genes com valor preditivo para o paciente individual, com metástase linfonodal e recorrência de câncer . A avaliação de padrões complexos e multivariados em dados de expressão de genes de espécimes de biópsia de tumor primário e o exame do valor de tais padrões na predição de metástase e recidiva de linfonodos resultaram em uma precisão preditiva de cerca de 90%. A análise forneceu uma compreensão adicional dos resultados individuais e confirmou o uso de padrões de expressão gênica como fatores prognósticos no câncer de mama. O estudo afirma ainda que a análise de grupo de risco de linfonodos define padrões mutagênicos que podem prever com precisão os casos de alto risco versus baixo risco, tanto em estudos de validação interna quanto externa.

 Contudo, em estudos em não foi possível desenvolver assinaturas moleculares preditivas de metástases linfonodais (Van’t et al., 2002; Weigelt et al., 2005; Lu et al., 2008).

 Um estudo recente detectou a expressão diferencial para os genes *DKK1, IGJ, SCGB1D2, SERPINA1, TFF1, TFF3 e TMSB15A* quando compararam tumores primários obtidos de pacientes linfonodo negativo com tumores primários linfonodo positivo. No entanto, neste estudo não foi possível realizar a estratificação dessas pacientes por meio da avaliação do *status* do linfonodo do tumor primário (Shriver et al., 2014).

 No presente estudo, a análise da expressão dos genes *SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1*, genes previamente identificados por Shriver *et al*. (2014), foi realizada para a validação de seu potencial preditivo em tumores de pacientes brasileiras com câncer de mama com e sem metástases axilares de linfonodos. Para o nosso conhecimento, Shriver et al. (2014) avaliou o potencial preditivo destes genes em câncer de mama, onde a maioria dos trabalhos em literatura avaliam somente o potencial prognóstico desses genes.

 Os resultados obtidos do presente estudo demonstraram que os genes analisados (*SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1*) nãoapresentaram expressão diferencial significativa na Análise 1 (tumores primários linfonodo positivo *versus* tumores primários linfonodo negativo), sugerindo que os mesmos não podem ser considerados marcadores preditivos em pacientes brasileiras acometidas com câncer de mama. Os resultados da Análise 2 (tumores primários e linfonodos correspondentes) obtidos do presente estudo demonstraram que de todos os seis genes avaliados (*SERPINA1, TFF3, TFF1, ARD1A, NGX6* e *DKK1*), apenas o gene *TFF1* apresentou expressão diferencial significativa.

 O gene *TFF1* é um gene constitutivo e fortemente expresso no tecido do trato gastrointestinal, onde desempenha um importante papel na diferenciação das glândulas gástricas e também na proteção a camada mucosa gástrica (Buache et al., 2011; Markicevic et al., 2014). Além disso, este gene também apresenta expressão diferenciada em tumores, como pulmão, ovário, mama, intestino e outros (Buache et al., 2011; Markicevic et al., 2014). Até o momento, a função de *TFF1* durante processos malignos não está claramente definida, como a transformação de células epiteliais pode levar a regulação negativa da expressão *TFF1* no tumor gástrico ou para a indução da expressão de *TFF1* nos demais órgãos (Buache et al., 2011; Markicevic et al., 2014). No câncer de mama é observado que este gene possui expressão elevada, sugerindo que o *TFF1* se trata de um oncogene, e que este gene ativa as vias envolvidas na sobrevivência e invasão celular, angiogenese e além de ser um importante marcador de micro metástases (Perry et al., 2007; Buache et al., 2011). No entanto, contrariamente a este ponto de vista, a literatura sugere um papel benéfico do gene *TFF1* no carcinoma mamário humano. O *TFF1* é um gene de resposta ao estrógeno, onde há uma relação entre este genee o receptor de estrógeno em pacientes que foram tratadas com Tamoxifeno (Perry et al., 2007; Buache et al., 2011; Markicevic et al., 2014), e é expresso em 50% dos tumores primários ER+, onde pacientes ER+ / *TFF1+* classificam pacientes em um grupo de melhor prognóstico do que paciente ER+ / *TFF1-* (Buache et al., 2011; Markicevic et al., 2014).

 Somente uma fração de células são fenotipicamente e biologicamente heterogêneas localizadas em certas regiões do tumor primário apresentam maior potencial metastático (Yokota, 2000; Ellsworth, 2001). Isso explica as mudanças na expressão de genes específicos supostamente com potencial preditivo tal como o gene *TFF1* que não pode ser detectado no linfonodo: as alterações moleculares destas células raras podem ser mascaradas pela maioria das células do tumor primário ou células normais envolvidas no tecido que não têm uma capacidade metastática elevada. Outro fator que pode explicar a não detecção da expressão diferencial desse gene entre os tumores primários e os linfonodos correspondentes é que só poderia ser detectado se os tumores da maioria desses pacientes já estivessem no processo metastático (Michaelson et al.; 2003). Embora se encontrasse expressão elevada no gene *TFF1* não se pode deduzir que ele é um marcador molecular preditivo. Sugere-se que outros genes que não foram avaliados estão envolvidos para o acometimento de linfonodo.

 A maioria dos estudos, o status dos genes avaliados, é determinada apenas no tumor primário e, para nosso conhecimento, poucos estudos têm sido publicados na literatura sobre a avaliação da expressão gênica, tanto por *microarray* quanto por RT-qPCR, que comparam os tumores de mama primários e os seus linfonodos correspondentes (Feng et al, 2007; Suzuki et al, 2007; Vlschi et al., 2008). Um estudo recente avaliou amostras de tumor primário provenientes de pacientes com câncer de mama ductal invasivo linfonodo positivo, e encontraram uma expressão similar do Ki-67 tanto nos tumores primários, bem como nos respectivos linfonodos, mostrando que o marcador de proliferação celular Ki-67 é um preditor de metástase de linfonodos nestes tumores por expressão Ki-67 semelhante fundada tanto em tumores primários como em seus linfonodos (Aziz *et al*., 2016).

1. **Conclusão**

 Embora todos os genes avaliados neste estudo sejam previamente caracterizados como marcadores preditivos em pacientes com câncer de mama, no presente estudo não há evidência de potencial preditivo. Apenas o gene *TFF1* mostrou expressão diferenciada quando comparado tumor primário e seu correspondente linfonodo, mas não se pode dizer que ele é um gene preditivo por não haver diferença estatistica na comparaçao do tumor primário linfonodo positivo com o tumor primário linfonodo negativo. Talvez a grande heterogeneidade genética existente na população brasileira possa ser um dos fatores que influenciam na análise do potencial preditivo dos genes envolvidos na carcinogênese mamária. Para esclarecer os papéis, serão necessários mais estudos com um grande número de casos para confirmar esses resultados e para discriminar efetivamente os pacientes com e sem a propensão para desenvolver metástases em linfonodos, poupando assim as mulheres de baixo risco das morbidades associadas à avaliação cirúrgica e reduzindo a taxa de falsos negativos associada ao BLNS (Biópsia do linfonodo sentinela).

1. **Referencias**

Abba, M.C. et al. Breast cancer molecular signatures as determined by SAGE: correlation with lymph node status. **Mol Cancer Res**. 5(9)881-90, 2007.

Aziz, S. et al. Evaluation of Tumor Cell Proliferation by Ki-67 Expression and Mitotic Count in Lymph Node Metastases from Breast Cancer, **Plos One**, *open* access, 2016.

Buache, E. et al.Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. **Oncogene- Nature**.30: 3261–3273, 2011.

Canevari, R.A. et al. Identification of novel biomarkers associated with poor patient outcomes in invasive breast carcinoma. **Tumor Biology**. 37(10)13855-13870, 2016.

Cheng, G. Kurita S; Torigian, D.A.; Alavi. Current status of sentinel lymphnode biopsy in patients with breast cancer. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. 38930562-75, 2011.

Choi, J.et al. Hornerin Is Involved in Breast Cancer Progression. **Journal of Breast Cancer**. 19(2)142-147,2016.

Ellsworth, R.E.et al. A gene expression signature that defines breast cancer metastases. **Clin Exp Metastasis** 26: 205-213, 2009.

Ellsworth, R.E. Differencial Gene Expression in Primary Breast Tumors Associated with Lymph Node Metastasis. **Int J Breast Cancer**; 2011:142763, 2011.

INCA (2016). Incidence of Cancer in Brazil. National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva. breast cancer. Available at [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/mama/cancer\_mama].

Falato, C. et al. Ki67 measured in metastatic tissue and prognosis in patients with advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. 147(2)407-414, 2014.

Falck, A.K. et al. Does analysis of biomarkers in tumor cells in lymph node metastases give additional prognostic information in primary breast cancer? **World Journal of Surgery**. 34(7)1434-41, 2010.

Falck, A.K. et al. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases—aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial, **BMC Cancer**. 13: 558, 2013.

Feng, Y.et al. Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 103(3)319-29, 2007.

GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization. Available at [http://globocan.iarc.fr/Default.aspx], 2012.

Huang, E. et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. **The Lancet**. 361(9369):1590-6, 2003.

Jorns, J.; Sabel, M.S.; Pang, J.C. Lobular Neoplasia: Morphology and Management. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. 138(10)1344-1349, 2014.

Kurosumi, M; Takei, H. Significance and problems of histopathological examination and utility of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of sentinel lymph node metastasis in breast cancer**. Breast Cancer**. 14(4)342-9, 2007.

Lu, X. et al. Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. **Breast Cancer Res Treat** 108(2)191-201, 2008.

Markicevic, M. et al. Trefoil Factor 1 in Early Breast Carcinoma: A Potential Indicator of Clinical Outcome during the First 3 Years of Follow-Up. **International Journal of Medical Sciences**. 11(7)663-73, 2014.

McNeill, R.E.; Miller, N.; Kerin, M.J. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real‑time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC Molecular Biology** 8:107, 2007.

Michaelson, J.S. et al. The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. **Cancer.** 98(10)2133-43, 2003.

Moebus, V. et al. (Intense dose-dense sequential chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and cyclophosphamide compared with conventionally scheduled chemotherapy in high-risk primary breast cancer: mature results of an AGO phase III study. **Journal of Clinical Oncology**. 28(17)2874-80, 2010.

Nguyen, D.X.; Massague, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nat Rev Gene** 8(5)341-52, 2007.

Paula, L.M. et al. Analysis of molecular markers as factors predictive of the involvement on lymph nodes in breast carcinomas. **Oncology Letters**. *Impress*, 2015.

Perry, J.K. et al. Are trefoil factors oncogenic? **Trends Endocrinology Metabolism – Cell Press**. 19(2)74-81, 2007.

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. **Nucleic Acids Res**. 29(9)45, 2001.

Salama, I. et al. A review of the S100 proteins in cancer. **European Journal of Surgical Oncology**. 34(4)357-64, 2008.

Shriver, C.D.; Hueman, M.T.; Ellsworth, R.E. Molecular signatures of lymph node status by intrinsic subtype: gene expression analysis of primary breast tumor from patients with and without metastatic lymph nodes. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 33(1)116, 2014.

Suzuki, M.; Tarin, D. Gene expression profiling of human lymph node metastases and matched primary breast carcinomas: Clinical implications. **Mol Oncol** 1(2)172-180, 2007.

Tawfik, K. et al. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant, **Human Pathology – Elsevier**. 44(1)39–46, 2013.

Van’t, V.L.J. et al. Gene Expression profiling preditcs clinical outcome of breast cancer. **Nature** 415(6871)530-6, 2002.

Vecchi, M. et al. Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors. **Oncogene** 27(15)2148-58, 2008.

Weigelt, B. et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. **Cancer Res** 65(20)9155-8, 2005.

Yenidunya, S; Bayrak, R.; Haltas. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma. **Diagnostic Pathology**. 2011;6:18, 2011.

Yokota, J. Tumor progression and mutations. **Carcinogenesis.** 21(3)497-503, 2000.