

A combinação de mamaglobina A e *TWIST-1* aumenta a detecção de células tumorais circulantes no câncer de mama

The combination of mammaglobin A and TWIST-1 increases detection of circulating tumor cells in breast cancer

Georgina Gallucci¹; Estefanía Massa¹; Carlos C. Funes²; Roberto Tozzini²; Sergio Ghersevich¹

1. Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé, Argentina. 2. Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Santa Fé, Argentina.

RESUMO

Objetivos: As células cancerígenas da mama liberadas na corrente sanguínea são chamadas de células tumorais circulantes (CTCs). As CTCs podem expressar diferentes genes, como *TWIST-1* e mamaglobina A (*MGA*). Os objetivos deste estudo foram analisar a expressão de *TWIST-1* e *MGA* no sangue de pacientes com câncer de mama (CM) para detectar CTCs e avaliar a associação entre a presença de CTCs e os parâmetros prognósticos do CM. **Métodos:** Estudo prospectivo. O ácido ribonucleico (RNA) das células mononucleadas no sangue foi obtido de pacientes com CM ($n = 36$, idade: $51,5 \pm 12,5$ anos) e doadoras saudáveis ($n = 14$; idade: $49,4 \pm 9,4$ anos). Reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) foi realizada para analisar a expressão de *TWIST-1* e *MGA*. **Resultados:** Carcinoma ductal (86,7%), outros tipos (13,3%). A expressão do gene *MGA* não foi detectada nas amostras das doadoras, mas foi observada em 14% das amostras das pacientes. Superexpressão de *TWIST-1* foi observada em 17% das amostras dos indivíduos com CM. A análise combinada de ambos os marcadores permitiu a detecção de CTCs em 27,8% das amostras, resultando num aumento significativo ($p < 0,05$) na sensibilidade da detecção. Associações significativas ($p > 0,05$) entre a expressão dos genes e os fatores prognósticos não foram encontradas. **Conclusão:** A análise combinada de *TWIST-1* e *MGA* aumentou a sensibilidade da detecção de CTCs em comparação com a análise de cada gene. A detecção de CTCs não foi associada a fatores prognósticos conhecidos, sugerindo que ela pode fornecer informações clínicas adicionais aos parâmetros clinicopatológicos de rotina do CM.

Unitermos: células tumorais circulantes; câncer de mama; mamaglobina A; *TWIST-1*; prognóstico.

ABSTRACT

Objectives: Breast cancer cells that are released into the bloodstream are called circulating tumor cells (CTCs). CTCs can express different genes, like *TWIST-1* and mammaglobin A (*MGA*). The aims of this study were to analyze the expression of *TWIST-1* and *MGA* in the blood of breast cancer patients to detect CTCs and to assess the association between the presence of CTCs and prognostic parameters of breast cancer. **Methods:** Prospective study. Total ribonucleic acid (RNA) from blood mononucleated cells was obtained from breast cancer patients ($n = 36$; age: 51.5 ± 12.5 years) and healthy donors ($n = 14$; age: 49.4 ± 9.4 years). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to analyze the expression of *TWIST-1* and *MGA*. **Results:** Patient carcinomas: ductal (86.7%), other types (13.3%). *MGA* gene expression was not detected in the donors' samples, while it was detected in 14% of the patient samples. Overexpression of *TWIST-1* gene was observed in 17% of the patient samples. The combined analysis of both markers allowed the detection of CTCs in 27.8% of the samples, resulting in a significant ($p < 0.05$) sensitivity increase of detection. No significant associations ($p > 0.05$) were found between expression of the analyzed genes and the breast cancer prognostic factors. **Conclusion:** Combined analysis of *TWIST-1* and *MGA* increased the sensitivity of CTCs detection compared to the single analysis of each gene. The detection of CTCs was not associated with known prognostic factors, suggesting that it is able to provide clinical information in addition to routine breast cancer clinicopathological parameters.

Key words: neoplastic cells circulating; breast neoplasms; mammaglobin A; *TWIST-1*; prognosis.

RESUMEN

Objetivos: Las células de cáncer de mama liberadas al torrente sanguíneo se llaman células tumorales circulantes (CTCs). Las CTCs pueden expresar diferentes genes, como TWIST-1 y mamaglobina A (MGA). Los objetivos de este estudio fueron analizar la expresión de TWIST-1 y MGA en la sangre de pacientes con cáncer de mama (CM) para detectar CTCs y evaluar la asociación entre la presencia de CTCs y los parámetros pronósticos del CM. **Métodos:** Estudio prospectivo. Se obtuvo el ácido ribonucleico (ARN) de las células mononucleadas en la sangre de pacientes con CM ($n = 36$, edad: $51,5 \pm 12,5$ años) y donantes sanas ($n = 14$; edad: $49,4 \pm 9,4$ años). Se realizó reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para analizar la expresión de TWIST-1 y MGA. **Resultados:** Carcinoma ductal (86,7%), otros tipos (13,3%). No se detectó la expresión del gen MGA en las muestras de las donantes, pero en el 14% de las muestras de las pacientes. Se observó elevada expresión de TWIST-1 en el 17% de las muestras de pacientes con CM. El análisis combinado de ambos marcadores permitió detección de CTCs en el 27,8% de las muestras, resultando en un aumento significativo ($p < 0,05$) en la sensibilidad de detección. No se encontraron asociaciones significativas ($p > 0,05$) entre la expresión de los genes y los factores pronósticos. **Conclusión:** El análisis combinado de TWIST-1 y MGA aumentó la sensibilidad de detección de CTCs en comparación con el análisis de cada gen. La detección de CTCs no se asoció a factores pronósticos conocidos, sugiriendo que podría ofrecer informaciones clínicas adicionales a los parámetros clínico-patológicos de rutina del CM.

Palabras clave: células tumorales circulantes; cáncer de mama; mamaglobina A; TWIST-1; pronóstico.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer feminino mais frequentemente diagnosticado, com 450 mil mortes anuais no mundo todo⁽¹⁾. A metástase é a principal causa de morte associada a esse tipo de câncer⁽²⁾. O processo de metástase requer uma sequência complexa de eventos biológicos, coletivamente chamados cascata de invasão e metástase. Uma das etapas iniciais desse processo é o intravasamento de células tumorais primárias em vasos sanguíneos, onde elas recebem o nome de células tumorais circulantes (CTCs) e geralmente não são detectadas por métodos diagnósticos comuns⁽³⁾. As CTCs desempenham um papel necessário na cascata metastática, na disseminação do tumor e na progressão da doença. Isso se explica pelo fato de essas células conseguirem experimentar mecanismos como a transição epitélio-mesenquimal (TEM)⁽⁴⁾. Durante o curso da TEM, as células epiteliais perdem a adesão célula-célula e a polaridade apical-basal, reorganizam seu citoesqueleto, sofrem mudanças em programas de sinalização e reprogramam sua expressão gênica, aumentando a motilidade celular e permitindo o desenvolvimento de um fenótipo invasivo⁽⁵⁾. Além disso, as CTCs são capazes de colonizar seu tumor original, acelerando o crescimento do tumor, a angiogênese e o recrutamento de células estromais⁽⁶⁾. Essa ação, conhecida como autossmeadura, pode contribuir para a recorrência do câncer após a remoção cirúrgica do tumor⁽⁷⁾.

A maior parte dos métodos diagnósticos de câncer baseia-se no exame histológico de tecido tumoral. Entretanto, técnicas que permitem a detecção de células tumorais com habilidade metastática são menos utilizadas⁽⁸⁾. Como a metástase é causada

pela disseminação de células tumorais pela corrente sanguínea, uma das abordagens para evitar o câncer metastático seria monitorar as CTCs para avaliar a resposta a diferentes terapias, o que suscita a necessidade de biomarcadores confiáveis para essas células⁽⁹⁾. Por outro lado, análises de CTCs, ácido desoxirribonucleico (DNA) tumoral circulante e exossomos derivados de tumores pela avaliação de amostras sanguíneas, que têm sido chamadas “biópsias líquidas”, poderiam permitir a caracterização molecular dos tumores usando procedimentos minimamente invasivos⁽¹⁰⁾. Tem-se dito que a detecção de CTCs tem potencial para ser usada em uma avaliação precoce do risco de recorrência e fornecer uma estratificação de risco de metástase, contribuindo para decisões terapêuticas subsequentes, ou até auxiliando em terapias adicionais – convencionais ou direcionadas –, voltadas a erradicar essas células antes do desenvolvimento da metástase^(11, 12). Portanto, estudos em andamento estão voltados para a busca de biomarcadores a fim de identificar essas CTCs na corrente sanguínea^(13, 14).

Nos últimos anos, muitas técnicas têm se desenvolvido para detectar CTCs de sangue periférico em pacientes com tumores epiteliais sólidos. Entretanto, a detecção molecular de CTCs permanece um desafio, exigindo métodos analíticos extremamente sensíveis e específicos, que em geral são uma combinação de enriquecimento de células tumorais e procedimentos de detecção. Diferentes estratégias têm sido concebidas para detectar CTCs com base em identificação de proteínas ou mRNAs, que são expressos em células tumorais⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Técnicas de detecção embasadas em análise de ácido nucleico, tais como ensaios quantitativos de transcrição reversa seguida de

reação de cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), são altamente sensíveis e consistem em análise de expressão gênica diferencial entre células tumorais e células sanguíneas normais⁽¹⁸⁾. Já que as CTCs nem sempre expressam todos os genes associados a tumores, uma análise simultânea de mais de um gene poderia melhorar a detecção dessas células⁽¹⁹⁾.

A expressão de mamaglobina A (*MGA*) restringe-se principalmente ao tecido mamário e aumenta na maior parte dos tumores de mama^(20,21). Desse modo, considerando que a expressão de *MGA* é altamente específica para o tecido mamário, ela tem sido usada para detectar CTCs epiteliais de origem mamária⁽²²⁻²⁴⁾.

O gene *TWIST-1* codifica um fator de transcrição envolvido no processo TEM das células tumorais e da metástase⁽²⁵⁾. Consequentemente, o estudo da expressão de *TWIST-1* foi proposto para avaliar CTCs com características mesenquimais, que possuiria altos níveis de expressão do gene⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi detectar CTCs em amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, avaliando a expressão dos genes *TWIST-1* e *MGA*. Além disso, foram realizados estudos de associação entre a expressão dos genes analisados e parâmetros prognósticos de câncer de mama.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinque, conforme aprovado pelo conselho de ética da Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (Res. 1068/2014). Obtiveram-se consentimentos escritos de todas as pacientes e doadoras.

Substâncias químicas e reagentes

Salvo indicação em contrário, todas as substâncias químicas e os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Inc. ou da Merck SAIC, e eram da maior pureza disponível.

Pacientes e doadoras

Cinco mililitros de sangue foram obtidos por punção venosa de pacientes ou de doadoras saudáveis e coletados em tubos com heparina.

As pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama (excluindo aquelas com histórico familiar de câncer de mama) pelo Serviço de Mastologia do Hospital Centenario, e as amostras

foram obtidas antes de qualquer intervenção cirúrgica ou tratamento antitumoral.

Células nucleadas foram isoladas pelo gradiente de densidade Ficoll 400 (Fluka, Steinheim, Alemanha). Resumidamente, as amostras de sangue foram diluídas na proporção 1:1 com NaCl a 0,9% p/v e 5 ml foram acrescentados cuidadosamente a 3 ml de solução Ficoll (densidade = 1,077 g/ml) e centrifugados por 20 min a 350 × g. Então, coletaram-se células da interfase Ficoll-sangue por aspiração, colocando-as em tubos limpos e lavando-as duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) por 10 min a 200 × g. Por fim, o RNA total foi extraído do sedimento de células.

Pequenos fragmentos de tecido mamário foram obtidos de pacientes submetidas a procedimentos de mamoplastia redutora no Hospital Centenario. O RNA total foi extraído de células sanguíneas nucleadas ou células mamárias usando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Finalmente, o sedimento de RNA foi dissolvido em água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) por pipetagem suave, e a concentração foi estimada medindo a absorbância a 260 nm em um espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

A integridade das amostras de RNA foi analisada por eletroforese em géis de agarose a 1% (Biorad, Hercules, CA, EUA), corados posteriormente com brometo de etídio, e as bandas foram visualizadas em um transiluminador (UVI complexion, Cambridge, MA, EUA). O aparecimento de duas bandas de RNA ribossômico (28S e 18S) indicou que o RNA não estava danificado. As amostras com RNA danificado foram descartadas. Em todos os casos, amostras de ácido nucleico foram armazenadas a -70°C até a análise.

Processamento de células MCF-7

Uma linhagem celular de câncer de mama, as células Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7), foi utilizada como controle de expressão positiva para *TWIST-1*, porque há notícia de que elas expressam esse gene. As células MCF-7 (generosamente fornecidas pelo Dr. Mauricio Menacho) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Gibco; Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementadas com soro fetal bovino (SFB, Natocor, Argentina) a 10%, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) a 37°C com CO₂ a 5%. Depois da cultura, as células foram coletadas através da raspagem de placas de cultura, lavadas duas vezes em PBS (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e centrifugadas por 10 min a 350 × g. O RNA total de células MCF-7 foi obtido pela utilização de Trizol, como descrito anteriormente.

Transcrição reversa (RT)

Antes de converter o RNA em DNA complementar (cDNA), amostras de RNA foram tratadas com enzima RQ1 DNase livre de RNase (Promega, Madison, EUA) para remover o DNA genômico remanescente. Resumidamente, 2 µg de RNA total foram misturados a duas unidades de RQ1 DNase livre de RNase e 2 µl do tampão da reação 10×, completando-se com água tratada com DEPC até um volume final de 10 µl. Após a incubação por 30 min a 37°C, 1 µl da DNase RQ1 stop solution foi adicionada à reação. Por último, as amostras foram aquecidas a 65°C por 15 min para inativar a DNase.

O cDNA foi sintetizado via RT de 2 µg de RNA total (tratado como descrito acima) de cada amostra usando a enzima M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em um volume final de reação de 25 µl. A mistura de reação continha tampão de enzima 5×, 0,5 mM desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), oligo-dT (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) e 200 unidades de M-MLV em água livre de nuclease. A mistura foi incubada a 42°C por 50 min.

Como controle de desempenho de RT, reações de PCR usando *primers* comerciais do gene actina-beta (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) foram realizadas com produtos de RT. A PCR consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min e uma rodada final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 2%, e o aparecimento de uma banda de 289 bp confirmou a presença do cDNA de actina-beta. Somente as amostras que expressaram actina-beta foram posteriormente consideradas para este estudo.

Detecção da expressão de *MGA*

A expressão do mRNA de *MGA* em amostras de sangue foi detectada por RT-PCR. As reações foram realizadas com cDNAs obtidos de RT e *primers* específicos relatados por Tjensvoll *et al.* (2010)⁽²⁶⁾ usando mistura de reação comercial SYBR-Green PCR (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina). Como controle negativo, o cDNA foi substituído por água livre de nuclease. O protocolo foi estabelecido como a seguir: as condições de ciclagem consistiam de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 62°C por 30 s, 72°C por 30 s e 76°C por 10 s, e as reações foram realizadas em um termociclador StepOne Real-time PCR (Applied Biosystem, EUA).

O cDNA obtido do tecido mamário normal foi usado como controle positivo para a expressão de *MGA*.

Análise de *TWIST-1* e expressões de gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH)

Para detectar a expressão de *TWIST-1*, uma PCR em tempo real foi realizada usando *primers* previamente descritos⁽²⁶⁾. Os cDNAs da RT foram misturados com *primers* específicos de *TWIST-1* usando uma mistura comercial de PCR contendo SYBR-Green (Productos Bio-Lógicos). Como controle negativo, o cDNA foi substituído por água livre de nuclease. O protocolo das condições das reações foi estabelecido como a seguir: 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 57°C por 1 min e 72°C por 30 s, e as reações foram realizadas num termociclador PCR StepOne Real-time. O cDNA obtido das células MCF-7 foi usado como controle positivo para a expressão de *TWIST-1*.

O método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi usado para medir o nível da expressão de *TWIST-1*⁽²⁹⁾. Esse método compara a expressão do gene de interesse com a expressão de um gene de referência controle, considerando ciclo limiar (Ct) o número mínimo de ciclos exigidos para o sinal de fluorescência passar a linha limite, acima da fluorescência de fundo. A expressão de GAPDH foi escolhida como o gene de referência. Em poucas palavras, a RT-PCR para GAPDH com *primers*⁽³⁰⁾ previamente descritos foi conduzida em condições similares àquelas expostas acima para amplificar *TWIST-1*.

As amostras de pacientes apresentando superexpressão de *TWIST-1* foram identificadas considerando-se como patamar o valor mais alto do intervalo de referência estimado para a expressão do gene em amostras de doadoras saudáveis. O intervalo de referência foi estabelecido como o nível de expressão médio do gene no sangue de doadoras saudáveis \pm dois desvios padrões (DP)⁽³¹⁾.

Em resumo, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mostra as diferenças em número de vezes entre a expressão de *TWIST-1* na amostra de cada paciente e a expressão em doadoras saudáveis, considerando:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{controles saudáveis}} - \Delta Ct_{\text{pacientes}}), \text{ onde } \Delta Ct_{\text{controles saudáveis}} = (Ct_{\text{TWIST-1}} - Ct_{\text{GAPDH}}), \text{ and } \Delta Ct_{\text{pacientes}} = (Ct_{\text{TWIST-1}} - Ct_{\text{GAPDH}}).$$

Características dos tumores das pacientes

Dados sobre tamanho do tumor, histologia, grau nuclear e presença de metástase de linfonodo foram obtidos de relatórios de patologia. Os tumores haviam sido diagnosticados por patologistas experientes usando critérios-padrão para histologia e classificados pelos critérios de Scarff-Bloom-Richardson⁽³²⁾. A imunocoloração para receptor do estrogênio (RE) e receptores da progesterona (RP) foi realizada em cortes fixados de tecido de tumor usando um

método de três camadas de estreptavidina-avidina-biotina com peroxidase de rábano, com um anticorpo murino primário anti-humano RE (1:100 diluição; M7047, Dako, Ely, Cambridgeshire, Reino Unido) ou um anti-RP 636 (1:100 diluição; M3569, Dako), respectivamente, e um anticorpo antimurino secundário biotilado de coelho (1:350 diluição; E354, Dako). As expressões de RE ou RP foram classificadas em positivas quando a coloração foi observada em mais de 10% do núcleo das células cancerosas. A ausência de coloração foi considerada resultado negativo⁽³³⁾.

Análise estatística

Estudos de associação entre a detecção de expressões dos genes *TWIST-1* ou *MGA* e diferentes fatores prognósticos foram conduzidos usando tabelas de contingência baseadas no teste exato de Fisher (Graph-Pad Instat, CA, EUA). A sensibilidade da detecção de CTCs foi analisada com o teste Q-Cochran. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os seguintes dados dos pacientes e características do tumor foram considerados para a análise: idade do paciente (maior ou menor que 50 anos), tamanho do tumor (≤ 2 cm *vs.* > 2 cm), grau histológico (1 ou 2 *vs.* 3), grau nuclear (1 ou 2 *vs.* 3), presença ou ausência de superexpressão de Her2-neu, presença ou ausência de RE, presença ou ausência de RP e presença ou ausência de metástase de linfonodo.

RESULTADOS

Trinta e seis pacientes com câncer de mama (média de idade: $51,5 \pm 12,5$ anos) e 14 doadoras saudáveis (média de idade: $49,4 \pm 9,4$ anos) foram recrutadas para o estudo. A **Tabela 1** oferece informações clínicas sobre as pacientes.

De acordo com a avaliação anatomopatológica, os carcinomas de mama foram classificados em ductal (86,7%), lobular (6,7%), mucinoso (3,3%) e misto (3,3%). Os carcinomas ductais correspondem à forma mais frequente de câncer observada em nosso hospital (Tabela 1).

Análise dos biomarcadores de CTCs

Nenhuma expressão de *MGA* foi detectada em amostras de doadoras saudáveis, confirmando que sua expressão está ausente do sangue periférico, restringindo-se principalmente ao tecido mamário, como verificado com o cDNA obtido do tecido mamário. A análise permitiu a detecção da expressão de *MGA* em cerca de 14% (5/36) das amostras de pacientes (**Figura 1**).

TABELA 1 – Características clínicas de tumores em pacientes com câncer de mama participantes do estudo

	n	%
Idade (anos)		
< 50	16	44,4
> 50	20	55,6
RE		
Positivo	26	78,8
Negativo	7	21,2
RP		
Positivo	27	81,8
Negativo	6	18,2
Her2-neu		
Positivo	10	30,3
Negativo	23	69,7
Tamanho do tumor		
< 2 cm	14	50
> 2 cm	14	50
Grau nuclear		
1-2	24	80
3	6	20
Grau histológico		
1-2	14	58,3
3	10	41,7
Linfonodo metastático		
Positivo	14	56
Negativo	11	44

RE: receptores de estrogênio; RP: receptores de progesterona; n e %: número e porcentagem de pacientes com uma característica determinada. Alguns dados não estavam disponíveis para todos os tumores no prontuário do paciente.

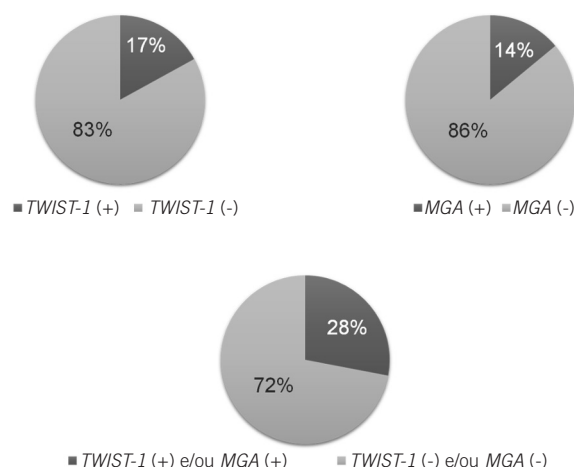


FIGURA 1 – Gráficos circulares mostrando porcentagens de pacientes com CTCs detectadas por análises da expressão de TWIST-1, MGA e a combinação da expressão de ambos os genes

CTCs: células tumorais circulantes.

A análise da associação entre os resultados da expressão de *MGA* e os fatores prognósticos para câncer de mama não revelou associações significativas ($p > 0,05$, **Tabela 2**).

TABELA 2 – Análise da associação (teste exato de Fisher) entre a expressão de *MGA* e *TWIST-1* no sangue periférico e parâmetros clinicopatológicos para câncer de mama

	<i>MGA</i> (+)	<i>MGA</i> (-)	<i>p</i>	<i>TWIST-1</i> (+)	<i>TWIST-1</i> (-)	<i>p</i>	<i>MGA</i> e/ou <i>TWIST-1</i> (+)	<i>MGA</i> (-) e <i>TWIST-1</i> (-)	<i>p</i>
Idade das pacientes (anos)									
< 50	2	14	1	4	12	0,37	6	16	1
> 50	3	17		2	18		4	10	
RE									
Positivo	2	25	0,18	5	21	1	6	21	0,35
Negativo	2	5		1	6		3	4	
RP									
Positivo	2	26	0,13	5	22	1	6	22	0,3
Negativo	2	4		1	5		3	3	
Her2-neu									
Positivo	1	9	1	1	9	0,64	3	7	1
Negativo	3	21		5	18		6	18	
Tamanho do tumor									
< 2 cm	4	12	0,33	3	11	1	6	9	0,21
> 2 cm	1	13		3	11		2	12	
Grau nuclear									
1-2	2	22	0,17	5	19	0,55	6	18	0,64
3	2	4		0	6		2	4	
Grau histológico									
1-2	3	11	0,61	5	11	0,34	6	8	0,23
3	1	9		1	9		2	8	
Linfonodo metastático									
Positivo	4	11	0,34	3	13	0,64	3	9	0,69
Negativo	1	11		3	7		5	10	

MGA (+): número de pacientes nas quais a expressão de MGA foi detectada; MGA (-): número de pacientes nas quais não se detectou expressão de MGA; TWIST-1 (+): pacientes nas quais expressão aumentada do gene TWIST-1 foi detectada; TWIST-1 (-): pacientes nas quais a expressão de TWIST-1 estava dentro dos valores da população controle. Alguns dados não estavam disponíveis nos prontuários de todas as pacientes; MGA e/ou TWIST-1 (+): amostras de pacientes que foram positivas ou para MGA ou para TWIST-1; MGA: mamaglobina A; RP: receptores de progesterona; RE: receptores de estrogênio; p < 0,05 foi considerado significativo; nenhuma associação significativa foi encontrada (p > 0,05).

A superexpressão de *TWIST-1* em amostras de pacientes foi relatada quando a expressão do gene foi mais elevada que a expressão máxima estimada no sangue das doadoras saudáveis. Os resultados indicaram que cerca de 17% das amostras das pacientes exibiram expressão de *TWIST-1* mais alta que a observada em doadoras saudáveis, sugerindo a presença de CTCs (Figura 1). Além disso, estudos de associação entre a superexpressão de *TWIST-1* e fatores prognósticos também não indicaram resultados significativos (Tabela 2).

Curiosamente, as três pacientes que apresentaram os níveis mais altos da expressão de *TWIST-1* foram posteriormente diagnosticadas com metástase a distância (Figura 2).

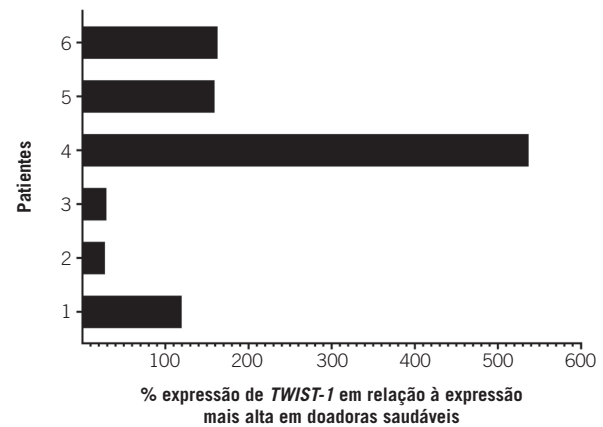


FIGURA 2 – Superexpressão do gene *TWIST-1* em seis das pacientes com câncer de mama estudadas. O gráfico mostra a porcentagem de aumento na expressão sobre o valor máximo estimado da expressão em doadoras saudáveis

Análise combinada de biomarcadores de CTCs

Considerando a detecção da expressão de pelo menos um dos genes investigados, os resultados indicaram que a combinação de ambos os marcadores genéticos permitiu a detecção de CTCs em 27,8% (10/36) das amostras de pacientes (Figura 1), o que quase dobra a sensibilidade da detecção de CTCs em relação ao uso de somente um deles, como verificado pelo teste Q de Cochran.

É importante perceber que somente uma das amostras de pacientes mostrou expressão de *MGA* junto com alta expressão de *TWIST-1*.

A análise estatística não indicou associações significativas entre a detecção dos dois genes e os parâmetros prognósticos para câncer de mama (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A principal causa de mortalidade associada ao câncer de mama é a metástase⁽³⁴⁾, mas não se consegue detectar a disseminação de células do tumor primário para órgãos distantes através da corrente sanguínea por métodos tradicionais. Desse modo, a detecção de CTCs poderia refletir a progressão da doença em tempo real. Essa informação seria particularmente útil na aplicação de terapias sistêmicas e ajudaria a guiar tratamentos específicos para determinado paciente em uma janela terapêutica definida, apoiando o conceito de medicina personalizada⁽³⁵⁾.

No presente relato, a presença de CTCs de câncer de mama foi verificada por meio da análise da expressão dos genes *MGA* e *TWIST-1*. A detecção de expressão de *MGA* é altamente específica

para tecido mamário, visto que é principalmente limitada à glândula mamária e não é comumente encontrada no sangue⁽³⁶⁾. Como esperado, a *MGA* não foi detectada em amostras de sangue de doadoras saudáveis, confirmando sua expressão restrita ao tecido mamário. Com base na expressão de *MGA* altamente específica do tecido mamário, diferentes estudos usaram a detecção desse gene como marcador para CTCs derivadas de câncer de mama⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Os resultados indicaram que a expressão de *MGA* foi detectada no sangue periférico de cerca de 14% das pacientes, revelando a presença de CTCs derivadas de tecido mamário. Os percentuais relatados de detecção de *MGA* no sangue periférico de pacientes com câncer de mama variam de 8% a 60%, de acordo com os diferentes estudos^(23, 24, 40, 41). Essa variação pode estar relacionada com diferenças na configuração experimental, tais como o tipo da amostra obtida e o método usado para verificar a expressão de *MGA*.

Alguns autores relatam que a detecção da expressão de *MGA* no sangue se associou a fatores de mau prognóstico e menores taxas de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama^(41, 42). Além do mais, em um estudo anterior em nosso laboratório, a detecção de CTCs por análise de expressão de *MGA* em pacientes de câncer de mama foi relacionada com a ausência de REs no tumor primário, o que é um fator prognóstico negativo para a doença⁽²³⁾. Entretanto, o uso de *MGA* ainda não foi implementado como ferramenta confiável para detecção de CTCs, e serão necessários mais estudos para validar seu uso clínico.

TWIST-1 pode ser expresso em algumas células imunitárias no sangue de doadores saudáveis⁽⁴³⁾. Assim, o valor mais alto do intervalo de referência estimado para a expressão do gene em amostras de doadores saudáveis (Métodos) foi considerado um patamar para identificar as amostras de pacientes com CTCs que superexpressavam *TWIST-1*. Os resultados desse estudo revelaram que 17% das pacientes com câncer de mama mostravam expressão aumentada de *TWIST-1* no sangue comparada à expressão em indivíduos saudáveis. Outros autores relataram que a expressão de *TWIST-1* foi detectada em cerca de 17%-40% de amostras de sangue analisadas de pacientes com câncer de mama^(19, 28, 44). Consegue-se explicar a diferença nos resultados relatados entre os estudos por vários aspectos, como o volume de amostras de sangue obtidas dos pacientes e o fato de que amostras podem ter sido colhidas antes ou depois do procedimento cirúrgico. Um volume maior de amostra é capaz de aumentar a possibilidade de detecção de CTCs, e a cirurgia pode resultar em semear células derivadas de tumor na corrente sanguínea.

Além disso, também é possível que a diferente população de pacientes recrutados em estudos distintos tenha contribuído para a diferença observada na detecção de CTCs^(44, 45). Por fim, o fato de a expressão de *TWIST-1* não estar completamente ausente do sangue

de indivíduos saudáveis exige que se estime um patamar normal de referência adequado da expressão desse gene, a fim de detectar a genuína superexpressão do gene.

O acompanhamento clínico das pacientes revelou que as três delas que apresentaram os maiores níveis de superexpressão de *TWIST-1* tinham metástase a distância. Isso estaria correlacionado com o papel essencial de *TWIST-1* para aumentar a habilidade do tumor em submeter-se ao processo TEM, levando a um fenótipo invasivo e à formação de metástases a distância^(4, 46). Além do mais, uma revisão sistemática recente de estudos sobre a expressão de *TWIST-1* em diferentes tipos de carcinoma apontou que a superexpressão desse gene estaria associada a pior sobrevida⁽⁴⁷⁾.

Uma vez que a detecção de *MGA* reflete a presença de CTCs expressando um fenótipo epitelial e a expressão de *TWIST-1* é associada a fenótipos mesenquimais e TEM, a análise combinada de ambos os genes permitiria a detecção de células cancerosas capazes de expressar marcadores epiteliais e/ou mesenquimais. De fato, a combinação de dois ou mais marcadores genéticos tem sido proposta a fim de aumentar a sensibilidade na detecção de CTCs^(45, 48). Os presentes resultados apoiam tal ideia, uma vez que a detecção combinada da expressão de ambos os genes investigados aumentou acentuadamente a sensibilidade na detecção de CTCs, que mostraram quase o dobro da porcentagem de detecção obtida pela análise única da expressão de *MGA* ou *TWIST-1*. Além disso, é interessante notar que *MGA* e *TWIST-1* foram simultaneamente detectados em somente uma amostra, sugerindo que ambos os marcadores genéticos foram geralmente complementares nas informações fornecidas.

Os resultados dos estudos de associação entre a detecção de CTCs por análise da expressão dos genes *MGA* e/ou *TWIST-1* e fatores prognósticos para câncer de mama não mostraram associações significativas. Considerando que a presença de CTCs está ligada à capacidade invasiva e à progressão do câncer, os resultados podem indicar que a detecção de CTCs fornece informações clínicas adicionais sobre os parâmetros clinicopatológicos de rotina para câncer de mama. Outros estudos também relataram que a detecção de CTCs não estava associada a outros fatores prognósticos em câncer de mama, sugerindo seu valor prognóstico independente^(49, 50).

A detecção da presença de CTCs é um indicador de disseminação da doença a partir de um tumor primário. Portanto, o achado de CTCs no sangue periférico reflete o risco potencial de progressão de metástase⁽⁵⁰⁾. Como vantagem, este é um procedimento minimamente invasivo e pode ser executado com frequência, monitorando em tempo real as células liberadas do tumor ou a resposta a um determinado tratamento.

A seleção de pacientes que recebem diferentes tratamentos antitumorais baseia-se principalmente no risco estatístico da recorrência do tumor. O rastreamento de CTCs pode contribuir para prever o risco de metástase do câncer e a eficácia da terapia, avaliando a resposta a um tratamento antineoplásico destinado a erradicar essas células antes que elas iniciem metástase. Desse modo, a implementação clínica da detecção de CTCs auxiliaria na melhora da seleção de tratamentos específicos para cada paciente, e, portanto, apontaria na direção de terapias mais eficientes e personalizadas. Nos últimos anos, diferentes estudos clínicos foram conduzidos para estabelecer o valor prognóstico de CTCs em estágios iniciais e avançados do câncer de mama^(50,51). Entretanto, a padronização da detecção de CTCs para uso em prática clínica ainda é um grande desafio. Futuros estudos clínicos devem ser realizados para validar métodos e a utilidade de diferentes biomarcadores de CTCs.

CONCLUSÃO

A análise da expressão dos genes *MGA* e *TWIST-1* no sangue de pacientes com câncer de mama pode ser um método adequado para a detecção de CTCs. Como os resultados indicaram que a detecção da expressão de *MGA* não foi geralmente associada com a superexpressão de *TWIST-1*, a análise combinada de ambos os genes aumentou marcadamente a sensibilidade para detecção de CTCs em pacientes com câncer de mama.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não têm nenhum conflito de interesses a declarar.

REFERÊNCIAS

1. De Santis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2015; 24(10): 1495-1506.
2. Siegel RL, Miller Jemal AJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(1): 7-30.
3. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331(6024): 1559-64.
4. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1796(2): 75-90.
5. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(3): 178-96.
6. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7(12): 693-701.
7. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massagué J. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009; 139(7): 1315-26.
8. Pagani O, Senkus E, Wood W, et al. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured? *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102(7): 456-63.
9. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013; 368(13): 1199-209.
10. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med*. 2017; 15(1): 75.
11. Shen Z, Wu A, Chen X. Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem Soc Rev*. 2017; 46(8): 2038-56.
12. Alunni-Fabbroni M, Müller V, Fehm T, Janni W, Rack B. Monitoring in metastatic breast cancer: is imaging outdated in the era of circulating tumor cells? *Breast Care*. 2014; 9(1): 16-21.
13. Yan W, Cui X, Chen Q, et al. Circulating tumor cell status monitors the treatment responses in breast cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017; 7: 43464.
14. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6(6): 339-45.
15. Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. 2014; 14(1): 57-62.
16. Barok M, Szollosi J. Steps in metastasis research: analyzing, collecting, and culturing circulating tumor cells. *Cytometry A*. 2011; 79(2): 93-4.
17. Pantel K, Alix-Panabieres C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*. 2012; 4(5): 446-7.
18. Andergassen U, Kölbl AC, Mahner S, Jeschke U. Real-time RT-PCR systems for CTC detection from blood samples of breast cancer and gynaecological tumour patients (Review). *Oncol Rep*. 2016; 35(4): 1905-15.
19. Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem*. 2011; 57(3): 421-30.

20. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Research*. 1996; 56(4): 860-5.
21. Fleming TP, Watson MA. Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 923: 78-89.
22. Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res*. 2010; 30(6): 2377-82.
23. Ceballos MP, Zumoffen C, Massa E, et al. Detection of mammaglobin A in blood from breast cancer patients, before and after treatment, using a one-tube nested PCR protocol. Association with the absence of tumor estrogen receptors. *Clin Biochem*. 2011; 44(17-18): 1429-33.
24. Ghersevich S, Ceballos MP. Mammaglobin A: review and clinical utility. Chapter 6. In: Makowski GS, editor. *Advances in clinical chemistry*. Vol. 64. USA: Elsevier; 2014. pp. 241-68.
25. Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol*. 2016; 37(1): 185-97.
26. Tjensvoll K, Oltedal S, Farmen RK, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and mammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients. *Clin Breast Cancer*. 2010; 10(5): 378-84.
27. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *BCR*. 2011; 13(3): R59.
28. Mego M, Karaba M, Minarik G, et al. Circulating tumor cells with epithelial-to-mesenchymal transition phenotypes associated with inferior outcomes in primary breast cancer. *Anticancer Res*. 2019; 39(4): 1829-37.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001; 25: 402-8.
30. Hamidinia M, Ghafourian Boroujerdnia M, Talaiezhadeh A, et al. Increased P-35, EBI3 transcripts and other T_{reg} markers in peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients with different clinical stages. *Adv Pharm Bull*. 2015; 5(2): 261-7.
31. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(t) method. *Nat Protoc*. 2008; 3(6): 1101-8.
32. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*. 1995; 26: 873-9.
33. Williams SL, Birdsong GG, Cohen C, Siddiqui M. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptor and HER2 expression in breast carcinomas: comparison of cell block and tissue block preparations. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009; 2: 476-80.
34. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
35. Pantel K, Alix-Panabières C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis*. 2012; 4(5): 446-7.
36. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, et al. Relationship between human mammaglobin mRNA expression in breast cancer tissue and clinico-pathologic features of the tumors. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006; 25(1): 65-72.
37. Bossolasco P, Ricci C, Farina G, et al. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev*. 2002; 26(1): 60-3.
38. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clin Biochem*. 2004; 37(4): 249-57.
39. Cheng M, Chen Y, Zou D, et al. The clinical utility of circulating tumor cells in breast cancer patients: detection by a quantitative assay of h-MAM gene expression. *Int J Biol Markers*. 2014; 29(3): e268-78.
40. Skondra M, Gkioka E, Kostakis ID, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients using multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction and specific primers for MGB, PTHRP and KRT19 correlation with clinicopathological features. *Anticancer Res*. 2014; 34(11): 6691-9.
41. Aristizábal-Pachón AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2015; 27(4): 217-22.
42. Lee GW, Kim JY, Koh EH, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*. 2012; 11(4): 4034-42.
43. Merindol N, Riquet A, Szablewski V, Eliaou JF, Puisieux A, Bonnefoy N. The emerging role of Twist proteins in hematopoietic cells and hematological malignancies. *Blood Cancer J*. 2014; 4(4): e206.
44. Strati A, Markou A, Parisi C, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer*. 2011; 11: 422.
45. de Albuquerque A, Kaul S, Breier G, Krabisch P, Fersis N. Multimarker analysis of circulating tumor cells in peripheral blood of metastatic breast cancer patients: a step forward in personalized medicine. *Breast Care (Basel)*. 2012; 7(1): 7-12.
46. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008; 14(6): 818-29.

47. Wushou A, Hou J, Zhao YJ, Shao ZM. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 21621-30.
48. Ellsworth RE, Blackburn HL, Shriver CD, Soon-Shiong P, Ellsworth DL. Molecular heterogeneity in breast cancer: state of the science and implications for patient care. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 64.
49. Zhou L, Dicker DT, Matthew E, El-Deiry WS, Alpaugh RK. Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. *F1000Res.* 2017; pii: F1000 Faculty Rev-1445.
50. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 5701-10.
51. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007; 253(2): 180-204.

AUTOR CORRESPONDENTE

Sergio Ghersevich  0000-0001-8361-0899
e-mail: sghersevich@yahoo.com.ar



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.