



ARTIGO ORIGINAL

## O papel da expressão de CSE1L na metástase em linfonodos cervicais de tumores laríngeos<sup>☆</sup>

Tuncay Tunccan <sup>id a</sup>, Sertac Duzer <sup>id b,\*</sup>, Gulay Dilek <sup>id c</sup>, Ulvi Murat Yuksel <sup>id d</sup>, Hasan Cetiner <sup>id b</sup>, Caner Kılıc <sup>id a</sup>, Ayca Ant <sup>id a</sup> e Arzu Betul Duran <sup>id a</sup>



<sup>a</sup> Oncology Training and Research Hospital, Department of Ear Nose and Throat, Ankara, Turquia

<sup>b</sup> Elazığ Training and Research Hospital, Department of Ear Nose and Throat, Elazığ, Turquia

<sup>c</sup> Oncology Training and Research Hospital, Department of Pathology, Ankara, Turquia

<sup>d</sup> Oncology Training and Research Hospital, Department of Surgery, Ankara, Turquia

Recebido em 20 de fevereiro de 2019; aceito em 20 de junho de 2019

Disponível na Internet em 25 de dezembro de 2020

### PALAVRAS-CHAVE

Câncer glótico T3-T4;  
CSE1L;  
Linfonodo;  
Metástase

### Resumo

**Introdução:** De acordo com relatos internacionais, 30% a 40% de todos os casos de câncer de cabeça e pescoço são na laringe, compreendem 1% a 2,5% de todos os tipos de câncer. O envolvimento linfonodal cervical foi relatado em 40% e 65% nos casos T3 e T4, respectivamente. A sobrevida em cinco anos em pacientes com metástase linfonodal cervical demonstrou ser 50% menor em comparação com os pacientes sem metástase. A proteína *chromosome segregation like 1* é um fragmento de DNA isolado por Brinkmann et al. em 1995 que corresponde à proteína de segregação cromossômica de levedura. Estudos sobre o efeito da expressão da proteína *chromosome segregation like 1* em tumores de cabeça e pescoço são raros e os poucos estudos demonstram que a proteína *chromosome segregation like 1* nuclear é superexpressa no núcleo, enquanto tumores gastrointestinais e de mama superexpressam a proteína *chromosome segregation like 1* citoplasmática.

**Objetivo:** A proteína *chromosome segregation like 1* pode regular a proliferação e metástase do câncer glótico de laringe T3-T4. O objetivo deste estudo é mostrar a relação entre a expressão da proteína *chromosome segregation like 1* em metástase de linfonodo cervical no câncer glótico de laringe T3-T4.

**Método:** Foram incluídos neste estudo 57 pacientes do sexo masculino submetidos a cirurgias por câncer glótico T3-T4 em um hospital terciário. Havia 28 pacientes com metástase de linfonodos cervicais e 29 pacientes sem metástase linfonodal. A análise imunohistoquímica foi realizada em tecido de tumor glótico de laringe embebido em parafina e fixado em formol. De acordo com a porcentagem de células imunorreativas, analisou-se a expressão da proteína *chromosome segregation like 1*.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.06.010>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Tunccan T, Duzer S, Dilek G, Yuksel UM, Cetiner H, Kılıc C, et al. The role of CSE1L expression in cervical lymph node metastasis of larynx tumors. Braz J Otorhinolaryngol. 2021;87:42–6.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [duzersertac@yahoo.com](mailto:duzersertac@yahoo.com) (S. Duzer).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

**Resultados:** Entre os pacientes, que não tinham metástase linfonodal cervical, 15 apresentaram coloração nuclear fraca, 12 apresentaram coloração nuclear moderada e apenas 2 apresentaram coloração nuclear elevada para proteína *chromosome segregation like 1*. Entre os pacientes que apresentavam metástase linfonodal cervical, 18 pacientes apresentaram coloração nuclear elevada, 9 apresentaram coloração moderada e apenas um paciente apresentou coloração fraca. Nenhum dos pacientes com metástase apresentou coloração citoplasmática e apenas um paciente no grupo não-metastático mostrou coloração citoplasmática para a proteína *chromosome segregation like 1*. Houve uma correlação positiva entre a expressão nuclear da proteína *chromosome segregation like 1* e a metástase de linfonodo cervical ( $r=0,668$ ), que foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** A expressão da proteína *chromosome segregation like 1* está correlacionada com metástases linfonodais em casos de câncer glótico T3-T4 e isso pode mudar a abordagem do tratamento cervical de câncer glótico no futuro.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

De acordo com relatos internacionais, 30% a 40% de todos os casos de câncer de cabeça e pescoço são de câncer laríngeo, compreendem 1% a 2,5% de todos os tipos de câncer.<sup>1</sup> O exame histopatológico é compatível com carcinoma espinocelular em 95% a 98% desses casos. A doença é mais prevalente no sexo masculino e sua incidência aumenta na quinta e sétima décadas.<sup>2</sup> Ocorre mais frequentemente na região glótica, seguida da região supraglótica e região subglótica, respectivamente. Segundo a literatura, a taxa de presença clínica de metástase cervical é de 51% e a taxa de metástase nodal cervical aumenta com o avanço dos estágios do tumor primário. Acredita-se que a taxa de metástase nodal cervical seja em torno de 40% e 65% nos casos de tumores T3 e T4, respectivamente.<sup>3</sup> A invasão do espaço paraglótico (EPG) e da epiglote aumenta a taxa de metástase nodal cervical e a mobilidade das pregas vocais comprometida ou fixa é fator de risco para a invasão do EPG e metástase de linfonodo cervical.<sup>4</sup> Nos últimos anos, com os avanços da biologia molecular, apareceram diferentes agentes, que estão em uso clínico e experimental, para a determinação de metástases linfonodais. A proteína *chromosome segregation like 1* (CSE1L) é um deles.

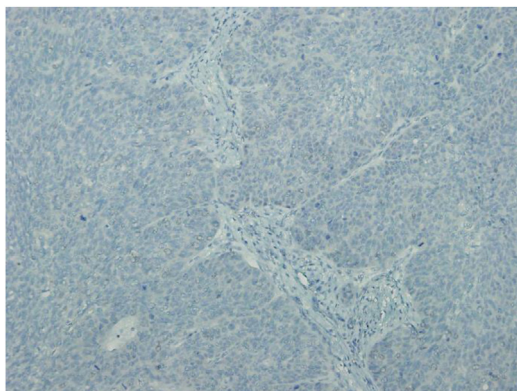
A proteína CSE1L é um fragmento de DNA isolado por Brinkmann et al. em 1995 que corresponde à proteína de segregação cromossômica de levedura. Existem duas formas de CSE1L, a CSE1L citoplasmática e a nuclear.<sup>5</sup> Ela é altamente expressa em tecidos com alto índice mitótico, como células tumorais humanas, fígado e testículos de feto. Apoptose e sobrevivência celular, montagem cromossômica e transporte nucleocitoplasmático são funções conhecidas de CSE1L. Ela também desempenha um papel na regulação do gene supressor tumoral P53 e aumenta a invasão do tumor, aumenta a secreção da metaloproteinase-2 da matriz (MMP-2) no tecido tumoral. Por essa razão, em alguns tipos de câncer, acredita-se que a CSE1L esteja relacionada com a progressão do câncer e da metástase.<sup>6</sup> Estudos sobre o

efeito da expressão de CSE1L em tumores de cabeça e pescoço são raros e foi demonstrado que a CSE1L nuclear é superexpressa nesses estudos, nos quais tumores gastrointestinais e de mama demonstram superexpressão de CSE1L citoplasmática.<sup>7</sup> Nosso objetivo foi descobrir se existe uma correlação entre a expressão de CSE1L e metástase linfonodal regional em tumores de laringe em estágio avançado.

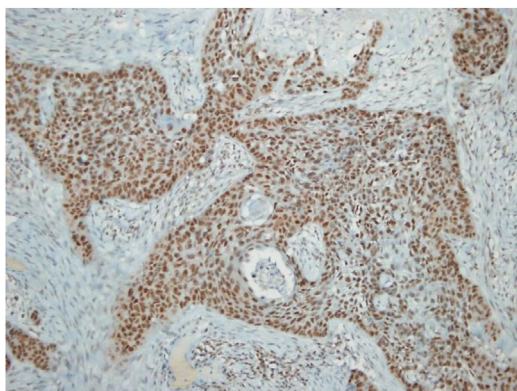
## Método

Pacientes operados por câncer glótico T3 e T4 entre janeiro de 2008 e julho de 2016 no Departamento de Otorrinolaringologia do *Ankara Oncology Training and Research Hospital* de Ankara foram avaliados. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional (Projeto nº 2017-6/97), Ancara, Turquia. Foram incluídos no presente estudo 57 pacientes do sexo masculino. Eles foram submetidos a laringectomia total ou parcial supracricóidea. O esvaziamento cervical bilateral de nível II, III e IV foi aplicado em todos os pacientes. Os pacientes foram estadiados de acordo com a 8ª edição do *American Joint Cancer Committee* (AJCC). A extensão paraglótica foi invadida em todos os pacientes com tumor T3. Os pacientes com invasão da região pré-epiglótica foram excluídos. Idade, estágio T, grau dos pacientes, status do linfonodo cervical e tipo de cirurgia foram registrados.

A imuno-histoquímica foi feita em amostras embebidas em parafina e fixadas em formol, obtidas do banco de tecidos. A coloração para a proteína CSE1L foi feita em lâminas de 5 µm (micrômetros) com o anticorpo policlonal de coelho GeneTex CSE1L (1: 100) e um kit de detecção Ventana Ultraview DAB em um processador Ventana BenchMark XT (Ventana, Tucson, AZ). A recuperação antigênica foi feita por meio de um processo automatizado padrão no Ventana BenchMark XT a 37 °C por 16 minutos. Os sítios de atividade da peroxidase foram visualizados com diaminobenzidina (tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina) como substrato e contrastados com hematoxilina de Mayer.



**Figura 1** Carcinoma espinocelular não metastático; coloração para CSE1L negativa.



**Figura 2** Carcinoma espinocelular metastático; coloração nuclear para CSE1L positiva.

### Sistema de escore imuno-histoquímico

Um sistema de escore semiquantitativo foi usado para analisar a coloração imuno-histoquímica; a porcentagem de células imunorreativas foi combinada com a intensidade de coloração estimada. De acordo com esses dois parâmetros combinados, o tumor recebeu um escore em termos de coloração nuclear ou citoplasmática. O escore de intensidade de coloração variou de 1 a 3; o escore 1 reflete coloração fraca, o 2 coloração moderada e o 3 coloração forte. Em seguida, o cálculo foi feito para determinar o escore no total possível de intensidade 300 como se segue:  $(1 \times \text{porcentagem de células tumorais com coloração fraca}) + (2 \times \text{porcentagem de células tumorais com coloração moderada}) + (3 \times \text{porcentagem de células tumorais com coloração forte})$ . Finalmente, os resultados da coloração foram categorizados em subgrupos de CSE1L baixa (coloração CSE1L1+), CSE1L moderada (coloração CSE1L 2+) e CSE1L elevada (coloração CSE1L 3+). As imagens imuno-histoquímicas representativas da coloração nuclear de CSE1L são mostradas nas [figuras 1 e 2](#).

### Análises estatísticas

Foram feitas com o programa SPSS versão 21. As variáveis foram investigadas por meio de métodos visuais (histograma, gráficos de propensão) e analíticos (testes de

Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk) para determinar se são normais ou não. Ao investigar as associações entre as variáveis não normalmente distribuídas e as ordinais, os coeficientes de correlação e sua significância foram calculados com o teste de Spearman. Um nível de erro do tipo 1 de 5% foi usado para inferir significância estatística.

### Resultados

O carcinoma espinocelular que se origina da região glótica foi diagnosticado em 57 pacientes do sexo masculino incluídos no estudo e a idade média foi de 59,3 anos. Vinte e sete dos pacientes apresentavam tumor T3 e o restante T4. O comprometimento dos linfonodos cervicais estava presente em 28 (49%) pacientes e a mediana do número de linfonodos metastáticos foi de 2,6 (variação de 1-8). O tumor apresentava baixo grau (Grau 1) em 25 pacientes e grau médio (Grau 2) em 28; no entanto, o grau era desconhecido em 4 pacientes. Nenhum dos pacientes apresentou tumor de alto grau (Grau 3). Nos pacientes que não tinham metástase em linfonodos cervicais, 15 apresentaram coloração nuclear fraca, 12 coloração nuclear moderada e apenas 2 elevada coloração nuclear para CSE1L. Entre os pacientes que apresentavam metástase em linfonodos cervicais, 18 pacientes apresentaram coloração nuclear elevada, 9 apresentaram coloração moderada e apenas um paciente apresentou coloração fraca para CSE1L. Nenhum dos pacientes com metástase mostrou coloração citoplasmática e apenas um paciente no grupo não metastático mostrou coloração citoplasmática para CSE1L. Houve uma correlação positiva entre a expressão nuclear de CSE1L e metástase de linfonodos cervicais ( $r = 0,668$ ), que foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). O número de linfonodos cervicais metastáticos não se correlacionou com a intensidade de coloração de CSE1L. Além disso, a correlação entre a coloração de CSE1L e outros parâmetros (tamanho do tumor, grau e extensão do esvaziamento cervical) também foi investigada ([tabela 1](#)); entretanto, não houve significância estatística.

### Discussão

Metástases em linfonodos cervicais são causa de baixa sobrevida no câncer de laringe, como em todos os tumores de cabeça e pescoço. As taxas de sobrevida em cinco anos diminuem para 30% nesses casos. As taxas de metástase de linfonodos cervicais variam de 15% a 65% na literatura.<sup>8</sup> Em tumores de laringe e hipofaringe em estágio avançado, as taxas de metástase de linfonodos cervicais estão relacionadas à invasão de diferentes sítios anatômicos. Por exemplo, a taxa de metástase de linfonodos cervicais é quase 100% se o seio piriforme for invadido e 70% se o tumor invadir a espessura total da cartilagem tireóidea, é de cerca de 40% a 50% no caso de invasão de outros sítios anatômicos. Em nosso estudo, a taxa de metástase de linfonodos cervicais no caso de invasão da região paraglótica em pacientes em estágio avançado foi compatível com a literatura.

O gene CSE1L está localizado no cromossomo 20q13 e regula múltiplos mecanismos celulares, inclusive o *checkpoint* do fuso mitótico, basicamente proliferação e apoptose, que são dois processos opostos.<sup>9</sup> A CSE1L é sintetizada em

**Tabela 1** Parâmetros investigados e suas correlações com CSE1L

	Estágio T (n = 57) (Coef) p	Grau (n = 53) (Coef) p	Metástases (n = 57) (Coef) p	Tipo de esvaziamento cervical (n = 57) (Coef) p
Expressão de CSE1L	(-0,091) 0,502	(0,062) 0,661	(0,668) <0,001	(-0,136) 0,312

Correlação é significativa,  $p < 0,001$  (bicaudal).

resposta ao estresse celular e, em células não neoplásicas, geralmente está localizada no núcleo. A CSE1L também tem um papel no rearranjo nucleocitoplasmático da importina- $\alpha$ ,<sup>10</sup> na proliferação celular associada aos microtúbulos, na migração e invasão de células cancerígenas<sup>7</sup> e na regulação de genes supressores. Além disso, a baixa expressão de CSE1L resulta na inibição da metástase de células tumorais em modelos animais; por exemplo, ela inibiu a metástase de células de melanoma B-16 e F10 em camundongos.<sup>11</sup> Há alguns estudos recentes que apoiam a eficácia de CSE1L na proliferação do câncer, também.<sup>12</sup>

A expressão de CSE1L é necessária para a divisão celular e sequência verdadeira dos cromossomos responsáveis pela estabilidade genômica. Por essa razão, a expressão anormal de CSE1L pode afetar a estabilidade genômica, favorece o desenvolvimento do câncer. Em nosso estudo, tentamos descobrir a relação entre a expressão de CSE1L e metástase dos linfonodos cervicais em tumores da laringe. Existem estudos limitados sobre a expressão de CSE1L em tumores de cabeça e pescoço e são estudos experimentais *in vitro*, nos quais a progressão e a invasão tumoral foram avaliadas com múltiplos genes.<sup>13</sup> O presente estudo é o primeiro estudo *in vivo* sobre o tema que pode ser considerado como um estudo dirigido à conscientização em relação a tumores de cabeça e pescoço.

CSE1L afeta o comportamento do tumor, ao alterar a função de vários genes. No estudo de Cheng et. al.,<sup>14</sup> CSE1L aumentou a expressão de MutS Homolog 6 (MSH6) em pacientes com osteossarcoma e é considerado um fator prognóstico ruim, por causar progressão do câncer. Por outro lado, Liao et al.<sup>15</sup> mostraram que a superexpressão de CSE1L não aumentou a proliferação do câncer, mas sim a redução de metástase. Li et.al.<sup>16</sup> revelaram que o MicroRNA-137 (miR-137) é o gene alvo de CSE1L no câncer de ovário e desempenha um papel na supressão tumoral relacionada ao miR-137. Lorenzato et al.<sup>17</sup> descobriram que a CSE1L regula a expressão de RASSF1C e inibe a apoptose em células de câncer de ovário. Jiang K et. al.<sup>18</sup> mostraram a importância da expressão citoplasmática de CSE1L na transformação maligna do esôfago de Barrett.

Em relação aos cânceres de cabeça e pescoço em um dos raros estudos sobre o tema, Kim et. al.<sup>12</sup> alegaram que a CSE1L era um parâmetro prognóstico ineficaz em pacientes com câncer de nasofaringe. Entretanto, Fang et. al.<sup>13</sup> observaram que a CSE1L desempenha um papel na apoptose, invasão e metástase do câncer de nasofaringe. De acordo com Soldini et. al.<sup>19</sup> CSE1L é um parâmetro útil para distinguir linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B; no entanto, o tratamento pode ser planejado em formas intermediárias de acordo com o nível de expressão de CSE1L.

Consideramos que seria adequado pesquisar o valor clínico de CSE1L em cânceres de laringe glótica T3-T4 e investigar sua correlação com metástase de linfonodos

cervicais. Cânceres da região glótica metastatizam para linfonodos cervicais regionais com mais frequência do que outros tumores da laringe. Além disso, cânceres da região glótica são mais comuns do que outros tumores da laringe. Por esse motivo, preferimos investigar a expressão de CSE1L em câncer glótico. Estudamos ambas as expressões nuclear e citoplasmática de CSE1L por imuno-histoquímica no tumor primário e tentamos descobrir qualquer correlação entre essa proteína e características clínico-patológicas, como classificação T, grau, extensão do esvaziamento cervical (unilateral e bilateral), bem como metástase de linfonodos cervicais. Este estudo demonstrou que a CSE1L nuclear está correlacionada com metástase dos linfonodos cervicais ( $p < 0,001$ ), mas não se correlacionou com o grau, o tamanho do tumor e a extensão do esvaziamento cervical. Yuksel et al.<sup>20</sup> encontraram uma associação entre a superexpressão citoplasmática de CSE1L e a metástase em linfonodos axilares no câncer de mama; entretanto, não encontraram associação entre a CSE1L nuclear e a metástase em linfonodos axilares. Houve apenas um paciente no grupo não metastático que apresentou coloração citoplasmática de CSE1L em nosso estudo. Essa diferença pode ser explicada pelo tipo diferente, além do que o local do tumor pode ser responsável por esse resultado.

Exceto para tumores T3 selecionados, esvaziamento cervical unilateral ou bilateral de nível I/IV é a parte do tratamento-padrão para ambos os tumores T3 e T4 nos dias atuais. O esvaziamento cervical pode apresentar algumas complicações, como sangramento, hematoma, epidermólise e várias lesões nervosas iatrogênicas. Em alguns casos, o esvaziamento cervical pode ser uma cirurgia desnecessária, que também prolonga a duração da cirurgia e das internações hospitalares. Se futuros estudos prospectivos randomizados controlados apoiarem os achados deste estudo, os cirurgiões podem evitar o esvaziamento cervical em pacientes selecionados.

## Conclusão

A superexpressão de CSE1L está correlacionada com metástases de linfonodos cervicais em câncer glótico T3-T4 e isso pode mudar a abordagem do tratamento cervical do câncer de laringe.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Bray F, Ferlay J, Parkin DM, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer*. 2001;94:153–6.

2. Markou KD, Vlachtsis KC, Nikolaou AC, Petridis DG, Kouloulas AI, Daniilidis IC. Incidence and predisposing factors of pharyngocutaneous fistula formation after total laryngectomy. Is there a relationship with tumor recurrence? *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261:61–7.
3. Tarkan O, Ozdemir S, Soylu L. Management of the neck in cancer of the larynx. *T Clin J E.N.T.* 2011;4:50–61.
4. Joo YH, Park JO, Cho KJ, Kim MS. Relationship between paraglottic space invasion and cervical lymphnode metastasis in patients undergoing supracricoid partial laryngectomy. *Head Neck.* 2012;34:1119–22.
5. Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Pastan I. Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:1027–31.
6. Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C. hCAS/CSE1L associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes. *Cell.* 2007;130:638–50.
7. Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, et al. Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26:593–601.
8. Dursun G, Keser R, Aktürk T, Akiner MN, Demireller A, Sak SD. The significance of pre-epiglottic space invasion in supraglottic laryngeal carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997;254:110–2.
9. Stella Tsai CS, Chen HC, Tung JN, Tsou SS, Tsao TY, Liao CF, et al. Serum cellular apoptosis susceptibility protein is a potential prognostic marker for metastatic colorectal cancer. *Am J Pathol.* 2010;176:1619–28.
10. Chalifa-Caspi V, Yanai I, Ophir R, Rosen N, Shmoish M, Benjamin-Rodrig H, et al. GeneAnnot: comprehensive two-way linking between oligonucleotide array probesets and GeneCards genes. *Bioinformatics.* 2004;9:1457–8.
11. Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N, Wellmann A. Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. *Anticancer Res.* 2001;21:2413–7.
12. Kim YJ, Go H, Wu HG, Jeon YK, Park SW, Lee SH. Immunohistochemical study identifying prognostic biomolecular markers in nasopharyngeal carcinoma treated by radiotherapy. *Head Neck.* 2011;33:1458–66.
13. Fang WY, Liu TF, Xie WB, Yang XY, Wang S, Ren CP, et al. Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2005;37:541–6.
14. Cheng DD, Lin HC, Li SJ, Yao M, Yang QC, Fan CY. CSE1L interaction with MSH6 promotes osteosarcoma progression and predicts poor patient survival. *Sci Rep.* 2017;7:46238.
15. Liao CF, Luo SF, Li LT, Lin CY, Chen YC, Jiang MC. CSE1L/CAS, the cellular apoptosis susceptibility protein, enhances invasion and metastasis but not proliferation of cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:15.
16. Li KK, Yang L, Pang JC, Chan AK, Zhou L, Mao Y, et al. MIR-137 suppresses growth and invasion, is downregulated in oligodendroglial tumors and targets CSE1L. *Brain Pathol.* 2013;23:426–39.
17. Lorenzato A, Martino C, Dani N, Oligschläger Y, Ferrero AM, Biglia N, et al. The cellular apoptosis susceptibility CAS/CSE1L gene protects ovarian cancer cells from death by suppressing RASSF1C. *FASEB J.* 2012;26:2446–56.
18. Jiang K, Neill K, Cowden D, Klapman J, Eschrich S, Pimiento J, et al. Expression of CAS/CSE1L, the Cellular Apoptosis Susceptibility Protein, Correlates With Neoplastic Progression in Barrett’s Esophagus. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26:552–6.
19. Soldini D, Montagna C, Schüffler P, Martin V, Georgis A, Thiesler T, et al. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome. *Ann Oncol.* 2013;24:193–201.
20. Yuksel UM, Dilek G, Dogan L, Gulcelik MA, Berberoglu U. The relationship between CSE1L expression and axillary lymph node metastasis in breast cancer. *Tumor.* 2015;101:194–8.