



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CHRISTIANO MORAIS DE SOUSA

**Estudo epidemiológico da incidência dos subtipos moleculares do
câncer de mama no hospital da Fundação Assistencial da Paraíba –
FAP, em Campina Grande, Paraíba**

CAMPINA GRANDE – PB
2014

CHRISTIANO MORAIS DE SOUSA

**Estudo epidemiológico da incidência dos subtipos moleculares do
câncer de mama no hospital da Fundação Assistencial da Paraíba –
FAP, em Campina Grande, Paraíba**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação **em Ciências Biológicas** da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller.

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S725e Sousa, Christiano Morais de.
Estudo epidemiológico da incidência dos subtipos moleculares do câncer de mama no hospital da fundação assistencial da Paraíba – Fap, em Campina Grande, Paraíba [manuscrito] / Christiano Morais de Sousa. - 2014.
27 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Mathias Weller, Departamento de Biologia".

1. Câncer de mama. 2. Marcadores moleculares. 3. Receptores hormonais. 4. Subtipos moleculares. I. Título.

21. ed. CDD 616.994 49

CHRISTIANO MORAIS DE SOUSA

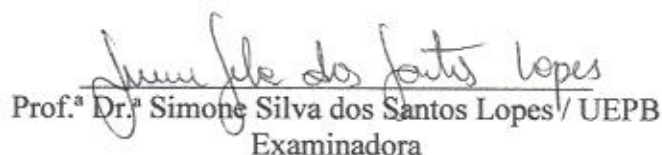
**Estudo epidemiológico da incidência dos subtipos moleculares do
câncer de mama no hospital da Fundação Assistencial da Paraíba –
FAP, em Campina Grande, Paraíba**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em **Ciências Biológicas** da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas.

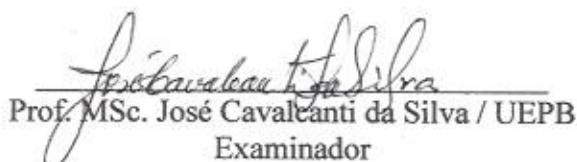
Aprovado em 04/08/2014.



Prof. Dr. Mathias Weller/ UEPB
Orientador



Prof.ª Dr.ª Simone Silva dos Santos Lopes/ UEPB
Examinadora



Prof. MSc. José Cavalcanti da Silva / UEPB
Examinador

AGRADECIMENTOS

A Deus, “Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente” (Rom. 11.36). "O único Soberano que me deu vida e me sustenta. “A Ele, Sejam agradáveis as palavras da minha boca e a meditação do meu coração” (Sal. 19.14)

A Laíza Ohana, Minha amada noiva, que tem me acompanhado em cada passo, sendo a motivação de todo meu esforço e trabalho. Uma pessoa tão única e importante na minha vida, que apenas o caminhar ao seu lado pra sempre me dará a possibilidade de mostrar o quanto a amo.

A Meus Pais, que me proporcionaram chegar até aqui me conduzindo desde os primeiros passos e as primeiras palavras, sendo meus primeiros e principais professores me iniciando na vida.

A todos os meus amigos, que ao longo de toda minha vida foram presentes em momentos diversos, fazendo a minha vida não ser solitária.

A turma 2009.2 do curso de Ciências Biológicas; um grupo necessário, que mesmo na singularidade de cada indivíduo, foi fundamental para um aprendizado contínuo durante esse período de graduação.

A todos os meus professores que me conduziram até esse momento, especialmente meu orientador Mathias Weller, que muito acrescentou em minha vida acadêmica.

A Universidade Estadual da Paraíba e ao CNPq, instituições que foram preponderantes ao meu conhecimento e a este trabalho.

Estudo epidemiológico da incidência dos subtipos moleculares do câncer de mama no hospital da Fundação Assistencial da Paraíba – FAP, em Campina Grande, Paraíba

SOUSA, Christiano Morais¹

Introdução: Para ajudar a refinar a classificação do câncer de mama (CM), marcadores moleculares têm sido usados nos últimos anos. Os principais marcadores são os receptores hormonais: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e o receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). **Objetivo:** O presente trabalho objetivou fazer uma pesquisa epidemiológica de incidência dos subtipos moleculares de CM invasivo nos pacientes da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), verificando a relação dos subtipos moleculares com os parâmetros clínicos dos tumores e perfil do paciente, para que se possa caracterizar o perfil da incidência dos subtipos de CM em Campina Grande, Paraíba, Brasil. **Materiais e métodos:** Dados de 202 pacientes com diagnóstico confirmado de CM invasivo, dos anos de 2005, 2006, 2007 e 2010, respectivamente, foram usados para classificação molecular. Os prontuários foram obtidos diretamente do arquivo médico do Hospital. Os seguintes dados foram coletados: Idade do paciente quando diagnosticado, Tamanho do Tumor, Grau Histológico, status dos Nodos Linfáticos e Porcentagem das células tumorais positivas para Ki-67. Os Relatórios patológicos foram utilizados para definir os subtipos moleculares dos 202 prontuários de acordo com a seguinte combinação de marcadores: Luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2-), Luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2+), Superexpressão HER2 (RE-, RP- e HER2+) e triplo negativo (TN) (RE-, RP-, HER2-). Os dados foram tabelados com o software Microsoft Excel 2010 e analisados estatisticamente com o software GraphPad Prism Versão 6 (La Jolla, CA). O Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher foi aplicado para comparar as variáveis categóricas de idade e as características do tumor. Para as variáveis contínuas, Teste T de Student e Análise de Variância (one-way ANOVA). **Resultados:** 42,08 %, 28,71%, 13,86% e 15,35 % foram classificados como Luminal A, Luminal B, HER2+ e TN, respectivamente. O número de mulheres que realizaram testes de Imunohistoquímica aumentou de 26,09% para 51,61% e a média de idade dos pacientes diagnosticados diminuiu de 58,34 anos em 2005 para 54,20 anos em 2010. Não houve diferença significativa do grau histológico e status dos linfonodos afetados e a diferença de tamanho do tumor foi pouco significativa ($p = 0,0401$). **Discussão e conclusão:** A faixa etária acima de 60 anos teve a maioria dos casos de CM, com elevada frequência de tumores do subtipo TN (45,16%). Essa alta incidência do TN na faixa etária mais elevada foi uma característica epidemiológica encontrada pelo presente estudo que diverge de toda literatura disponível até o momento, pois em nenhuma outra região se registrou tão alta incidência desse subtipo molecular relacionada a idosos. Esse dado deve ser usado como base para futuras ações preventivas nas populações de idosos no Nordeste Brasileiro.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama. Subtipos moleculares. Paraíba

¹ Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB. E-mail: christianobiologo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Câncer de mama (CM) é o tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres, e o segundo mais incidente em todo o mundo (BENSON e JATOI, 2012; CORRÊA *et al*, 2010). Mesmo mantendo-se estável em alguns países na última década, a incidência do CM se mantém crescente no mundo (AMARO *et al*, 2013; BENSON e JATOI, 2012; AUTIER *et al*, 2010; VIEIRA *et al*, 2008). Em alguns países já houve a redução na mortalidade, resultado da detecção precoce através de exames de mamografia e avanços de tratamento terapêutico (JEMAL *et al*, 2011). Os países desenvolvidos ainda estão com as maiores taxas de incidência, mas existe um deslocamento gradativo dessa incidência para os países em desenvolvimento quando se considera o histórico global da doença (BENSON e JATOI, 2012; FERLAY *et al*, 2010).

Para o Brasil, em 2014, são esperados 57,120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CM é a neoplasia mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (21,29/ 100 mil) (INCA, 2104). Em 2012, a Paraíba apresentou a segunda maior taxa de mortalidade (FREITAS-JUNIOR *et al*, 2013).

A intensificação do registro dos casos da doença e o aumento da expectativa de vida podem explicar, pelo menos parcialmente, o aumento da incidência do câncer de mama no Nordeste do Brasil; no entanto, menor alcance da população ao exame da mamografia na região Nordeste em comparação com as outras regiões e mudança de hábitos, também podem contribuir para o aumento da mortalidade (SILVA e HORTALE, 2012; INCA, 2012; VIACAVA *et al*, 2009). Além disso, diferenças socioeconômicas, número de filhos, idade da menarca, primeira paridade, tempo de aleitamento materno, obesidade e consumo de álcool influenciam no risco de câncer de mama (NAGATSUMA *et al*, 2013; BANDEIRA-LAGES 2012 *et al*; MCPHEARSON *et al*, 2000).

O grupo étnico também influencia na incidência da doença, pois populações caucasianas são mais susceptíveis ao câncer de mama do que populações afrodescendentes, entretanto, as populações afrodescendentes são mais afetadas pelo subtipo triplo negativo (TN), forma mais agressiva da doença, pois esse tipo de CM impossibilita o tratamento com terapia hormonal e tem alto índice proliferativo com histórico de pior prognóstico e sobrevida (BATINA *et al*, 2013; DESANTIS *et al*, 2013; SMIGAL *et al*, 2006).

O diagnóstico e classificação do tumor feita de maneira precisa e mais rápida possível é de fundamental importância para que se tenha bons prognósticos e acertadas aplicações terapêuticas (VIEIRA *et al*, 2008). Desenvolvido por Pierre Denoix (França), entre os anos de 1943 e 1952, o Sistema de classificação de tumores malignos TNM, ainda hoje tem um grande valor diagnóstico e preditivo para o CM, sendo usado como o método anatomopatológico para diagnosticar o estágio em que se encontra o tumor (INCA, 2012).

A sigla TMN refere-se aos parâmetros clínicos usados nessa classificação: Tamanho do tumor primário (T), ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais (N), e ausência ou presença de metástase à distância (M). Mas, apesar de seu valor, o sistema de classificação TNM é limitado no diagnóstico preciso quanto a origem e biologia do tumor, pois até o final da década de 90, pacientes que tinham o diagnóstico de carcinoma de mama eram tratados como sendo pessoas com doenças semelhantes, como se o CM fosse uma doença única (VIEIRA *et al*, 2008). Essa classificação histopatológica não possibilitava explicar por que os casos com o mesmo diagnóstico e estágio podiam ter desfechos clínicos completamente diferentes (VIEIRA *et al*, 2008).

Para ajudar a refinar a classificação do CM e avaliar o prognóstico e resposta à terapia, técnicas moleculares têm sido usadas nos últimos anos. Técnicas com tecnologias aplicadas nos estudos de DNA, RNA e do perfil das proteínas das células tumorais, podem ser usadas para retratar um fenótipo detalhado do tumor (SØRLIE *et al*, 2003). A análise dos padrões de expressão gênica de milhares de genes usando cDNA *microarrays* tem demonstrado a grande diversidade entre os tumores que têm aparente semelhança histopatológica (PEROU *et al*, 2000).

Descrita pela primeira vez em 1998, a técnica do *tissue microarray* (TMA) permitiu revelar os perfis de expressão proteica em um grande número de amostras teciduais agrupadas, validando os achados do cDNA *microarray* nos carcinomas de mama. Essa técnica possibilitou validar novos marcadores tumorais, correlacionando os resultados com a aplicação terapêutica (VIEIRA *et al*, 2008). A principal utilização do TMA é em pesquisas que necessitam analisar tecidos com técnicas *in situ*, como a Imunohistoquímica (IHQ) (VIEIRA *et al*, 2008).

Tradicionalmente, a IHQ é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão proteica em anatomia patológica. Essa técnica detecta proteínas específicas em um corte histológico através de uma reação antígeno-anticorpo que resulta na marcação dessas proteínas pesquisadas com um cromógeno. Dessa forma, a IHQ é usada para a detecção de marcadores tumorais, de modo a identificar certos tipos histológicos e, quando possível,

direcionar o tratamento (RABENHOSRT, 2010). As técnicas moleculares têm um maior potencial de previsão e prognóstico do que os fatores preditivos clínicos clássicos, pois essas técnicas conseguem revelar a heterogeneidade dos tumores mamários apresentando um quadro de diferentes doenças (SØRLIE *et al*, 2003).

Os principais marcadores moleculares avaliados por exame de IHQ para definição dos subtipos de neoplasias mamárias são os receptores hormonais: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e o receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) (BERTOS e PARK, 2011; VOLPI, 2000). Além desses clássicos marcadores, O Ki-67 pode ser usado para estratificar pacientes como de melhor prognóstico ou grupos de pior prognóstico, pois é uma proteína nuclear que não é expressa nas células em repouso (G0), mas pode ser detectada na fase G1 e M do ciclo celular (BUITRAGO, UEMURA e SENA, 2011). É um marcador de proliferação que mostra o percentual de células positivas para a proteína em questão, identificando dessa forma, se o tumor tem alto índice de proliferação (BUITRAGO, UEMURA e SENA, 2011).

Utilizando os receptores hormonais como marcadores moleculares é possível classificar os tumores mamários em subtipos como se segue na tabela:

Tabela 1 - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama

<i>Subtipos Moleculares</i>	<i>Marcadores classificatórios</i>
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+
Superexpressão de HER2 (HER2+)	RE-, RP- e HER2+
Triplo-negativo (TN)	RE-, RP-, HER2-

Fonte: Ciqueira, et al 2011, **Subtipos moleculares do Câncer de mama**.

Os subtipos luminais receberam essa nomenclatura pelas semelhanças que as células neoplásicas apresentam com as células mamárias normais que ficam no lúmen dos ductos mamários em contato direto (SOTIRIOU *et al*, 2003). O subtipo **Luminal A** geralmente apresenta-se incidente em 60% dos casos registrados e com baixo grau histológico (CIQUEIRA, 2011). Esse subtipo tem bom prognóstico, pois está associado a maior sobrevida livre da doença e superior sobrevivência global, se comparado com o Luminal B, HER2+ e TN (BUITRAGO, UEMURA e SENA, 2011).

O subtipo **Luminal B** apresenta elevado índice de proliferação (CHEANG *et al*, 2009). Por causa desse elevado índice de proliferação, Tratando-se dos tumores luminais (A e

B), o Luminal B tem o pior prognóstico (SØRLIE *et al*, 2003). Comparado ao Luminal A, mostra-se consideravelmente associado a maior recorrência e menor sobrevida livre da doença em todas as categorias do tratamento (KENNECKE *et al*, 2010).

O subtipo **superexpressão HER2** é assim chamado por causa de sua negatividade para receptores hormonais e sua elevada expressão da oncoproteína HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) (CIANFROCCA e GOLDSTEIN, 2004). Esse subgrupo mostra-se tendo o pior prognóstico se comparado com os subtipos Luminais A e B (SØRLIE *et al*, 2001). A superexpressão de HER2 torna os tumores mais agressivos porque codifica uma proteína de membrana das células tumorais que fazem com que estas se desenvolvam mais rápido e aumentem a sua duplicação (BUITRAGO, UEMURA e SENA, 2011). A presença do HER2 está associado a maior risco de recidiva tumoral e desempenha um papel fundamental na transformação oncológica (CIQUEIRA *et al*, 2011).

O subtipo **Triplo Negativo** é caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, por isso é chamado por alguns autores de basalóide; esses tumores são associados a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global se comparado aos subtipos Luminais A, B e HER2+ (CIQUEIRA *et al*, 2011). Caracteriza-se morfológicamente por alto grau histológico, elevado índice mitótico, presença de áreas de necrose central e destacado infiltrado linfocitário (CHEANG *et al*, 2008). Pacientes com esse subtipo não se beneficiam com o tratamento hormonal ou imunoterapia, pois apresentam negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a expressão de HER2 (IRVIN JR e CAREY, 2008).

Tendo em vista, portanto, a grande heterogeneidade do câncer de mama, não sendo mais considerado como uma doença única (BERTOS *et al*, 2011; CIQUEIRA *et al*, 2011; VIERA *et al*, 2008), se faz imprescindível o pleno conhecimento tanto de suas características classificatórias moleculares, como também seu comportamento de incidência quando se compara os subtipos moleculares com os parâmetros clínicos clássicos, pra que se possa tomar acertadas decisões terapêuticas.

Os estudos epidemiológicos são de suma importância para o planejamento das ações em saúde e tomadas de decisões mais assertivas. Para a luta contra qualquer doença, principalmente no caso de doenças que são preocupantes no âmbito da saúde pública, as pesquisas epidemiológicas possibilitam o conhecimento sobre o comportamento da doença nos mais variados grupos populacionais e regiões. Além disso, a epidemiologia é importante não apenas para planejar aplicações terapêuticas, mas também para planejar ações preventivas; o que é muito importante para saúde pública (ALVES, 2008).

O Nordeste ainda é carente de estudos epidemiológicos avançados e detalhados sobre como tem se comportado esses subtipos moleculares de CM na região. Os últimos estudos mais detalhados sobre o tema ocorreram na Bahia (CORRÊA *et al*, 2010), sendo necessário uma maior contribuição com uma maior população alvo do nordeste, principalmente Paraíba, que em 2012, apresentou-se com uma das maiores taxas de mortalidade entre todos os estados do país (FREITAS-JUNIOR *et al*, 2013). O presente trabalho objetivou fazer uma pesquisa epidemiológica de incidência dos subtipos moleculares de câncer de mama invasivo, verificando a relação dos subtipos moleculares com os parâmetros clínicos dos tumores e perfil do paciente, para que se possa caracterizar o perfil da incidência dos subtipos de CM na Paraíba.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado dentro do projeto: Melhoramento da terapia de câncer de mama pela análise diagnóstica de marcadores moleculares, que foi submetido ao comitê de ética recebendo o protocolo de aprovação: CEP-UEPB: 0239.0.133.000-12.

2.1 População de Estudo

Dados de 202 pacientes com diagnóstico confirmado de câncer de mama invasivos, dos anos de 2005, 2006, 2007 e 2010, respectivamente, que tinham exames de IHQ anexados aos prontuários foram usados para classificação molecular. Os anos de 2008 e 2009 foram excluídos por falta prontuários e para verificação da diferença da incidência ao decorrer do tempo, o ano de 2006 foi excluído pelo mesmo motivo, entrando apenas na verificação geral da incidência. Os prontuários foram obtidos diretamente do arquivo médico do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Campina Grande está localizada no interior, a cerca de 120 km de distância da capital do estado, João Pessoa, com uma população de cerca de 385,276 (2010) habitantes. O hospital da FAP recebe pacientes tanto de regiões rurais próximas, como também de 300 km de distância, em média. Os Pacientes deste hospital, são geralmente de baixa ou média renda, em sua maioria sem plano privado de saúde.

2.2 Coleta de dados e variáveis do estudo

Os relatórios patológicos extraídos dos prontuários e usados na presente pesquisa, formam o histórico do tratamento do paciente, realizado no hospital. Esses dados foram coletados ativamente em visitas ao arquivo de prontuários do hospital. Os exames imunohistoquímicos encontrados nos relatórios, foram feitos por patologistas treinados de laboratórios privados, que realizaram a classificação dos tumores usando ensaios de IHQ das amostras tumorais de cada paciente. Os seguintes dados foram coletados desses prontuários para a caracterização do perfil de incidência dos subtipos: Idade do paciente quando diagnosticado, Tamanho do Tumor, Grau Histológico, *status* dos Nodos Linfáticos e Porcentagem das células tumorais positivas para Ki-67. Houve dificuldade na coleta de dados, pois os prontuários apresentaram ausência de informações de forma variada, e como a maioria

dos prontuários eram escritos à mão (autógrafos médicos) a compreensão exigiu muitas vezes ajuda de profissionais do hospital.

2.3 Análise dos dados

Os tumores foram classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores de mama e classificados com o grau histológico seguindo o Sistema de Classificação de Nottingham (SCN) descrito por Elston e Ellis em 1991 (BUITRAGO, UEMURA e SENA, 2011; IARC, 2003; ELSTON e ELLIS, 1991). O tamanho do tumor foi classificado de acordo com a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), da seguinte forma: Classificação T: T1: $\leq 2,0$ centímetros; T2: $> 2,0$ centímetros $\leq 5,0$ centímetros; T3: $> 5,0$ centímetros. Devido à falta de dados sobre a extensão do tumor à parede torácica e formação de edema, a categoria tumor T4 foi excluída. A combinação de marcadores de IHQ utilizada para definir os subtipos moleculares de câncer da mama são como se segue: Luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2-), Luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2+), superexpressão HER2 (RE-, RP- e HER2+) e triplo negativo (RE-, RP-, HER2-).

2.4 Análise estatística

Os dados foram colhidos dos prontuários e tabelados em uma planilha usando o software Microsoft Excel 2010. Depois de tabelados, foi feita a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism Versão 6 (La Jolla, CA). O Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher foi aplicado para comparar as variáveis categóricas de idade e as características do tumor. Para as variáveis contínuas, Teste T de Student e Análise de Variância (*one-way* ANOVA).

3. RESULTADOS

O número de mulheres que realizaram testes de IHQ aumentou de 26,09% em 2005 para 51,61% em 2010 ($p = 0,0007$) e a média de idade dos pacientes com diagnóstico de câncer de mama invasivo diminuiu de 58,34 anos em 2005 para 54,20 anos em 2010 ($p = 0,0295$). Não houve diferença significativa do grau histológico e *status* dos linfonodos afetados, nos anos de 2005, 2007 e 2010, e a diferença de tamanho do tumor foi pouco significativa ($p = 0,0401$) (**Tabela 2**).

Dos 202 pacientes que foram submetidos a testes de IHQ, 85 (42,08 %), 58 (28,71%), 28 (13,86%) e 31 (15,35 %) foram classificados como Luminal A, Luminal B, HER2+ e triplo negativo (TN), respectivamente. Os resultados estão resumidos na **Tabela 3**. A idade média dos pacientes não diferiram significativamente entre os subtipos moleculares, mas houve diferenças significativas entre os grupos etários ($p = 0,0180$): 45% de todos os pacientes triplo negativos estavam com idade entre 30 e 40 anos, enquanto que nessa mesma faixa etária, pacientes Luminal A foram 7,06%, Luminal B 12,07% e HER2+ 7,14%. No subtipo Luminal B, 41,38% dos pacientes estavam na faixa etária entre 40 e 49 anos, enquanto que nessa mesma faixa etária, Luminal A contou com 23,53%, HER2+ com 25,00% e Triplo Negativo com 6,45%. A categoria 1 (T1) do tamanho do tumor variou de 23,33% para o triplo negativo, até 82,46% para os tumores Luminal B, enquanto T2 variou de 15,79% para Luminal B, e de 70,00% para os tumores triplo negativo ($p < 0,0001$). A porcentagem de tumores de alto grau (G3) variou de 6,41% para o subtipo Luminal A até 44,83% para o subtipo triplo negativo ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa de *status* dos Nodos Linfáticos entre os subtipos moleculares ($p = 0,3443$). A porcentagem de células tumorais positivas Ki-67 variou entre 19,98% ($s = 20,67$) para Luminal A, a 49,29% ($s = 29,04$) para tumores triplo negativo ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Características histopatológicas do tumor, faixas etárias e idade média dos pacientes nos anos de 2005, 2007 e 2010.

	<i>Anos</i>						<i>P- valor</i>
	2005 (N= 115)		2007 (N= 88)		2010 (N= 93)		
	No.	%	No.	%	No.	%	
Testes de IHC							
Realizado	30	26,09	31	35,23	48	51,61	0,0007
Não Rea.	85	73,91	57	64,77	45	48,39	
Idade							
≤ 30	1	0,87	2	2,27	2	2,15	0,7056
30- 39	7	6,09	9	10,23	11	11,83	
40- 49	29	25,22	17	19,32	23	24,73	
50- 59	25	21,74	22	25,00	24	25,81	
≥ 60	53	46,08	38	43,18	33	35,48	
Média	58,34* (s= 13,31)		57,51 (s= 14,43)		54,20* (s= 13,55)		*0,0295
Variação	26-88		28-84		26-86		
Tamanho do tumor (cm) (categoria T: T1: ≤ 2,0cm; T2: > 2,0cm ≤ 5,0cm; T3: > 5,0cm)							
T1	42	37,17	26	29,54	45	51,72	0,0401
T2	60	53,10	50	56,82	33	37,93	
T3	11	9,73	12	13,64	9	10,35	
Sem inf.	2		0		6		
Grau Histológico (G1: Baixo; G2: Intermediário; G3: Alto)							
G1	10	10,10	3	4,05	8	9,30	0,4423
G2	63	63,64	56	75,68	57	66,28	
G3	26	26,26	15	20,27	21	24,42	
Sem inf.	16		14		7		
Linfonodos							
Positivo	33	56,90	37	49,33	40	66,67	0,1296
Negativo	25	43,10	38	50,67	20	33,33	
Sem inf.	57		13		33		

*Diferença estatística significativa entre 2005 e 2010

Tabela 3. Características histopatológicas de tumores e distribuição etária dos pacientes, dependendo do subtipo molecular do câncer de mama.

Subtipos Moleculares (N= 202)									
	Luminal A		Luminal B		HER2+		TN		P-valor
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
	85	42,08	58	28,71	28	13,86	31	15,35	
Idade									
≤ 30	4	4,71	0	0	0	0	1	3,23	0,0180
30 – 39	6	7,06	7	12,07	2	7,14	7	22,58	
40 – 49	20	23,53	24	41,38	7	25,00	2	6,45	
50 – 59	22	25,88	15	25,86	8	28,57	7	22,58	
≥ 60	33	38,82	12	20,69	11	39,29	14	45,16	
Média	55,47 (s= 14,08)		51,45 (s= 12,37)		57,29 (s=12,50)		55,19 (s= 14,94)		0,2027
Variação	27- 85		32- 83		34- 92		28- 78		
Tamanho do Tumor, cm (Categoria T; T1: ≤2,0cm; T2: >2,0cm ≤ 5,0cm; T3: > 5,0cm)									
T1	42	50,00	47	82,46	13	46,43	7	23,33	< 0,0001
T2	33	39,29	9	15,79	13	46,43	21	70,00	
T3	9	10,71	1	1,75	2	7,14	2	6,67	
Sem inf.	1		1		0		1		
Grau Histológico (G1: Baixo Grau; G2: Grau Intermediário; G3: Alto Grau)									
G1	13	16,67	9	17,65	1	4	1	3,45	< 0,0001
G2	60	76,92	36	70,59	14	56,00	15	51,72	
G3	5	6,41	6	11,76	10	40,00	13	44,83	
Sem inf.	7		7		3		2		
Nodos Linfáticos									
Positivo	38	55,88	33	71,74	11	55,00	17	62,96	0,3443
Negativo	30	44,12	13	28,26	9	45,00	10	37,04	
Sem inf.	17		12		8		4		
Porcentagem das células tumorais positivas para Ki-67									
Média	19,98 (s= 20,67)		24,02 (s= 20,10)		38,67 (s= 25,23)		49,29 (s= 29,04)		

* SD = Sem Dados no arquivo médico pesquisado.

4. DISCUSSÃO

O hospital da FAP em Campina Grande, Paraíba, é uma referência pública para o tratamento do câncer de mama e os pacientes precisam pagar os testes de IHQ pois não são concedidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Estudos anteriores sobre populações brasileiras revelaram que, em comparação com o setor privado, os pacientes com câncer de mama de centros públicos de saúde têm maiores tumores revelados e um aumento da diferença de tempo entre o primeiro diagnóstico e tratamento do câncer de mama, e uma das razões é a maior dificuldade desse público no acesso a exames de diagnóstico (SOARES *et al*, 2012; REZENDE *et al*, 2009; TRUFELLI *et al*, 2008).

Este estudo revelou que entre 2005 e 2010 houve um considerável aumento de pacientes diagnosticados que fizeram o exame de imunohistoquímica, passando de 26,09% em 2005 para 51,61% em 2010. Esse resultado pode levantar a hipótese de uma melhora no acesso à informação e saúde. De acordo com a Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), a penetração dos Planos de Saúde privada no Brasil cresceu aproximadamente 58% desde o ano 2000, alcançando mais de 49,2 milhões de indivíduos em 2013 (ANS, 2014). Isso pode ser um dos motivos para o crescente aumento do acesso ao exame IHQ.

De acordo com a presente pesquisa, os subtipos moleculares com maiores frequências foram o luminal A (42,08%) e o Luminal B (28,71%). Tal achado concorda com o observado em estudo realizado com 10.159 mulheres, a partir de dados de 12 registros de câncer de base hospitalar e populacional de vários países (América do Norte, Europa e Austrália), com período de referência dos casos de 1974 a 2005, que demonstrou o subtipo luminal A como o mais frequente, com percentual de cerca de 71,3%, seguido pelo subtipo triplo negativo com 16% (BLOWS *et al*, 2010). BLOWS e colaboradores (2010) não incluíram a avaliação do índice de proliferação celular Ki-67 para classificação Luminal B/HER2-, tendo sido considerados para a classificação dos subtipos outros marcadores, tais como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e citoqueratinas 5 e/ou 6.

No Brasil, uma pesquisa que usou o índice de Ki-67 para a classificação já demonstrou resultados discordantes dos resultados da presente pesquisa, apresentando os subtipos luminal B (41,8%) e o triplo negativo (24,2%) com maior frequência (CINTRA *et al*, 2012). Essa pesquisa que foi feita em Minas Gerais, considerou que qualquer tumor Luminal com Ki-67 igual ou maior que 14% de células tumorais marcadas, fossem classificadas como Luminal B. Portanto, a utilização da classificação com o corte de 14% do Ki-67, pode justificar o percentual elevado de tumores classificados como luminal B/HER2- neste estudo citado.

No presente estudo os pacientes com CM tinham uma idade média de 58,34 anos em 2005, e 54,20 anos em 2010. As características histopatológicas dos tumores não apresentaram alterações significativas neste período de cinco anos, o que indica que as mulheres em 2010 não apenas detectaram o tumor mais cedo do que em 2005. O fato de que, em 2010, os pacientes foram, em média, cerca de quatro anos mais jovens do que em 2005 poderia ser, portanto, devido a mudanças de estilo de vida e aumento dos fatores de risco de câncer de mama em mulheres mais jovens, como confirma um estudo anterior no Centro-Oeste do Brasil (INUMARU *et al*, 2012).

De acordo com um estudo feito sobre fatores de risco em mulheres com CM em um Hospital Referência em Oncologia em Belém (Pará) (PENHA *et al*, 2013), a maioria das participantes diagnosticadas encontrava-se nas faixas etárias de 41 a 50 anos (44,4%) e de 51 a 60 anos (27,8%), a média de idade foi de 49 anos. Esses dados são semelhantes aos descritos pelo Instituto Nacional do Câncer, os quais mencionam uma tendência de aumento na incidência de casos de câncer de mama em mulheres até os 50 anos, ocorrendo uma diminuição de casos após essa idade (INCA, 2012). Essa tendência concorda com os dados do presente estudo que apontam para um aumento da incidência na faixa etária até 54 anos. Logo, é possível que as mudanças de hábitos e exposições aos prováveis fatores de risco estejam adiantando o aparecimento do CM em mulheres mais jovens.

Em um estudo anterior realizado em Minas Gerais, a idade média do diagnóstico do CM foi de 57,4 anos em 2012 (CINTRA *et al*, 2012). Essa idade média é aproximadamente concordante com a idade média de diagnóstico apresentada no presente estudo para o ano de 2005. Isso pode indicar que o aumento da incidência numa faixa etária mais baixa (54,20) pode ter perfil variado em relação as diferentes regiões do Brasil.

A faixa etária acima de 60 anos teve a maioria dos casos de câncer de mama no presente estudo, apresentando elevada frequência de tumores do subtipo TN (45,16%). Essa alta incidência do TN na faixa etária mais elevada foi uma característica epidemiológica encontrada pelo presente estudo que diverge de toda literatura disponível até o momento, pois em nenhuma outra região se registrou tão alta incidência desse subtipo molecular relacionada a idosos. Esse dado deve ser usado como base para futuras ações preventivas para populações de idosos no Nordeste Brasileiro. Quanto a incidência geral do TN, esse subtipo foi responsável por 15,35% dos casos de câncer de mama. Isto é consistente com estudos anteriores que identificaram que, dependendo da população, de 10% a 27% de todos os tumores de mama são triplo negativos (STEVENS *et al*, 2013; CAREY *et al*, 2006).

Além disso, foi evidenciado na presente pesquisa que a faixa etária entre 30 e 39 anos também tem um percentual elevado (22,5%) de tumores TN em comparação com os outros subtipos na mesma faixa etária: Luminal A: 7%, Luminal B: 12%, HER2: 7,1%. Assim, é possível afirmar que no Nordeste brasileiro o subtipo TN é mais incidente nas menores e nas maiores idades. Isso parece ser uma característica única do Nordeste. Em pesquisas feitas fora do Nordeste brasileiro e em outros países foi registrado apenas as menores idades relacionadas ao subtipo TN. Na América do Norte, por exemplo, verificou-se maior frequência de mulheres mais jovens no subtipo triplo negativo, e achados similares em pesquisas brasileiras, nas quais foi identificado percentual de 35,8% na faixa etária entre 40 e 49 anos (KWAN *et al*, 2009; CINTRA *et al*, 2012).

Não apenas o TN e sua alta incidência em idades avançadas foi um achado nesse estudo epidemiológico. Além desse dado, a outra característica única da incidência de CM na Paraíba encontrada nos resultados da presente pesquisa, foi a elevada incidência do subtipo Superexpressão do HER2 (13,86% dos tumores registrados). Essa porcentagem diverge de toda incidência desse subtipo em pesquisa epidemiológica que abrangem outras regiões do Brasil e outros países. Logo, é possível considerar que o CM na Paraíba apresenta prevalência de tumores mais letais em comparação com outras regiões. Isso pode justificar a razão da Paraíba ter apresentado uma das piores taxas de mortalidade do Brasil em 2012 (FREITAS-JUNIOR *et al*, 2013).

A variável T (tamanho do Tumor), nesse estudo, confirmou a maior agressividade dos subtipos Triplo Negativo e Superexpressão HER2 se comparados aos Tumores Luminais. A categoria 1 (T1 = T1: $\leq 2,0\text{cm}$) variou de 23,33% no subtipo TN para 82,46% nos tumores Luminal B, enquanto T2 variou de 15,79% no Luminal B, para 70,00% nos tumores TN ($p < 0,0001$). Esse resultado confirma o melhor prognóstico dos tumores Luminais apontado por pesquisas anteriores (CINTRA *et al*, 2012; CIQUEIRA *et al*, 2011; VIEIRA *et al*, 2008). A variável G (Grau Histológico) ressalta esse pior prognóstico do TN em revelar que a porcentagem de tumores de alto grau (G3) variou de 6,41% para o subtipo Luminal A até 44,83% para o subtipo TN ($p < 0,0001$). Henson *et al*, em 1991, Já descreveu que pacientes com tumores de grau histológico 1 e menores que 2 cm de tamanho tinham um excelente prognóstico, com 99% de sobrevida em 5 anos, mesmo quando apresentavam linfonodos axilares positivos (HENSON *et al*, 1991).

Não houve diferença significativa de *status* dos Nodos Linfáticos entre os subtipos moleculares ($p = 0,3443$). Mas é necessário considerar que 41 prontuários não apresentavam dados sobre essa Variável, tornando esse resultado não muito preciso.

Nesse estudo, verificou-se uma porcentagem de células tumorais positivas Ki-67 variando entre 19,98% (s = 20,67) no Luminal A, para 49,29% (s = 29,04) nos tumores triplo negativos ($p < 0,0001$). Esse resultado, que tem se repetido em pesquisas anteriores apresentando o Ki-67 mais relacionado aos subtipos de pior prognóstico, confirma a importância desse marcador para a classificação dos tumores quanto ao alto ou baixo risco. (CHEANG *et al*, 2009).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização da pesquisa usando os marcadores moleculares descritos, possibilitou uma caracterização consistente do perfil de incidência dos subtipos moleculares de CM no Hospital público da FAP. Foi possível reconhecer um comportamento único quanto a incidência do CM na Paraíba, pois os subtipos TN e Superexpressão do HER2 nunca apresentaram níveis tão altos em pesquisas anteriores. Isso deixa esse Estado em evidência como uma das regiões de maior atenção por ter as mais altas incidências de subtipos mais letais. Tais dados justificaram a razão da Paraíba ter a segunda maior taxa de mortalidade do país.

O subtipo TN apresentou um incidência perigosa relacionada as maiores idades (idosos) e as menos idades (mulheres jovens) simultaneamente. Isso evidencia a necessidade de planos públicos de prevenção e diagnóstico que alcancem tanto mulheres jovens como mulheres idosas. O sistema público de saúde poderia melhorar a terapia do câncer de mama, aproveitando melhor as informações já disponíveis, e fornecendo os ensaios de IHQ gratuitamente para todos os pacientes diagnosticados com a doença, além de executar um projeto de saúde pública que melhore o acesso a informação e exames diagnósticos para populações que residem longe dos centros de tratamento da Paraíba. A pesquisa mostrou que já houve um considerável aumento no acesso ao exame IHQ entre 2005 e 2010, mas esse dado é justificado apenas pelo aumento ao acesso da população a planos privados de saúde. Ainda é necessário uma avaliação das políticas públicas sobre a concessão de exames de IHQ para direcionar os tratamentos de forma específica para cada paciente.

Muitos prontuários não tinham todas as informações necessárias e a continuidade do histórico do tratamento; indicando dessa forma que alguns pacientes continuam os exames e tratamento em outros locais, dificultando assim o estudo prognóstico da doença e a coleta de informações precisas sobre a mortalidade relacionada a cada subtipo de CM. Essa situação mostra a necessidade de um sistema de prontuário eletrônico integrado, para melhorar o acesso as informações já existentes e futuras consultas para facilitar a caracterização da doença.

O uso de 202 amostras para se estudar subtipos moleculares ainda é um número baixo para se chegar a qualquer conclusão final sobre as frequências dos subtipos moleculares na população atual. Futuros estudos sobre os subtipos moleculares devem incluir amostras maiores.

ABSTRACT

Introduction: To help refine the classification of breast cancer (BC), molecular markers have been used in recent years. The principal markers are hormone receptors: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Objective: This study aimed to do an epidemiological study of incidence of invasive molecular subtypes of CM patients in the Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), to verify the relationship of molecular subtypes with clinical parameters of tumors and patient profile, so that one can characterize the profile of the incidence of subtypes of CM in Campina Grande, Paraíba, Brazil. **Methods:** Data from 202 patients with confirmed invasive CM in 2005, 2006, 2007 and 2010, respectively, were used for molecular classification. The records were obtained directly from the hospital medical record. The following data were collected: patient age when diagnosed, Tumor Size, Histologic Grade, Lymph Nodes status and percentage of tumor cells positive for Ki-67. The pathology reports were used to define the molecular subtypes of 202 medical records according to the following combination of markers: Luminal A (ER + and / or PR +, HER2-), Luminal B (ER + and / or PR +, HER2 +), overexpression HER2 (ER-, PR-and HER2 +) and triple negative (TN) (ER-, PR-, HER2-). Data were tabulated using Microsoft Excel 2010 software and statistically analyzed with the GraphPad Prism software Version 6 (La Jolla, CA). The chi-square (χ^2) and Fisher's exact test was used to compare categorical variables of age and tumor characteristics. For continuous variables, the Student test and analysis of variance (one-way ANOVA). **Results:** 42.08%, 28.71%, 13.86% and 15.35% were classified as Luminal A, Luminal B, HER2 + and TN, respectively. The number of women who underwent Immunohistochemistry tests increased from 26.09% to 51.61% and the average age of the diagnosed patients decreased from 58.34 years in 2005 to 54.20 years in 2010. There was no significant difference in histological grade and lymph node status of the affected and the difference in tumor size was not significant ($p = 0.0401$). **Discussion and Conclusion:** Age above 60 years had the most cases of CM, with high frequency of type TN (45.16%). This high incidence of TN in the older age group was an epidemiological feature found in this study that differs from all available literature so far, because in any other region has recorded high incidence of this molecular subtype related to the elderly. This data should be used as a basis for future preventive actions in elderly populations in the Brazilian Northeast.

KEYWORDS: Breast cancer. Molecular subtypes. Paraíba.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR, Planos de saúde e operadoras – Disponível em: <<http://www.ans.gov.br/>> - acesso em: Junho de 2014.

ALVES, Aline Rodrigues: **O uso da epidemiologia no planejamento das ações de saúde: Um estudo nos PSF's de Formiga – MG.** Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí, I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET, Bambuí/MG – 2008

AMARO, Joana *et al*: **Patterns of breast cancer mortality trends in Europe.** The Breast, Volume 22, 3º ed, 2013

AUTIER, Philippe *et al*: **Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries:** retrospective trend analysis of WHO mortality database. BMJ, 2010

BANDEIRA LAGES, Rafael *et al*: **Inequalities associated with lack of mammography in Teresina-Piauí-Brazil, 2010-2011.** Rev Bras Epidemiol, 2012

BATINA, Nataliya G *et al*: **Variation in tumor natural history contributes to racial disparities in breast cancer stage at diagnosis.** Breast Cancer Res Treat 2013

BERTOS, Nicholas R; PARK, Morag: **Breast câncer:** one term, many entities? The Journal of Clinical Investigation, Vol. 121, No. 10, Outubro de 2011

BENSON, John R; JATOI, Ismail: **The global breast cancer burden.** Future Oncology, Vol. 8, No. 6, p. 697-702, 2012

BLOWS, Fiona M *et al*. **Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival:** a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. Plos Med, 2010

BRASIL, Ministério da Saúde. Estimativa 2012: **Incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro. 2012 disponível em: <<http://www.gov.br/estimativa/2012>> acesso em: Janeiro de 2014

_____, Ministério da Saúde. Estimativa 2014: **Incidência de câncer no Brasil.** Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro. 2014 disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> acesso em: Janeiro de 2014

BUITRAGO, Farid; UEMURA, Gilberto; SENA, Maria Cristina Ferreira: **Fatores prognósticos em câncer de mama - Com. Ciências Saúde;** 2011

CAREY, Lisa A *et al* - **SEER Cancer Statistics Review, 1975–2005: Race, breast câncer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.** American Medical Association, JAMA Vol 295, No. 21, Junho de 2006

CHEANG, Maggie C. U *et al*. **Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** Journal of the National Cancer Institute. Vol. 101, 10º ed, 2009

_____, Maggie C. U *et al*: **Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple negative phenotype.** *Clinical Cancer Research*, 2008

CIANFROCCA, Mary; GOLDSTEIN, Lori J: **Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer.** *The Oncologist*, 2004

CINTRA, Jane Rocha Duarte *et al*. **Perfil Imunohistoquímica e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama.** *Rev. Assoc. Med., São Paulo – SP, Vol. 58, No. 2, 2012.*

CIQUEIRA, Magno Belém *et al*: **Subtipos moleculares do Câncer de mama.** *Femina*, vol 39, nº 10, 2011

CONSTANTINIDOU, Anastasia; SMITHEMAIL, Ian: **Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer?** *The Breast. Volume 20, Supplement 3, p. 158–S161, 2011*

CORRÊA, Paula Brito *et al* - **Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana** - *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2010

DESANTIS, Carol; NAISHADHAM, Deepa; JEMAL, Ahmedin: **Cancer statistics for African Americans, 2013**, *CA Cancer*, Volume 63, No 3, 2013

EIFEL, Patricia *et al*. **National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer**, November 1–3, 2000. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 93, No. 13, 2001

ELSTON C.W; ELLIS I.O: **Pathological prognostic factors in breast câncer I.** The value of histological grade in breast câncer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 1991

FERLAY, Jacques *et al*: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *International Journal of Cancer*, 2010

FREITAS-JUNIOR, Ruffo *et al*. **Variação temporal do tratamento cirúrgico do câncer de mama em um hospital universitário na região Centro-Oeste do Brasil.** *Rev. Col. Bras. Cir.*, Vol. 40, No. 3, p. 180-185, 2013

GALEA, Marcus H. *et al*: **The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*, Volume 22, 3º ed, p. 207-219, 1992

GLEASON, Michael X; MDZINARISHVILI, Tengiz; SHERMAN, Simon: **Breast cancer incidence in black and white women stratified by estrogen and progesterone receptor statuses.** *PLOS ONE*, Volume 7, 11º ed, 2012

GOLDHIRSCH, Aron *et al* - **Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.** *Annals of Oncology*, 2007

GOLDHIRSCH, Aron *et al*: **Thresholds for therapies**: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of Oncology*, 2009

HENSON, Donald E. *et al*: **Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22.616 cases of breast cancer**. The basis for a prognostic index. *Câncer*, 1991

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC)- TAVASSOÉLI, F.A. (ED); DEVILEE, P. (ED): **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs** (IARC WHO Classification of Tumours), 2003

INUMARU, Livia Emi *et al*: **Risk and protective factors for breast cancer in Midwest of Brazil**. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012

IRIGOYEN, M.A Arrechea, *et al*. **Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas**. *Anales Sis San Navarra*, vol.34, n.2, p. 219-233, 2011

IRVIN JR., William J; CAREY, Lisa A: **What is triple-negative breast cancer?** *European Journal of Cancer*, 2008

JEMAL, Ahmedin *et al*: **Global Cancer Statistics**. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 61, No. 2, 2011

KENNECKE, Hagen *et al*. **Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes**. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 28, No 20, Jul. 2010

KWAN, Marilyn L. *et al*. **Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors**. *Breast Cancer Research*, Vol 11, No 3, 2009

MARIE K *et al*, for the South Sweden Breast Câncer Group. **The prognostic value of Ki-67 is dependente on estrogen receptor estado and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast câncer**. *Modern Pathology*. 2010

MCPHERSON K; STEEL CM; DIXON JM: **ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics**. *BMJ*, Vol 321, set/2000

NAGATSUMA, Akiko Kawano *et al*: **Impact of recent parity on histopathological tumor features and breast cancer outcome in premenopausal Japanese women**. *Breast Cancer Res Treat*, Volume 138, 3^o ed, p. 941-950, 2013

ONITILLO, Adedayo A. *et al*: **Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival**. *Clinical Medicine & Research*, Vol 7, No 1/2: 4-13, 2009

PENHA, Nathalia Santos da *et al* - **Perfil sócio demográfico e possíveis fatores de risco em mulheres com câncer de mama: um retrato da Amazônia**. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Abril de 2013

PEROU, Charles M. *et al.* **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature, Vol 406, Agosto de 2000

RABENHOSRT *et al.*: Protocolos de Imunohistoquímica do Laboratório de Genética Molecular – UFC. 2010.

REZENDE, Magda Côrtes Rodrigues *et al.*: **Causas do retardo na confirmação diagnóstica de lesões mamárias em mulheres atendidas em um centro de referência do sistema único de saúde no Rio de Janeiro.** Rev Bras Ginecol Obstet, 2009

SALZANO, Francisco M; BORTOLINI, Maria C: **The evolution and genetics of Latin American populations.** New York: Cambridge University Press, 2002

SCHNITT, Stuart J: **Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy.** Modern Pathology, Boston, MA, USA, 2010

SILVA, Ronaldo Corrêa Ferreira da; HORTALE, Virginia Alonso: **Rastreamento do câncer de mama no Brasil.** Revista Brasileira de Cancerologia, 2012

SMIGAL, Carol *et al.*: **Trends in breast cancer by race and ethnicity: update.** CA Cancer Journal for Clinicians, Volume 56, No 3, Maio de 2006

SOARES, Priscila Bernardina M. *et al.*: **Características das mulheres com câncer de mama assistidas em serviços de referência do Norte de Minas Gerais.** Rev Bras Epidemiol, 2012

SØRLIE, Therese *et al.*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci U S A - PNAS, vol. 98, No. 19, setembro de 2001

_____, Therese *et al.*: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** Proc Natl Acad Sci U S A – PNAS, Vol. 100 No. 14, Julho de 2003

SOTIRIOU, Christos *et al.* **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** Proc Natl Acad Sci U S A. PNAS, Vol. 100, No. 18, 2003

TRUFELLI, Damila Cristina *et al.*: **Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público.** Rev Assoc Med Bras, 2008.

THULER, Luiz Claudio: **Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino.** Rev. Bras. de Cancerologia, v. 49, n. 4, p. 227-238, 2003.

VIACAVA, Francisco; SOUZA-JUNIOR, Paulo Roberto Borges de; MOREIRA, Rodrigo da Silva: **Estimativas da cobertura de mamografia segundo inquiridos de saúde no Brasil.** Rev Saúde Pública, 2009

VIEIRA, Daniella Serafin Couto *et al.*: **Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. vol.30 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2008

VODUC, K. David *et al*: **Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.** Journal of Clinical Oncology, Vol. 28, No. 10, Abril de 2010

VOLPI *et al*: **Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients:** a prospective study. Breast Cancer Res Treat 2000

WEIGEL, Marion T; DOWSETT, Mitch: **Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction.** Endocrine-Related Cancer, 2010

WOLFF, Antonio C. *et al*: **American Society of Clinical Oncology. College of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** Journal of Clinical Oncology, Vol. 25, No. 1, Janeiro de 2007