

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA

**Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama em
Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba
(FAP) em Campina Grande- PB**

Gibran Sarmiento de Almeida

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual da Paraíba – UEPB em
cumprimento aos requisitos necessários
para obtenção do título de Mestre em Saúde
Pública. Área de Concentração Saúde
Pública.**

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

Campina Grande

2015

**Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama em
Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba
(FAP) em Campina Grande- PB**

Gibran Sarmiento de Almeida

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual da Paraíba – UEPB em
cumprimento aos requisitos necessários
para obtenção do título de Mestre em Saúde
Pública. Área de Concentração Saúde
Pública.**

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

Campina Grande

2015

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.

A447e Almeida, Gibran Sarmiento de.
Epidemiologia e fatores de risco do câncer de mama em pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP) em Campina Grande - PB [manuscrito] / Gibran Sarmiento de Almeida. - 2015.
102 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Mathias Weller, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Câncer de Mama. 2. Epidemiologia. 3. Fatores de risco. 4. Neoplasia mamária. I. Título.

21. ed. CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Gibran Sarmiento de Almeida

Título: Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama em Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP) em Campina Grande - PB

Orientador: Prof. Dr. Mathias Weller

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba – UEPB em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, Área de Concentração Saúde Pública.

Aprovada em 25 de Agosto de 2015
Banca Examinadora

Assinatura: _____

Prof. Dr. Mathias Weller

Instituição: UEPB

Assinatura: _____

Prof.ª Dr.ª Danyelly Bruneska Gondim Martins

Instituição: UFPE

Assinatura: _____

Prof.ª Dr.ª Silvana Cristina dos Santos

Instituição: UEPB

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

Oliver Goldsmith

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Mathias Weller, pela paciência que teve nesses dois anos de luta e profundo ensinamento na realização de um trabalho de qualidade e muita competência. Sempre se mostrou um profissional sério, centrado e acessível durante o período de curso, dividindo todo o trabalho pesado. À minha orientadora de iniciação científica, Profa Dra Silvana Cristina dos Santos, pessoa visionária de muita ação. Foi minha professora e orientadora na graduação e ainda continua me acompanhando por toda trajetória acadêmica, torcendo sempre por mim e me dando mil puxões de orelha. Talvez seja uma futura orientadora/ professora do doutorado, aguardaremos sua decisão...

À Coordenação do Mestrado por toda assistência, assim como a todos os docentes e alunos do programa de Pós-Graduação em Saúde Pública pelos excelentes profissionais dedicados e também à secretária.

Ao acolhimento das enfermeiras e funcionários do hospital Assistencial da Paraíba (FAP). E também à CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais que investiram, tanto economicamente como moralmente, em minha educação. Nunca desistiram de acreditar no sonho de ver ser filho formado. Em particular, ao meu pai, Horácio de Almeida Lima, que sempre mostrou uma perseverança acima do comum, nunca desistiu dos seus objetivos de vida. Isso me inspirou para tentar ser, ao menos, mais parecido com sua personalidade ousada e destemida. Aos meus irmãos porque família é fundamental. Agradeço à Camila dos Santos, que me motivou nos dias de desânimo. Ela foi um porto seguro durante os dias difíceis, sempre me aconselhou da melhor forma possível e sempre dei ouvidos.

Aos meus amigos da graduação da UEPB e colegas do mestrado que fizeram dessa jornada mais divertida e bem humorada. Lembro-me do meu amigo Ítalo Bruno que já passou por todos os cursos da UEPB, UFCG e UVA, estando na sua quinta graduação, além de cursos técnicos e profissionalizantes do PRONATEC. Ele não cansa de estudar e eu também fui “na mesma onda”. Além de tudo, ainda foi e será um bom amigo.

Agradeço aos amigos seculares do curso de medicina da UFCG como Joan Kássyo, Jones Pessoa, “nerds” dedicados que estudam no mínimo oito horas por dias de segunda a sábado. No domingo eles saem para a “farrear” (ninguém é de ferro). Lembro também do meu primo Arthur Sarmiento que também faz parte desse grupo muito animado

Obrigado a todos!

RESUMO

Introdução: As taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama estão aumentando na região Nordeste do Brasil. O objetivo deste estudo foi identificar os subtipos moleculares e os principais fatores de risco do câncer de mama invasivo em uma população de pacientes de um hospital público da Paraíba.

Material e Métodos: Em ambos os estudos foram utilizados registros médicos de pacientes com câncer de mama. No primeiro estudo, do tipo retrospectivo, os dados de 269 pacientes, atendidas durante o período de 2005 e 2011, foram analisados a fim de identificar a frequência de receptores hormonais (HR), fator de crescimento epitelial (HER2), índice de proliferação celular (Ki67), e classificar os subtipos moleculares do câncer de mama em Luminal A e B, sobre-expressão do HER2 (HER2) e câncer de mama triplo negativo (TN). No segundo estudo, do tipo caso-controle, 81 mulheres diagnosticadas com câncer de mama invasivo e 162 controles, da mesma faixa etária (± 5 anos), foram entrevistados para investigar os fatores de risco associados a essa doença.

Resultados: Na amostra de 269 pacientes, 64 (23,79%) tumores foram classificados como Luminal A, 120 (44,61%) Luminal B, 39 (14,50%) sobre-expressão de HER2 e 46 (17,10%) triplo negativo; tendo, respectivamente, as idades médias de 58,25 ($\pm 1,827$); 53,33 ($\pm 1,153$); 56,59 ($\pm 2,054$) e 55,63 ($\pm 2,025$). Entretanto, 67,39% dos pacientes com tumores TN tiveram idade superior a 50 anos ($p = 0,0046$). A taxa de grau histopatológica (G3) foi elevada para HER2 (35,29%) e TN (34,28%) em comparação com os subtipos luminal A (3,92%) e Luminal B (12,62%), ($p < 0,0001$). A expressão média do marcador de proliferação celular Ki67 variou de 6,05% ($\pm 0,467$) para Luminal A e 50,38% ($\pm 4,691$) para TN ($p < 0,0001$). A sobrevivência de cinco anos foi 92,86% e 84,75% para TN e HER2 e 75,00% para Luminal A e B ($p = 0,2589$). No estudo tipo caso controle, vários fatores de risco relacionados à vida reprodutiva variaram entre as pacientes e mulheres saudáveis. A idade de menarca menor ou igual a 12 anos em mulheres múltíparas (OR= 2,057; IC: 1,111-3,808; $p = 0,022$) e a nuliparidade (OR= 2,662; IC: 1,173-6,041; $p = 0,019$) aumentaram o risco de manifestação da doença. A amamentação por período acima de 24 meses diminuiu o risco de câncer de mama (OR= 0,308; IC: 1,2-0,847; $p = 0,022$), sendo um fator protetor. Num modelo, a idade da menarca ≤ 12 (OR= 2,120; IC: 1,043-4,308; $p = 0,038$), única paridade (OR= 3,748; IC: 1,459-9,627; $p = 0,06$) e período reprodutivo > 10 anos (OR= 3,042; IC: 1,421-6,512; $p = 0,04$)

foram identificados como variáveis independentes que aumentaram o risco, enquanto tempo total de amamentação >24 meses diminuiu o risco (OR= 0,258; IC: 0,084-0,787; p=0,017).

Conclusão: Na amostra de pacientes com câncer de mama estudada, foi verificada elevada percentagem de tumores do subtipo molecular HER2+ e um aumento da taxa de pacientes com tumores TN com idade superior a 50 anos. Quanto menor a idade da menarca, número de filhos e período de amamentação, maior o risco para manifestação do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama, Epidemiologia, Fatores de risco, Diagnóstico

ABSTRACT

Introduction: The incidence and mortality rates of breast cancer are increasing in northeastern Brazil. The objective of this study was to identify molecular subtypes and the main risk factors of invasive breast cancer in a population of patients at a public hospital in Paraíba.

Methods: In both studies used medical records of patients with breast cancer. In the first study of retrospective type, of 269 patients data, met during the period from 2005 and 2011 were analyzed to identify the frequency of hormone receptor (HR), epidermal growth factor (HER2), cell proliferation (Ki67), and classify the molecular subtypes of breast cancer in Luminal A and B, overexpression of HER2 (HER2) and triple negative breast cancer (TN). In the second study, case-control, 81 women diagnosed with invasive breast cancer and 162 controls of the same age (± 5 years) were interviewed to investigate the risk factors associated with this disease.

Results: In the sample of 269 patients, 64 (23.79%) tumors were classified as luminal A, 120 (44.61%) Luminal B, 39 (14.50%) of HER2 overexpression and 46 (17.10 %) triple negative; having, respectively, the average age of 58.25 (± 1.827); 53.33 (± 1.153); 56.59 (± 2.054) and 55.63 (± 2.025). However, 67.39% of patients with TN tumors were older than 50 years ($p = 0.0046$). The histopathological grade rate (G3) was raised to HER2 (35.29%) and TN (34.28%) compared to the luminal subtypes (3.92%) and Luminal B (12.62%) ($p < 0.0001$). The average expression of the proliferation marker Ki67 ranged from 6.05% (± 0.467) for Luminal A and 50.38% ($\pm 4,691$) to TN ($p < 0.0001$). The five-year survival was 92.86% and 84.75% for TN and HER2 and 75.00% for Luminal A and B ($p = 0.2589$). In the case-control study, several risk factors related to reproductive life varied between patients and healthy women. The age of menarche less than or equal to 12 years in multiparous women (OR = 2.057; CI: 1.111 to 3.808; $p = 0.022$) and nulliparity (OR = 2.662; CI: 1.173 to 6.041; $p = 0.019$) increased the risk of manifestation of the disease. Breastfeeding for a period of over 24 months decreased the risk of breast cancer (OR = 0,308; CI: 1.2 to 0.847; $p = 0.022$), being a protective factor. A model, age of menarche ≤ 12 (OR = 2.120; CI: 1.043 to 4.308; $p = 0.038$), single-parity (OR = 3.748; CI: 1,459 to 9.627; $p = 0.06$) and reproductive age > 10 years (OR = 3.042; CI: 1.421 to 6.512; $p = 0.04$) were identified as independent variables that increased

the risk, while total breastfeeding period > 24 months decreased the risk (OR = 0.258; CI: 0.084 to 0.787; p = 0.017).

Conclusion: In the studied patients with breast cancer sample was observed high percentage of tumors HER2 + molecular subtype and increased rate of TN patients with tumors over the age of 50 years. The younger the age at menarche, number of children and breastfeeding, the greater the risk for manifestation of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	14
2. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. RESULTADOS	27
4.1 ARTIGO A	28
4.2 ARTIGO B	57
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
5. REFERÊNCIAS	80
6. APÊNDICES	93
7. ANEXOS	97

LISTA DE SIGLAS

CM: Câncer de Mama

ER: Receptor de Estrógeno

ER+: Presença de Receptor de Estrógeno

ER-: Ausência de Receptor de Estrógeno

FAP: Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba

HER2/neu: Fator de Crescimento Epidérmico Humano Receptor 2

HER2+: Presença de Fator de Crescimento Epidérmico Humano Receptor 2

HER2-: Ausência de Fator de Crescimento Epidérmico Humano Receptor 2

HR: Receptor Hormonal

NEGE: Núcleo de Estudo em Genética e Educação

OMS: Organização Mundial da Saúde

PR: Receptor de Progesterona

PR+: Presença de Receptor de Progesterona

PR-: Ausência de Receptor de Progesterona

SUS: Sistema Único de Saúde

TN: Triplo Negativo

UBS: Unidades Básicas de Saúde

UEPB: Universidade Estadual da Paraíba

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2015 de número de casos novos de câncer por região

Tabela 2. Classificação molecular por imuno-histoquímica e associação com o marcador KI67

ARTIGO A

Table 1. Molecular breast cancer subtypes by frequency and characteristics of patients (Total number N= 269).

Table 2. Molecular breast cancer subtypes by tumor histopathology (Total number N= 269).

Table 3. Molecular breast cancer subtypes by histological stage and applied therapies (Total number N= 212).

ARTIGO B

Table 1. Comparison of lifestyle risk factors, age and income between breast cancer patients and control group

Table 2. Odds ratio (OR) and confidence intervals (CI) of reproductive risk factors represented for the 243 women.

Table 3. Odds ratios (OR) and confidence intervals (CI) of a binominal logistic regression model represented for the 216 parous women.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

Figure 1. Cumulative five-year survival by molecular subtype in 127 breast cancer patients of years from 2005 to 2008.

1. INTRODUÇÃO

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a epidemiologia e os fatores de risco para câncer mama (CM), assim como biomarcadores moleculares. Atualmente, existem poucos estudos sobre esses temas no Brasil, e a maioria deles se concentra nas regiões Sul e Sudeste do país. Em virtude dessa lacuna existente na literatura, investigamos, nesta dissertação, os subtipos moleculares e fatores de risco do CM envolvendo uma ampla amostra de pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), e pacientes atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS), em Campina Grande (PB).

A Fundação Assistencial da Paraíba (FAP) foi criada em 1966 e está localizada em uma região bastante carente de serviços de saúde, no bairro periférico de Bodocongó. Trata-se de um Hospital Escola com uma ala de maternidade e outra, onde se situa o Centro de Cancerologia Ulisses Pinto, que atende a toda a população do estado da Paraíba. O hospital da FAP é uma entidade filantrópica sem fins lucrativos, com programa de atendimento ambulatorial, urgência, emergência e internação. Esse hospital é, sem dúvida alguma, uma referência no tratamento de câncer no estado.

Nesta pesquisa, objetivamos identificar os subtipos moleculares e os principais fatores de risco do câncer de mama invasivo em uma população de pacientes da FAP. Utilizamos, para tanto, duas estratégias metodológicas diferentes. No nosso primeiro artigo, fizemos um estudo transversal retrospectivo envolvendo 269 pacientes com câncer de mama para estudar a ocorrência dos subtipos moleculares. No segundo, fizemos um estudo do tipo caso controle, amostrando 81 pacientes e 162 controles, para identificar os fatores de risco em uma amostra da população nordestina, que é sabidamente miscigenada. A nossa pesquisa envolveu, portanto, tanto a análise de prontuários médicos como também foram realizadas entrevistas estruturadas com pacientes diagnosticadas com CM e outras atendidas em postos de saúde, que serviram como controles.

Os resultados deste trabalho resultaram em dois artigos já publicados em periódicos internacionais. O artigo A, intitulado “Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil”, foi publicado na revista “BMC Women's Health” (Fator de Impacto 1,5 – Qualis B1). O artigo B com o título “Reproductive risk factors differ among breast cancer patients and controls in a public hospital of Paraíba, Northeast Brazil”, foi publicado na revista “Asian Pacific Journal of Cancer Prevention” (Fator de Impacto 2,5).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

As taxas de incidência para o câncer de mama (CM) dobraram nos últimos trinta anos, permanecendo como o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres (FERLAY, 2013 e 2010; BENSON, 2012; WHO, 2006). Em alguns países desenvolvidos, a incidência e a taxa de mortalidade mantiveram-se as mesmas ou até foram reduzidas durante a última década (BENSON, 2012; AMARO, 2013; AUTIER, 2010). Em contraste, nos países em desenvolvimento, a incidência de CM tem aumentado (FERLAY, 2012, 2010). Por exemplo, no período de 2002 a 2008, foi verificado um aumento de 25,6% de novos casos e o número de óbitos aumentou de 221 mil para 268 mil (GLOBOCAN, 2008; PARKIN, 2005).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), nos anos entre 2012 e 2014, a incidência de CM aumentou de 52 para 56 casos por 100 mil mulheres; e estima-se que sejam detectados 57.120 novos casos em 2014 (INCA, 2012; INCA, 2014). Na Tabela 1, são mostradas as estimativas para o ano de 2015 no número de casos novos de CM por região do país. Na região Nordeste foi previstos 10.490 novos casos de CM, 120 casos a mais que na região Sul, estando essa região na segunda posição no “ranking” dos novos casos.

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2015 de número de casos novos de câncer de mama por região do Brasil.

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Mama Feminina	1.720	10.490	3.800	10.370	30.740

Fonte: INCA, 2015

A taxa de mortalidade de CM diminuiu e, posteriormente, estagnou entre os anos de 1994 e 2009 nas regiões do Sudeste e Sul do Brasil, respectivamente. Entretanto, ela aumentou em 5,3% na região Nordeste (FREITAS-JUNIOR et al., 2012), onde foi verificado o maior aumento de óbitos devido ao CM do Brasil (INCA, 2012; INCA, 2014). No Maranhão, esse aumento foi de 12%; na Paraíba, 11,9% e no Piauí, 10,9%, sendo as maiores taxas de mortalidade de CM do país (FREITAS-JUNIOR, 2012). Esse aumento na incidência e mortalidade pode ser explicado pela elevação da expectativa de vida da população

nordestina e o pouco acesso da população aos exames de mamografia (VIACAVA et al., 2009; GEBRIM et al., 2006; IBGE, 2014). Além disso, pode ter melhorado a coleta e o registro de novos casos de câncer de mama nos hospitais. No entanto, uma parte desses novos casos reflete de fato um aumento da própria incidência, ou seja, no número de mulheres com essa doença (INCA, 2012).

1.1.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

O câncer ocorre quando uma célula perde o controle sobre o ciclo celular e se transforma em um tumor devido a diversos tipos de alterações genéticas. As células cancerígenas são caracterizadas pela proliferação inadequada, crescendo e multiplicando-se independentemente dos sinais de outras células. Elas não entram em apoptose e conseguem, durante a formação de metástases, dissociar-se do tumor primário e invadem outros tecidos (WAYT, 2003).

Para o diagnóstico do CM, inicialmente a paciente pode suspeitar da doença através do autoexame da mama, realizar exame clínico e de imagem, a mamografia. Caso sejam encontrados nódulos suspeitos, faz-se uma biopsia por meio da punção com agulha do nódulo e o material é levado para análise histopatológica. Confirmado o diagnóstico de tumor maligno, a paciente pode realizar intervenção cirúrgica e exames complementares de imunohistoquímica, que auxiliarão na definição do tratamento por químico e/ou radioterapia, terapia hormonal e imunoterapia (INCA, 2015).

As neoplasias da mama são subdivididas de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (TAVASSOLI, 2003). Existem tumores invasivos e tumores não invasivos (*in situ*) que podem afetar os dutos ou lóbulos da mama. Os mais comuns são o carcinoma ductal invasivo que respondem por aproximadamente 70% dos casos de CM, o carcinoma lobular invasivo, que atinge 10% dos casos; o carcinoma misto ducto/lobular invasivo (13%), o carcinoma medular (3%), o carcinoma mucinoso (2%) e carcinoma tubular que atinge somente 1% da população com CM (ROSS et al., 2005).

O sistema “TNM” para a classificação dos tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix (França) entre os anos de 1943 e 1952. Esse sistema trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença, determinação clínica e histopatologicamente (quando possível). Para descrever a extensão anatômica da doença, utiliza-se a avaliação de três componentes: **T** – a extensão do tumor primário; **N** – a ausência

ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; **M** – a ausência ou presença de metástase à distância (FUNDAÇÃO DO CÂNCER, 2013). O tamanho é categorizado de acordo com a Classificação de Tumores da OMS, sendo o tamanho (**T**) subdividido em : T1 ($\leq 2,0$ cm), T2 ($> 2,0$ cm $\leq 5,0$ cm), T3 ($> 5,0$ cm) e T4 (Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele). Em relação ao **N**, em um estudo de Ries (2007), mostrou que mais de 90% das pacientes são do tipo “linfonodo negativo”, e quase todas tiveram uma sobrevida de cinco anos, sendo este valor inferior a 70% para os pacientes do tipo “linfonodo positivo”. A presença ou a ausência de metástases nos linfonodos axilares são os melhores indicadores para determinação do prognóstico da doença (RIES, 2007).

O grau histológico do tumor é determinado pelo pleomorfismo nuclear, que é a variação no tamanho e forma do núcleo, e a taxa de células mitóticas. Esta análise serve para identificar o grau de diferenciação do tumor em G1, que representa o estado mais diferenciado com melhor prognóstico e G3, o menos diferenciado com o pior prognóstico (ELSTON e ELLIS, 1991).

1.1.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os tumores de câncer são classificados de acordo com o local onde eles se desenvolvem em ductal, se eles afetam os ductos mamários; ou lobular, se afetam as glândulas lobulares da mama. No caso dos tumores que são ductal-invasivos, podemos classificá-los usando marcadores moleculares de acordo com os receptores existentes de superfície da célula tumoral do tipo hormonal e o receptor de fator de crescimento epidérmico chamado de “HER2/neu”. Dessa forma, um câncer de mama ductal-invasivo pode apresentar a presença ou ausência destes receptores, sendo subdividido em:

- ✓ Receptor de estrogênio (RE) positivo ou negativo;
- ✓ Receptor de progesterona (RP) positivo ou negativo; e
- ✓ Receptor HER2 positivo ou negativo.

A proteína Ki67 (também conhecida como MKI67, referida no texto daqui por diante apenas como Ki67) é um marcador celular para proliferação celular. Esta proteína nuclear é expressa nas células em divisão durante fases G1 a M do ciclo celular, mas não é detectada em células em repouso. A expressão de Ki67, detectada por imuno-histoquímica, é um dos indicadores mais confiáveis do estado proliferativo das células cancerosas (SCHOLZEN et al., 2000).

Em 2009, na Conferência de Câncer de Mama St-Gallen, Ki67 foi recomendado como um biomarcador para prognóstico e sensibilidade das células cancerosas à terapia endócrina ou quimioterapia (GOLDHIRSCH et al., 2009). Em 2011, Ki67 foi considerado como um dos fatores que poderiam servir para classificar os diferentes subtipos moleculares de CM (GOLDHIRSCH et al., 2011). Ki67 está intimamente associada com o crescimento e invasão de câncer de mama. Os CM Ki67 positivos são caracterizados por células que crescem mais rapidamente e são mais agressivas no processo de invasão dos tecidos (GOLDHIRSCH et al., 2011). Dependendo da quantidade dessa proteína no tecido e da ausência ou presença dos receptores hormonais e HER2/neu, a classificação molecular do tumor ductal-invasivo de mama é realizada em cinco subgrupos, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação Molecular por Imuno-histoquímica e associação com o marcador KI67

Subtipos Moleculares	Marcadores Classificatórios	Marcador Ki67
1- Luminal A	ER+ e /ou PR+, HER2-	≤ 14%
2- Luminal B	ER+ e /ou PR+, HER2 + ou ER+ e /ou PR+, HER2-	* > 14%
3- Super-expressão de HER2 (HER2+)	ER-, PR-, HER2 +	*
4- Triplo-negativo (TN)	ER-, PR-, HER2 -	*

Fonte: PEROU, 2011; BARDOU, 2003; ANDERSON, 2001; ELLEDGE, 2000.

* Com qualquer tipo de expressão Ki67

A presença ou ausência dos receptores de estrógeno (ER) e os de progesterona (PR) nos exames imuno-histoquímicos foram estabelecidos como fatores preditivos para o prognóstico da doença. O grupo duplo positivo (ER+PR+) abrange a maioria dos tumores de câncer de mama (55-65%), com melhor prognóstico e uma boa resposta a terapia hormonal (DUNN WALD, 2007; RAKHA, 2007; ANDERSON, 2001). Entre 75% e 85% dos pacientes deste grupo respondem bem as terapias hormonais em comparação a menos de 10% no grupo Super-expressão de HER2 (HER2+) (DOWSETT, 2006; KUMAR, 2004; GOUSSARD, 1994; LANARI, 2009). Também foi demonstrado que o risco de mortalidade é significativamente maior para os pacientes com tumores do tipo (HER2+), comparados aos

pacientes dos tipos luminais, independente do estágio tumoral, grau nuclear, ou idade do paciente. O grupo duplo negativo abrange de 18% a 25% de todos os casos de câncer de mama e aproximadamente 85% deles representam tumores do maior grau (grau 3), tendo uma taxa aumentada de recidiva tumoral, resposta negativa a terapia hormonal e a diminuição da taxa geral de sobrevida dos pacientes (BARDOU, 2003; ANDERSON, 2001; ELLEDGE, 2000).

A importância clínica de HER2 como biomarcador para CM foi reconhecida pela primeira vez em 1987 (SLAMON, 1987), tendo valor prognóstico e preditivo. O aumento da expressão de HER2 está indiretamente associado à presença da proteína Ki67. Os estudos mostraram que o aumento da expressão do gene HER2 e síntese da proteína Ki67 pelas células tumorais estão associados com pior prognóstico e resposta a quimioterapia, comparados com os tumores que não expressam HER2 (HER2-) (CHIA, 2008; KAUFMANN, 2007; WOLFF, 2007). O marcador HER2 se tornou um importante alvo terapêutico. A indústria produziu um anticorpo monoclonal chamado de Trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, CA, EUA) que bloqueia o receptor HER2, sendo utilizado no tratamento de tumores do tipo HER2+ (WARD, 2009; PRESS, 2008; BERTUCCI, 2006; PICCART-GEBHART, 2005). Adicionalmente, HER2 é atualmente alvo para o desenvolvimento de novas drogas para tratamento ao câncer de mama.

O subtipo de CM conhecido por Triplo-Negativo (TN) é subdividido em basal-like, normal-like, claudin-low. O tipo Basal-like (basalóide) é um câncer triplo-negativo com ausência de ambos os receptores hormonais, tanto de estrogênio quanto de progesterona, e apresenta também a ausência de sobre-expressão de HER2. Ele também apresenta expressão de queratinas de alto peso molecular como CK 5/6 e CK 17, bem como de vimentina. Na literatura, há grande divergência quanto aos marcadores imuno-histoquímicos necessários para que seja caracterizado um tumor no perfil basalóide (PEROU et al., 2000; VAN DE RIJN et al., 2002; SORLIE et al., 2003; NIELSEN et al., 2004; REIS-FILHO e TUTT, 2008). Encontram-se neste grupo a maioria das neoplasias com mutação do BRCA1 e os carcinomas metaplásicos. O carcinoma medular é um dos mais interessantes desse grupo, pois cerca de 95% deles tem perfil basalóide com morfologia agressiva, mas possuem prognóstico favorável (CARVALHO, 2010). O tipo Normal-like não expressa receptores hormonais nem HER2 e não apresenta marcadores basais como citoqueratina de alto peso molecular (SORLIE et al., 2003). E, finalmente, o tipo “Claudin-low”, conforme descrito por Herschlowitz e col. (2007) e Prat e Perou (2009), apresenta baixa expressão de genes envolvidos na junção e

adesão celular como claudina 1, 3, 4 e 7 e E-caderina. Esses tumores do tipo “claudin-low” têm expressão variável de genes relacionados a marcadores basais e alta expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima (EMT), como SLUG e TWIST1, bem como para o tecido mesenquimal, como a vimentina.

No Brasil, o trabalho mais detalhado e completo sobre os subtipos moleculares foi desenvolvido por Filomena e col. (2014) que descreveu os dados de 5.687 pacientes de câncer de mama invasivo distribuídos nas cinco regiões do país. As regiões Sul e Sudeste, com uma maior porcentagem de ascendência europeia e nível socioeconômico, apresentaram a maior proporção de tumores luminais. A região Norte apresentou subtipos mais agressivos (sobre-expressão HER2 e triplo-negativo), enquanto a região Centro-Oeste predominou carcinomas Luminal B. No Nordeste, região com uma alta frequência africana, apresentou influência intermédio dos diferentes subtipos moleculares.

Outros poucos estudos epidemiológicos sobre câncer de mama foram realizados no nordeste brasileiro. Um deles, por exemplo, descreveu o perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes de Salvador, no estado da Bahia. Foram recrutadas 59 pacientes entre dezembro de 2012 e maio de 2014, com idade média de 56,9 anos. O subtipo molecular mais comum na amostra foi o luminal B, com 35 casos (59,3%), seguido do luminal A (11 casos; 18,6%), triplo-negativo (6 casos, 10,2%) e HER2+ (7 casos; 11,9%) (BARRETO-NETO et al., 2014). Nenhum outro investigou especificamente o tema deste trabalho.

1.1.3 OPORTUNIDADES TERAPÊUTICAS

O tratamento do câncer de mama é feito por quimioterapia, radioterapia, tratamento hormonal e imunoterapia. A escolha da terapia depende da classificação dos quatro subgrupos moleculares (Luminal A, Luminal B, TN ou HER2). Para todos os casos, são utilizados quimio e radioterapia, entretanto, o tratamento hormonal, que é feito com bloqueadores de receptores hormonais ou bloqueadores da síntese de ER e PR, será recomendado para os cânceres do tipo luminal somente; e a imunoterapia para tumores que expressam HER2. No caso do mais grave deles, o triplo-negativo (TN) somente são indicadas a radio e a quimioterapia. A seguir, descrevemos mais detalhadamente cada um desses tratamentos.

A. Quimioterapia

A quimioterapia clássica tem como um dos mecanismos fundamentais a inibição não-seletiva da proliferação celular. Os agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais. Para evitar os efeitos tóxicos intoleráveis dos quimioterápicos e que eles ponham em risco a vida dos pacientes, são obedecidos critérios para a indicação da quimioterapia (INCA, 2015). Geralmente a quimioterapia é aplicada na maioria das pacientes com estado nodo-linfático positivo. No caso de tumores do tipo triplo-negativo, a quimioterapia representa juntos com a radioterapia a única forma de terapia aplicável.

B. Radioterapia

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada (INCA, 2015).

C. Terapia Hormonal – Luminal A e B

Alguns tumores necessitam de hormônios para se desenvolver mais rapidamente e são identificados como “hormônio sensível” ou “hormônio dependente” (CANCER RESEARCH UK, 2008). A utilização de drogas anti-hormonais como agentes quimioterápicos tem apresentado bons resultados no tratamento de algumas neoplasias de mama hormônio-dependentes (RIGGS et al., 2003; HENDERSON et al., 1993). O mecanismo de ação desses fármacos anti-hormonais consiste em antagonizar o hormônio que está estimulando a proliferação neoplásica (HENDERSON et al., 2000). Uma nova classe desses medicamentos com ação nos receptores de estrogênio, como o fulvestranto, tamoxifeno e anastrozol, possui singular mecanismo de ação: ligam-se e bloqueiam receptores celulares de estrógeno, causando degradação da proteína deste receptor, com consequente inibição da sinalização intracelular, retardando o crescimento neoplásico. Enquanto o fulvestranto e tamoxifeno

bloqueiam os receptores de estrógenos, o anastrozol interrompe sua produção. (RIGGS et al., 2003; HENDERSON et al., 2000; MUSS et al., 1994).

D. Imunoterapia – Sobre-expressão de HER2

Para as pacientes que apresentam a sobre-expressão de HER2 (HER2+) o tratamento vigente mais adequado é a imunoterapia. Aproximadamente 20% a 25% dos tumores de mama expressam a proteína transmembranda HER2/neu, que é um fator de crescimento epitelial (ROMOND et al., 2005). O anticorpo monoclonal anti-HER2/neu (herceptina) ou trastuzumabe, além de mostrar resultados positivos em pacientes com tumores metastáticos que hiperexpresssem essa proteína, também pode reduzir a recidiva de pacientes tratadas com esse anticorpo por um ano após a cirurgia (ROMOND et al., 2005; PICCART-GEBHART et al., 2005).

1.1.4 FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA

Os fatores de risco são bem estabelecidos na literatura sobre CM e podem ser subdivididos em fatores reprodutivos, fatores do estilo de vida, fatores ambientais e o histórico familiar.

A. Fatores Reprodutivos

Os fatores reprodutivos estão associados com a manifestação dos caracteres sexuais, gestação e amamentação. Scowitz e colegas (2005) descobriram que o risco de câncer de mama aumentou no grupo de mulheres com menarca antes de 11 anos, menopausa tardia (55 anos ou mais), nuliparidade (ausência de filhos), e primeira gestação após 30 anos. O estudo de Hartz e He (2013), por outro lado, que incluiu os dados de 147.202 mulheres nos Estados Unidos e objetivou a análise de 800 potenciais fatores de risco, mostrou que a nuliparidade e menopausa tardia eram os principais fatores de risco para desenvolvimento de CM.

Uma revisão da literatura com meta-análise de dados, realizada em 2012, mostrou que os principais fatores de risco reprodutivos associados ao câncer de mama são: a idade avançada da primeira gravidez (>30 anos), a alta paridade ou alto número de gestações, a menarca precoce, a menopausa tardia e a densidade mamária (razão entre o tecido glandular e

o tecido adiposo da mama) (MEADS, 2012). Estudos recentes indicam que o aumento da duração da amamentação diminui o risco de câncer de mama, tornando-se um fator protetor mais bem estabelecido na literatura (ANOTHASINTAWEE, 2013). Outro estudo realizado por Nagatsuma (2013), Wunsch (2002) e Koifma (2003) também encontrou associação entre a curta duração da amamentação e número elevados de partos como fatores de risco.

B. Fatores do Estilo de Vida

Fatores de risco como obesidade, sedentarismo e alto consumo de ácidos graxos saturados foram identificados como componentes do estilo de vida que aumentam o risco de câncer de mama (ALEGRE, 2013); assim como a quantidade de colesterol (MEADS, 2012). A obesidade é considerada um fator de risco porque resulta num aumento do nível de estrogênio produzido pelo tecido adiposo (CIBEIRA, 2006). A maioria dos tumores de câncer de mama é estrogênio dependente, e se sabe que o hormônio tem influências no surgimento do câncer ao induzir o crescimento das células do tecido mamário, aumentando o potencial de alterações genéticas e favorecendo o desenvolvimento de tumores (ROBLES, 2001). Anothaisintawee (2013), Nagatsuma (2013), Wunsch (2002) e Koifma (2003) apresentaram o sedentarismo pós-menopausa, alimentação desequilibrada, obesidade, ingestão de bebidas alcoólicas com moderação, uso de anticoncepcionais e reposição hormonal como fatores relacionados ao estilo de vida para desenvolvimento do câncer de mama. Hartz e He (2013) mostraram que envelhecimento, obesidade, uso de hormônios femininos (terapia hormonal), consumo de álcool e tabagismo eram fatores independentes e significativos para o aumento do risco da doença. Segundo o estudo de Anothaisintawee (2013), a diabetes mellitus também foi considerada um fator de risco.

O consumo regular de álcool acima de 60 gramas por dia é considerado um fator de risco devido à produção de acetaldeído na metabolização do álcool, substância mutagênica e carcinogênica, estimulador da produção de estrogênio e imunodepressor (SCLOWITZ, 2005). De forma semelhante, qualquer fator que resulte no aumento do estrogênio poderá elevar também o risco ao desenvolvimento do câncer de mama. A obesidade foi considerada o maior fator de risco e discutida num estudo realizado no Paraná em 2010, mas sem gerar uma relação direta entre fatores de risco e a prevalência da doença (CARVALHO DE MATOS, 2010).

C. Fatores Ambientais

Para fatores ambientais, o trabalho de Meads (2012) demonstrou positiva a associação da exposição à radiação ionizante (raios X e raios gama, radiações electromagnéticas, raios alfa, raios beta, nêutrons, prótons) com tumores cancerígenos da mama. Hartz e He (2013) mostraram que fatores associados às precárias condições socioeconômicas aumentaram o risco de desenvolver câncer de mama, mas somente em combinações com outros fatores de risco (HARTZ E HE, 2013).

D. Histórico Familiar

Fatores hereditários como hiperplasia atípica ou massas benignas, origem populacional e étnica, história familiar com câncer de mama, história familiar de qualquer tipo de câncer estão associados com o desenvolvimento da CM (HARTZ e HE, 2013; MEADS, 2012). De acordo com a Fundação do Câncer (2013) e Easyon (1999), os genes BRCA1 e BRCA2 são responsáveis pela síntese de proteínas supressoras de tumores. Quando qualquer um destes genes sofrem alterações, de modo que o seu produto proteico não funciona corretamente, então acarretam em danos do DNA que não podem ser reparados. Como resultado, as células são mais propensas a desenvolver alterações genéticas adicionais que podem conduzir ao câncer. Mutações específicas nos genes BRCA1 e BRCA2 (representam 5% dos casos de CM) aumentam o risco de mulheres desenvolverem câncer de mama e ovário.

1.1.5 ESTUDOS SOBRE FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA NO BRASIL

A transição epidemiológica e a alteração no estilo de vida da população brasileira trouxeram mudanças no perfil morbi-mortalidade. O envelhecimento populacional e aumento de doenças crônicas, como obesidade e diabetes mellitus, assim como a obesidade tem contribuído para aumentar também os casos de CM (PAULINELLI, 2003). No Brasil, a maior parte dos estudos sobre os fatores de risco do câncer de mama vem das regiões Sul e Sudeste (SOUZA PINHO E DA SILVA FREIRE COUTINHO, 2005). Alguns deles, como Gonçalves e colegas (2007), traçam o perfil epidemiológico do câncer de mama da região Sul. Neste estudo, por exemplo, foram coletados dados anuais do Departamento de Informação e

Informática do SUS entre 1980 a 2002, destacando fatores de risco relacionados ao estilo de vida. No Rio Grande do Sul, um estudo de Santos (2009) destacou os fatores de risco relativos à alimentação que contribuem para o desenvolvimento de câncer de mama. Basílio e colegas (2008) estudaram o envelhecimento como fator de risco, levantando dados de mortalidade no período de 1980 a 2005.

No Nordeste, existem poucos estudos sobre fatores de risco para CM. Em um estudo realizado em Minas Gerais, feito por Araújo e col. (2011), durante dez meses, foram coletadas informações por entrevista com mulheres que estavam em tratamento de quimioterapia contra câncer de mama. Observou-se a relação entre o estadiamento avançado dos tumores com a baixa escolaridade das pacientes (ARAÚJO et al., 2011). Em outros dois trabalhos no Recife, desenvolvidos por Kalache e col. (1993), foram utilizadas informações de 293 mulheres portadoras de CM a partir do fichário clínico. Eles constaram a ocorrência de todos os fatores de risco para o câncer de mama já preconizados na literatura, entre eles: idade avançada durante a primeira gravidez e nuliparidade. Lima e Falk (1998) apontam a importância de fatores de risco como menarca precoce, histórico familiar de câncer de mama, aborto e tabagismo. Já no estudo de Lima e col. (2008), realizado em João Pessoa/PB, foi observado que o consumo de carne vermelha e frituras poderiam aumentar o risco para o desenvolvimento de CM, enquanto que a ingestão de frutas, feijão e leite podem atuar como protetores. Estudos recentes de Batiston (2011), realizados no Recife, revelaram que mulheres conscientizadas sobre os fatores de risco como o histórico familiar, junto com a formação escolar, tendiam a aplicar medidas preventivas regularmente como a mamografia.

Em síntese, com a exceção do estudo de Lima (2008) sobre hábitos alimentares, desde a década de 90 não foram publicados novos estudos com avaliações detalhadas sobre fatores de risco em populações do Nordeste do Brasil.

1.1.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES DE RISCO E SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

O uso de anticoncepcionais também foi identificado como fator de risco em mulheres jovens, abaixo de 40 anos. Elas são mais afetadas por agressivas formas de tumores triplo-negativo (ER-, PR-, HER2-) de câncer de mama (NAROD, 2012). Num estudo incluindo 510 pacientes com câncer de mama, na Espanha, foi observado que mulheres que amamentaram sete meses ou mais possuíam significativamente menor risco de desenvolver a doença de

subtipo molecular TN e que a combinação de baixa paridade com longa amamentação protegeu contra esta forma agressiva de câncer (REDONDO, 2012). Num estudo realizado na Alemanha, entre 2002 e 2008, os autores conseguiram mostrar que baixa paridade e idade avançada durante a primeira e a última gravidez foram associadas com aumento tumoral no diagnóstico inicial da doença (Categoria T). Em outras palavras, as mulheres que acumularam esses fatores de risco possuíram tumores mais agressivos (MOUSAVI, 2013). No grupo de pacientes de pré- menopausa as mulheres nulíparas ou que tiveram o primeiro filho abaixo dos 30 anos, também tiveram tumores com alta categoria T.

Um estudo realizado por Rosner e colegas (2013) mostrou uma associação significativa entre mulheres obesas em estado de menopausa com o desenvolvimento de tumores com a expressão ER. Por outro lado, a idade avançada na primeira gestação foi associada com a expressão PR (ROSNER, 2013). Esses estudos mostraram que existem associações entre fatores de risco e a agressividade tumoral, expressa, respectivamente, pela presença ou ausência de ER e PR. Dessa forma, fatores de risco foram associados com os subtipos moleculares definidos pela expressão dos receptores hormonais (ER, PR e HER2).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi identificar os subtipos moleculares e os principais fatores de risco do CM invasivo presentes numa população de pacientes de um hospital público da Paraíba no Nordeste.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar as características clínicas e histopatológicas dos subtipos moleculares;
- ✓ Investigar a frequência dos subtipos moleculares de CM em uma população miscigenada do Nordeste do Brasil com ascendência mista (africana, europeia e indígena);
- ✓ Comparar a taxa de sobrevida entre os subtipos moleculares;
- ✓ Comparar os subtipos moleculares com estudos anteriores de populações de outras regiões do Brasil e outros países;
- ✓ Identificar fatores de risco que aumentaram a incidência de câncer de mama invasivo.

3. RESULTADOS

A elaboração deste trabalho resultou na publicação de dois artigos em periódicos internacionais: O artigo A com o título: “Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil” foi publicado na revista “BMC Women's Health” (Fator de Impacto 1,5 – Qualis B1). O artigo B com o título “Reproductive risk factors differ among breast cancer patients and controls in a public hospital of Paraíba, Northeast Brazil”, foi publicado na revista “Asian Pacific Journal of Cancer Prevention” (Fator de Impacto 2,5).

3.1 ARTIGO A

Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil

Ana Cláudia de Macedo Andrade¹, Carlos Alberis Ferreira Júnior¹, Beatriz Dantas Guimarães¹, Ana Waleska Pessoa Barros¹, Gibran Sarmiento de Almeida², Mathias Weller²

¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS). Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande, Brasil.

Corresponding author

Prof. Dr. Mathias Weller

Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública.

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Rua Juvêncio Arruda, S/N Campus Universitário (Bodocongó).

CEP. 58.109 - 790

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Tel.: (0055)-83-9941-8090; (0055)-83-3066-4960

mathiasweller@uepb.edu.br

E-Mail addresses:

Macedo Andrade AC: anaclaudia2008@hotmail.com

Ferreira Júnior CA: alberis_aj@hotmail.com

DantasGuimarães B: biadantasg@gmail.com

Pessoa Barros AW: waleskabarros2011@gmail.com

Sarmiento de Almeida G: gibransarmiento@hotmail.com

Abstract

Background: The frequencies of molecular breast cancer subtypes vary among different human populations. The Northeastern region of Brazil has a mixed population of African, Indigenous and European ancestry. This retrospective study investigated breast cancer subtypes and applied therapies in a public hospital of Northeastern Brazil.

Methods: Data of 633 patients with invasive breast cancer from 2005 to 2011 were obtained from medical records. Status of hormone receptor (HR), HER2 and Ki67 expression index of 269 out of 633 patients were used to define subtypes of Luminal A and B, HER2 and triple negative (TN) breast cancer. Expression index of Ki67 $\geq 14\%$ was applied to distinguish Luminal A from Luminal B subtypes.

Results: Overall, 185 (68.77%) and 132 (49.07%) patients showed positive hormone receptor (HR+) and positive HER2 (HER2+) tumors. The mean age ranged from 53.33 to 58.25 years for patients with tumors of Luminal B and Luminal A subtypes, respectively ($p=0.0182$). In general, 67.39% of patients with TN tumors aged over 50 and 19.57% aged between 31 and 40 years ($p=0.0046$). The rate of small tumors (T1: $\leq 2.0\text{cm}$) varied from

22.73% to 52.46% for TN and Luminal A subtypes ($p= 0.0088$). The rate of high graded (G3) tumors was increased for HER2 and TN subtypes (35.29% and 34.28%) compared to Luminal A and Luminal B subtypes (3.92% and 12.62%), respectively ($p < 0.0001$). The five-year survival rate ranged from 92.86% to 75.00%, for Luminal A, HER2 and TN subtypes, respectively (HR: 0.260 to 1.015; 95%CI: 0.043 to 3.594; $p= 0.2589$). Patients with HER2 positive (HER2+) breast tumors did not receive immunotherapy and chemotherapy application varied from 54.84% to 86.49% for Luminal A and HER2 subtypes, respectively ($p= 0.0131$).

Conclusions: The results of this study revealed a high percentage of HER2+ breast tumors and an increased rate of patients with TN tumors aged over 50 years. This emphasizes the need for establishing immunotherapy as an additional therapeutic option to improve clinical outcomes for patients with HER2+ tumors and to investigate the risk factors of TN breast cancer.

Keywords: Invasive breast cancer, molecular subtypes, therapeutic opportunities, population of African, European and Indigenous ancestry, Northeastern Brazil

Introduction

Breast cancer represents a molecular and cellular heterogeneous group of diseases with different clinical outcomes [1]. The gene expression profile revealed that the levels of Estrogen (ER), Progesterone (PR) hormone receptors (HR) and HER2 overexpression characterize tumors of different subtypes, including Luminal A (ER+ and/or PR+ and HER2-), Luminal B (ER+ and/or PR+ and HER2+), HER2 overexpressed (ER- PR- HER2+) and triple negative (TN; ER- PR- HER2-) breast cancer [2,3,4,5]. Subtypes have different prognostic values, and Luminal A and triple negative tumors show the best and worst outcomes, respectively [6- 9].

It is generally recognized that the risk factors affect the ER, PR and HER2 expression: Post-menopause state, high body mass index and increased height, were associated with positive PR tumors and breastfeeding period equal to or longer than seven months was negatively associated with TN breast cancer [10,11]. The increased frequency of positive ER breast tumors in African American, Hispanic and white women, was associated with changing incidence of obesity and parity [12]. There is considerable controversy regarding the role of ancestry in the etiology of breast cancer [13]. However, results of previous studies have indicated that variations of subtypes among populations of African, Asian and Caucasian ancestry have also a biological basis [14-16]. Americans of African ancestry have decreased incidence of breast cancer, but more frequently, they have aggressive, invasive high- grade TN tumors at younger age with increased mortality rate when compared to patients of Caucasian ancestry [13,15,17,18].

In Brazil, the ministry of health launched a public breast cancer- screening program in the year 2003 and recommended the participation of women aged 50- 69 years [19]. The public “Unified Health System” (Sistema Único de Saúde; SUS) is financing the screening program and also radiotherapy and chemotherapy for breast cancer patients. The Brazilian National

Institute of Cancer (INCA) expected 57,120 new cases for the year 2014 with an estimated risk of 56.09 cases per 100 thousand women [19]. In the Northeastern region of Brazil, mortality rates increased on average 5.3% every year in the last decade, while it declined slightly in other regions of the country [20]. The Brazilian population is aging and this demographic process is the combined result of increased life expectation, mainly in the Northern and Northeastern regions and decreased birth rates in the entire country [21]. Demographic development, changing lifestyle and associated risk factors may explain this drastic increase in the mortality rate observed in the Northeastern region. Biological factors could also contribute to differences observed. Populations from Southern Brazil have mainly Caucasian ancestry; while a mixed origin of African, European and Indigenous ancestry is characteristic of populations in the Northeastern region [22]. The availability of literature about breast cancer in Brazil is low [23]. To the present moment, few studies have focused on risk factors and breast cancer screening, whereas little is known about molecular breast cancer subtypes of different Brazilian populations. Patients of African ancestry had an increased frequency of TN breast cancer [24]. Another study including patients with undefined ancestry also reported increased incidence of the TN subtype [25].

The aim of the present study was to investigate the frequency of breast cancer subtypes in a population of Northeastern Brazil of mixed African, European and Indigenous ancestry. The objective was to analyze associated clinical and histopathological characteristics of subtypes and to investigate the currently applied therapies.

Methods

Data sampling

The data sampling protocol was reviewed and approved by the Brazilian National Research Ethics Committee (CONEP; Nr.: CEP-UEPB: 0239.0.133.000-12).

Registered data from pathological reports of medical records were obtained from the “Fundação de Assistência da Paraíba” (FAP) public hospital of Campina Grande, Paraíba, Brazil. Patients of the FAP hospital are representative for the state of Paraíba, with a population of mixed African, European and native Indigenous ancestry. Information about ancestry was obtained by the self-identification method. Patients were asked if they have European or any kind of mixed African, Indigenous and European ancestry.

Registered data were obtained from 633 female patients with confirmed diagnosis of invasive breast cancer. Data were sampled between March and November 2013. Data of *in situ* breast carcinoma were not sampled. Data from patients with incomplete immunohistochemistry analysis of hormone receptor and/or HER2/neu expression were excluded from the study. Only data from patients with complete immunohistochemistry analysis were sampled in the medical record. Furthermore, data obtained from secondary tumors or lymph node surrogates were also excluded from the sample. Data were exclusively obtained from primary tumors before application of any chemo or radiotherapy. Data of death cases were sampled from 2005 to 2008. Complete information about hormone receptor (ER and PR), HER2/neu status and Ki67 expression was obtained from 295 out of 633 patients. Data sampling included histological type of the primary tumor, its grade, size, hormonal receptor status (ER, PR), HER2/neu status, state of lymph nodes and presence or absence of distant metastases. Furthermore, data regarding age, menopause state and patients' ancestry were collected from pathological reports of medical records.

Tumor size and grading

Tumors were classified according to the WHO classification of breast tumors and graded with the Elston and Ellis (EE) histoprognotic grade [26]. Tumor size was categorized according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) as follows: T1: $\leq 2.0\text{cm}$; T2: $> 2.0\text{cm} \leq$

5.0cm; T3: > 5.0cm. Trained pathologists from two private laboratories performed the grading and immunohistochemistry assays of tumor specimens.

Immunohistochemistry

Her2/neu was scored from 0 to 3; 0 = no staining; score 1 = faint, partial membrane staining; score 2 = weak complete membrane staining in > 10% of cancer cells; score 3 = intense and complete membrane staining in > 10% of cancer cells. Cases of score 2 were analyzed with HER2/neu FISH. Her2 positive cases were defined as with immunohistochemistry scores greater than or equal to 2 and FISH positive. ER and PR positivity was defined as any positive nuclear staining in $\geq 1\%$ of tumor cells. Combinations of hormone receptor (ER, PR), HER2/neu status and Ki67 expression to define molecular breast cancer subtypes were used as follows: Luminal A: ER positive (ER+) and/or PR positive (PR+), Her2 negative (Her2-) with $Ki67 \leq 14\%$; Luminal B: ER positive (ER+) and/or PR positive (PR+) and Her2 positive (Her2+), and any Ki67; Luminal B: ER positive (ER+) and/or PR positive (PR+) and Her2 negative (Her2-), with $Ki67 > 14\%$; Her2 subtype: Her2 positive (HER2+), ER negative (ER-) and PR negative (PR-) with any kind of Ki67 expression; Triple negative (TN): ER negative (ER-), PR negative (PR-) and HER2 negative (HER2-) with any kind of Ki67 expression. There was no distinction between basal-like and normal-like TN tumor subtypes. Of the 295 data sets, 26 had unspecified molecular subtype with unknown ER, PR or HER2 expression status. These unspecified 26 samples were excluded. The remaining 269 sampled data sets were from years 2005 (N= 30), 2006 (N= 40), 2007 (N= 37), 2008 (N= 34), 2009 (N= 36), 2010 (N= 45) and 2011 (N= 47).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed on GraphPad Prism software version 6 (La Jolla, CA). Chi-Square (χ^2) and Fisher's exact test were applied to compare categorical variables.

ANOVA and the Kruskal- Wallis test were applied to compare patients' age. T-test was applied to compare pair-by-pair mean age. Cumulative survival probabilities were calculated through the Kaplan– Meier method. Survival rates were compared by log-rank (Mantel-Cox) test. Overall, five-year survival rate was calculated as the period from the year of diagnosis to the year of death from any cause.

Results

Registered data of breast cancer patients revealed 269 invasive primary tumors with known ER, PR and HER2 status that belonged to one of the four defined subtypes. Of these tumors, 179 (66.54%), 152 (56.51%) and 132 (49.07%) were positive for ER, PR and HER2, respectively. Overall, 185 (68.77%) and 84 (31.23%) patients had positive (HR+) and negative hormone receptor (HR-) tumors, respectively. When positive HR status was stratified according to age, there was no significant difference between patients aged ≤ 50 years (64.60%) and those aged > 50 years (74.07%) ($p= 0.1099$).

The majority of 120 (44.61%) tumors were Luminal B, 64 (23.79%) were Luminal A, 39 (14.50%) were HER2 and 46 (17.10%) were TN (Table 1). Patients had mean age of 55.36 ± 0.82 years and age ranged from 26 to 92 years (Table 1). The percentage of patient's aged 31 to 40 and 41 to 50 years varied from 7.69% (HER2) to 19.57% (TN) and from 10.87% (TN) to 38.33% (Luminal B), respectively ($p= 0.0046$; Table 1). Patients with tumors of Luminal A subtype had an increased mean age of 58.25 ± 1.827 years compared to 53.33 ± 1.153 years of those with tumors of Luminal B molecular subtype ($p= 0.0182$; Table 1). Pre-menopause state tended to be increased for patients with tumors of Luminal B (38.89%) and TN (33.33) molecular subtypes compared to those with tumors of Luminal A (22.73%) and HER2 (26.92%) subtypes (Table 1). However, none of these differences were significant. Information about ancestry was obtained from 197 out of 269 patients. Self-identification did

not lead to significant differences between molecular subtypes: Of 197 patients, 168 (85.28%) had Caucasian and 29 (14.72%) had mixed ancestry ($p= 0.7646$; Table 1).

The highest proportion (52.63%) of tumors ≤ 2 cm (T1) detected was Luminal A, and the lowest (22.73%) of TN subtype ($p= 0.0088$). Intermediate size tumors $> 2.0\text{cm} \leq 5.0\text{cm}$ (T2) were most frequent (70.45%) in the TN subtype (Table 2). The size category of Luminal B tumors was slightly and significantly different from TN tumors ($p= 0.0448$; Table 2). Lymph node status and presence or absence of metastases was not significantly different among subtypes (Table 2). However, the highest percentage (51.35%) of positive lymph node status was found in the group of patients with TN tumors (Table 2). High graded (G3) tumors were more frequent (35.29% and 34.28%) in HER2 and TN subtypes compared to Luminal A and Luminal B subtypes (3.92% and 12.62%), respectively, and in the case of low graded (G1) tumors, the opposite was observed ($p < 0.0001$; Table 2). Triple negative tumors showed the highest mean percentage of Ki67 expressing cells ($p < 0.0001$; Table 2).

Kaplan- Meier analysis of the five-year survival rate of Luminal A, Luminal B, HER2 and TN molecular subtypes were 92.86%, 84.75%, and the latter 75.00% each, respectively (HR: 0.260 to 1.015; 95%CI: 0.043 to 3.594; $p= 0.2589$; Figure 1).

Complete data for histological staging were available for 212 out of 269 breast tumors. The histological stage of tumors was not significantly different among subtypes ($p= 0.4960$; Table 3). TN subtype had a decreased rate of stage IA tumors (10.26%) and a comparable rate of stage IV tumors (20.51%) as Luminal A subtype (Table 3). Of the 269 patients, 260 received chemo, radio and/or hormone therapy in the hospital (Table 3). The chemotherapeutic regime included cyclophosphamide, doxorubicin and fluorouracil. Hormone therapy was based on tamoxifen and anastrozole. Patients with HER2+ tumors did not receive Trastuzumab or Pertuzumab- based immunotherapy. Patients with HER2 subtype tumors received preferentially chemotherapy (86.49%; $p= 0.0131$; Table 3). Among patients with TN breast cancer, 16 (37.21%) did not receive any chemotherapy (Table 3). The percentage of

patients who received radiotherapy varied from 79.03% to 97.67% for Luminal A and TN subtypes, respectively ($p= 0.0462$; Table 3). Hormone therapy was applied in 75.81% and 82.20% of patients with tumors of Luminal A and B subtypes, respectively ($p< 0.0001$; Table 3).

Discussion

Missing immunohistochemistry assays can be the result of advanced phase of the disease, excluding the advantage of any chirurgic intervention. Additionally, patients of the present study had to cover the costs of immunohistochemistry assays on their own as the public FAP hospital does not offer it and the public health system does not cover the cost of private laboratories. This may lead low-income patients not to afford for immunohistochemistry assays. Originally, 283 data sets with and without HR and HER2 expression status were obtained from years 2005 to 2008 including 63 (22.26%) death cases within five years. Immunohistochemistry assays were only available for 22 (34.92%) out of the 63 death cases. In view of the great amount of missing data, the bias effect on the survival analysis is very probable and incomplete information represents a general limitation of this retrospective study. Furthermore, the intergroup heterogeneity among patients with tumors of one of the four molecular subtypes may have accounted for statistical bias of clinical data analysis.

Previous studies have shown that patients with positive HR (ER+ and/or PR+) tumors of Luminal A subtype and a Ki67 index $> 14\%$ have poorer outcomes, compared to those with Ki67 index $\leq 14\%$ [27]. Furthermore, the outcome of Luminal A subtype with Ki67 index $> 14\%$, was comparable to HER2+ tumors of Luminal B subtype. For this reason, several studies classified Luminal A tumors with high expression of Ki67 as Luminal B subtype [27-29]. The present study identified Luminal B subtype as the most frequent subtype (44.61%). This result is similar to studies with Chinese and North-African populations that applied Ki67

index > 14% as criteria to distinguish Luminal A from Luminal B subtypes [28,29]. The study of El Fatemi (2012) identified Luminal B subtype for 41.01% of all cases studied [29]. The percentage of TN breast tumors observed (17.10%) was consistent with previous studies that revealed frequencies ranging from 9.00% to 30.60% for different populations [13,18,30-36].

Results revealed an extraordinary high percentage of HER+ tumors (49.07%), if compared to populations from Spain (19.50%), China (22.10% and 39.60%), Mali (18.00%), and Hispanic women living in the United States younger than 50 years of age (23.50%) [11,15,28,37,38]. Corresponding to this high percentage of HER2+ tumors, results revealed an increased frequency (14.50%) of HER2 subtype, compared to data obtained for Western Europe (5.2%), Western Africa (9.00%), Northern Africa (9.20%), China (9.0% and 13.70%), and Afro-American populations (10.10%) [11,15,28,29,37,38].

Consistent with other studies, patients aged ≤ 40 had an increased rate (19.57%) of TN tumors [13,18,34,39]. A high percentage of TN tumors belonged to age groups from 51 to 60 (26.09%) and > 60 (41.30%) years. Previous studies with Afro American and Hispanic women living in the US revealed that 29.50% and 19.40% of TN tumors, respectively, were detected in patients aged over 50 years [15]. Other studies with populations from Northern and Sub Saharan Africa revealed frequencies of 35.00% and 44.90% for patients aged over 50 years with tumors of basal-like subtype, respectively [39,40]. This means that the results of TN tumors indicated an extraordinary high percentage (67.39%) of patients aged over 50 years. In general, patients had mean age of 55.36 years, while previous studies reported a mean age of 51.5 and younger [15,39,40]. This could lead to a bias in the present data, increasing the rate of TN tumors towards older age groups.

Different studies have shown that patients with tumors of TN subtype had the lowest mean age [6,34]. In contrast, the present study revealed the lowest mean age of 53.33 years for Luminal B subtype. This was most obvious for the age group from 41 to 50 years, which

included 38.33% of all patients with tumors of Luminal B subtype. Other studies that have applied the Ki67 index to define the luminal subtype (A or B) have shown that the lowest mean age was not found for patients with TN tumors, but in those with luminal B tumors, and the highest mean age was found for patients with luminal A tumors [28,40]. Consistent with present results, the study of Xue and colleagues (2012) revealed the highest and lowest rate of pre-menopause state for Luminal B instead of TN and Luminal A subtypes, respectively [28].

There was no significant difference among subtypes as a function of ancestry, and many previous studies revealed associations between breast cancer subtypes and geographic origin of populations[13,15,17,39]. It is important to point out that self-identification does not necessarily reflect real ancestry. On the one hand, as the population is highly mixed, persons who identify themselves as Caucasian may also have African and/or Indigenous ancestry and vice versa. Therefore, the mixture of populations with different geographic origins may obscure biological differences between them. On the other hand, the present result has to be interpreted with care, as there was a very low number of patients with mixed ancestry and known HR, respectively, HER2 status (N= 29).

Recent studies have revealed that the increased tumor size of TN breast tumors was associated with decreased overall survival and increased recurrence rate [41,42]. Present data have indicated a significant increase in tumor size of TN breast cancer compared to Luminal A and B molecular subtypes. This increase was mainly due to a high rate of intermediate size tumors $> 2.0\text{cm} \leq 5.0\text{cm}$ (T2: 70.45%) and a decrease rate of small size tumors $\leq 2.0\text{cm}$ (T1: 22.73%) compared to Luminal A and B subtypes. This result is consistent with previous findings that attributed increased tumor size of TN subtype also to low and high rates of T1 and T2 categories, respectively [15,36,40].

Present data about lymph node status and distant metastases did not indicate a clear difference between TN tumors and other subtypes. Similarly, previous studies did not identify

a clear association between TN subtype and lymph node status or distant metastasis [27,37,42,43]. Several studies revealed the lowest (34.00%- 52.40%) and highest percentage (56.00%- 86.70%) of positive lymph node status for Luminal A and HER2 molecular subtypes, respectively [13,28,29]. In contrast, another study with Afro-American and Hispanic women revealed the highest percentage (60.20%) of positive lymph node status for TN molecular subtype [15]. Present results also revealed the highest percentage (51.35%) of positive lymph node status for TN molecular subtype. Differences among the other three molecular subtypes were small. Therefore, increased positive lymph node status of the TN subtype could indicate a real biological difference, whereas a sampling artifact, due to the low number of data, may obscure further differences among molecular subtypes.

Tumors of HER2 and TN subtypes were higher graded (G3: 35.29% and 34.28%) than those of Luminal A and B subtypes (G3: 3.92% and 12.62%). Additionally, TN tumors had on average a high index of Ki67 positive cells (50.38%), which is associated with increased aggressiveness of TN breast tumors [44]. A high grade and proliferation rate of TN tumors has been reported in many previous studies [15,28,37,42,43]. In the case of HER2 subtype, this relationship is not so clear: Some studies have revealed a higher grade of HER2 subtype compared to Luminal A and B tumors [28,45], but other studies did not identify this relationship [15,40].

The Brazilian public health system does not cover immunotherapy costs for HER2 positive breast cancer. This may explain the high percentage of patients with HER2 positive breast tumors who received chemotherapy (86.49%). Brazilian health centers, with few exceptions in cities like São Paulo and Rio de Janeiro, also do not offer tests for breast cancer patients to analyze the potential benefit of chemotherapy. In the present study for example, at least 128 (47.58%) out of 269 patients had invasive stage I or II tumors smaller than five centimeters in size with less than four metastasized lymph nodes. They would have been eligible for the MammaPrint test [46,47].

Advanced stages of the disease or age could advocate against chemotherapeutic intervention. Among the 16 (37.21%) TN breast cancer patients who did not receive chemotherapy, only three had stage IV, 13 had stage IA, IIA or IIB breast cancers and only five of these aged over 50 years. As chemotherapy is one of the few therapeutic options for TN breast cancer, it remained unclear why all these patients received radiotherapy and no chemotherapy. Similarly, it was not clear why 15 (24.19%) and 21 (17.80%) patients with positive HR breast tumors of Luminal A and B molecular subtypes did not receive hormone therapy.

Conclusions

The application of the Ki67 index $> 14\%$ as criteria to distinguish Luminal A from Luminal B molecular subtypes lead to an increased frequency of Luminal B breast cancer. Furthermore, patients with tumors of Luminal B molecular subtype had the lowest mean age. These results of breast cancer patients in Northeastern Brazil were consistent with previous studies with populations from China and Northern Africa that also applied the Ki67 index $> 14\%$ as criteria. Comparable to previous findings, tumors of TN molecular subtype were also higher graded, had high Ki67 expression index and increased size compared to breast tumors of Luminal A and B molecular subtype.

In contrast to studies with other populations, the present results revealed a high rate of patients with TN tumors aged over 50 years. To date, there are no studies about the risk factors that increase the frequency of TN breast cancer in populations from Northeastern Brazil. Future studies should aim on the identification of such potential risk factors. This could help to improve ongoing prevention programs to reduce the incidence of this aggressive form of breast cancer. Furthermore, data indicated an increased frequency of patients with positive HER2 and high graded tumors of HER2 molecular subtype, respectively. These

patients did not receive immunotherapy. This emphasizes the need to improve positive HER2 breast cancer treatment in Northeastern Brazil through the application of immunotherapy as additional therapeutic option. Therapeutic opportunities could also be further improved through the application of tests with molecular markers to predict the benefits of chemotherapy.

List of abbreviations used

ER: estrogen receptor; HR: hormone receptor; PR: progesterone receptor; TN: triple negative.

Competing interests

The authors declare that they have no interests that compete with any of the contents of the manuscript.

Authors' contributions

AA, CJ, BG, AB and GS equally contributed to conception, data acquisition and critical review of the manuscript. MW participated in the study design and manuscript draft.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Hospital da Fundação de Assistência da Paraíba (FAP) public Hospital of Campina Grande, Paraíba, Brazil.

References

1. Rakha EA: **Pitfalls in outcome prediction of breast cancer**. *J Clin Pathol* 2013, **66**:458-464.
2. Cancer Genome Atlas Network: **Comprehensive molecular portraits of human breast tumors**. *Nature* 2012, **490**:61-70.
3. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL and Botstein D: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets**. *PNAS* 2003, **100**: 8418–8423.
4. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M and Delorenzi M: **Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures**. *Breast Cancer Research* 2008, **10**: R65.
5. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffreyk SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge Ø, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D: **Molecular portraits of human breast tumors**. *Nature* 2000, **406**:747-752.

6. Cadoo KA, Fornier MN, Morris PG: **Biological subtypes of breast cancer: Current concepts and implications for recurrence patterns.** *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2013, **57**:312-321.

7. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, Cheang MC: **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.** *PlosMedicine* 2010, **7**:e1000279.

8. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO: **Combinatorial biomarker expression in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**:293–308.

9. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN: **Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival.** *Clin Med Res* 2009, **7**(1-2):4-13.

10. Rosner B, Glynn RJ, Tamimi RM, Chen WY, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE: **Breast Cancer Risk Prediction with Heterogeneous Risk Profiles According to Breast Cancer Tumor Markers.** *Am J Epidemiol* 2013, **178**(2):296-308.

11. Redondo CM, Gago- Domínguez M, Ponte SM, Enguix Castelo M, Jiang X, Alonso García A, Peña Fernández M, Ausencia Tomé M, Fraga M, Gude F, Martínez ME, Muñoz Garzón V, Carracedo A, Castelao JE: **Breast Feeding, Parity and Breast Cancer Subtypes in a Spanish Cohort.** *PloS ONE* 2012, **7**:e40543.

12. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A: **Breast cancer statistics 2013**. *CA Cancer J Clin* 2014, **64**(1):52-62.
13. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MCU, Nielsen TO, Moorman PG, Shelton Earp H, Millikan RC: **Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study**. *JAMA* 2006, **295**: 2492–502.
14. Ambrosone CB, Young AC, Sucheston LE, Wang D, Yan L, Liu S, Tang L, Hu Q, Freudenheim JL, Shields PG, Morrison CD, Demissie K, Higgins MJ: **Genome-wide methylation patterns provide insight into differences in breast tumor biology between American women of African and European ancestry**. *Oncotarget* 2014, **5**:237-248.
15. Wu Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV: **Triple Negative Breast Tumors in African-American and Hispanic/Latina Women Are High in CD44+, Low in CD24+, and Have Loss of PTEN**. *PloS ONE* 2013, **8**: e78259
16. Chen M, Xu R, Turner JW, Warhol M, August P, Lee P: **Race and the molecular origins of breast cancer in Chinese women: breast cancer in Chinese women**. *Ann Surg Oncol* 2012, **19**:4085-4093.
17. Clarke CA, Keegan THM, Yang J, Press DJ, Kurian AW, Patel AH, Lacey Jr JV: **Age-**

Specific Incidence of Breast Cancer Subtypes: Understanding the Black–White Crossover. *JNCI* 2012, **104**: 1094-1101.

18. O'Brien KM, Cole SR, Tse CK, Perou CM, Carey LA, Foulkes WD, Dressler LG, Geradts J, Millikan RC: **Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study.** *Clin Cancer Res* 2010, **24**:6100-6110.

19. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil[<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>]

20. Freitas-Junior R, Reis Gonzaga CM, Aires Freitas NM, Martins E, de Cássia de Maio Dardes R: **Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009.** *Clinics* 2012, **67**: 731-737.

21. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de indicadores sociais 2010
[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicadores2010/SIS_2010.pdf]

22. Salzano FM, Bortolini MC: ***The evolution and genetics of Latin American populations.*** New York: Cambridge University Press; 2002.

23. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE: **Breast cancer in Brazil: present status and future goals.** *Lancet Oncol* 2012, **13**:e95-e102.

24. Brito Corrêa P, Pereira Toralles MB, Abe-Sandes K, Bonfim Machado TM, Ferreira Bonfim T, Meyer L, Abe-Sandes C, Nascimento R: **Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana.** *Rev Ci Med Biol* 2010, **9**(Supl.1):3-7.

25. Viegas de Carvalho L, Pereira EM, Frappart L, Boniol M, Marques Bernardo W, Tarricone V, Tavtigian S, Southey MC: **Molecular characterization of breast cancer in young women.** *Rev Assoc Med Bras* 2010; **56**(3): 278-87.

26. Elston CW, Ellis IO: **Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.** *Histopathology* 1991, **19**: 403-410.

Hahn WC, Weinberg RA. **Rules for making human tumor cells.** *N Engl J Med.* 2002;347(20):1593-603.

27. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO: **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** *J Natl Cancer I* 2009, **101**:736–750.

28. Xue C, Wang X, Peng R, Shi Y, Qin T, Liu D, Teng X, Wang S, Zhang L and Yuan Z:

Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China. *Cancer Sci* 2012, **103**:1679–1687.

29. El Fatemi H, Chahbouni S, Jayi S, Moumna K, Melhouf MA, Bannani A, Mesbahi O, Amarti A: **Luminal B tumors are the most frequent molecular subtype in breast cancer of North African women: an immunohistochemical profile study from Morocco.** *Diagnostic Pathology* 2012, **7**:170.

30. Amadori D, Serra P, Bravaccini S, Farolfi A, Puccetti M, Carretta E, Medri L, Nanni O, Tumedei MM, Kahima J, Masalu N: **Differences in biological features of breast cancer between Caucasian (Italian) and African (Tanzanian) populations.** *Breast Cancer Res Treat*, in press.

31. Preat F, Simon P and Noel Preat JC: **Differences in breast carcinoma immunohistochemical subtypes between immigrant Arab and European women.** *Diagnostic Pathology* 2014, **9**:26.

32. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, EysteinLønning P and Børresen-Daleb: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**: 10869–10874.

33. Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T et al: **The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races.** *Breast* 2007, **16**(Suppl 2): 72–77.
34. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V: **Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry.** *Cancer Am Cancer Soc* 2007, **109**: 1721–1728.
35. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D: **Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer.** *J Clin Oncol* 2006, **24**:5652–5657.
36. Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. **Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes.** *Hum Pathol* 2006, **37**:1217–1226.
37. Su Y, Zheng Y, Zheng W, Gu K, Chen Z, Li G, Cai Q, Lu W and Shu XO: **Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women: a population-based cohort study.** *BMC Cancer* 2011, **11**:292.
38. Ly M, Antoine M, Dembélé AK, Levy P, Rodenas A, Touré BA, Badiaga Y, Dembélé BK, Bagayogo DC, Diallo YL, Koné AA, Callard P, Bernaudin JF, Diallo DA: **High incidence of**

triple-negative tumors in sub-saharan Africa: a prospective study of breast cancer characteristics and risk factors in Malian women seen in a Bamako university hospital.

Oncology 2012, **83**(5):257-63.

39. Agboola AJ, Musa AA, Wanangwa N, Abdel-Fatah T, Nolan CC, Ayoade BA, Oyebadejo TY, Banjo AA, Deji-Agboola AM, Rakha EA, Green AR, Ellis IO: **Molecular characteristics and prognostic features of breast cancer in Nigerian compared with UK women.** *Breast Cancer Res Treat* 2012, **135**:555-569.

40. Salhia B, Tapia C, Ishak EA, Gaber S, Berghuis B, Hussain KH, Duquette RA, Resau J and Carpten J: **Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology.** *BMC Women's Health* 2011, **11**:44.

41. Steward L, Conant L, Gao F, Margenthaler JA: **Predictive Factors and Patterns of Recurrence in Patients with Triple Negative Breast Cancer.** *Ann Surg Oncol*, in press.

42. Yuan N, Meng M, Liu C, Feng L, Hou L, Ning Q, Xin G, Pei L, Gu S, Li X and Zhao X: **Clinical characteristics and prognostic analysis of triple-negative breast cancer patients.** *Mol Clin Oncol* 2014, **2**: 245-251.

43. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, Blayney DW, Niland JC, Winder EP, Weeks JC: **Clinicopathologic features, patterns of recurrence,**

and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2012, **118**: 5463-5472.

44. Sugianto J, Sarode V, Peng Y: **Ki-67 expression is increased in p16-expressing triple-negative breast carcinoma and correlates with p16 only in p53-negative tumors.** *Hum Pathol* 2014, **45**(4):802-809.

45. Taucher S, Rudas M, Mader RM, Gnant M, Dusky P, Bachleitner T, Roka S, Fitzal F, Kandioler D, Sporn E, Friedl J, Mittlböck M, Jakesz R: **Do we need HER-2/neu testing for all patients with primary breast carcinoma?** *Cancer* 2003, **98**:2547-2553.

46. Cusumano PG, Generali D, Ciruelos E, Manso L, Ghanem I, Lifrange E, Jerusalem G, Klaase J, de Snoo F, Stork-Sloots L, Dekker-Vroling L, Holzik ML: **European inter-institutional impact study of MammaPrint.** *Breast*, in press.

47. Drukker CA, van den Hout HC, Sonke GS, Brain E, Bonnefoi H, Cardoso F, Goldhirsch A, Harbeck N, Honkoop AH, Koornstra RHT, van Laarhoven HWM, Portielje JEA, Schneeweiss A, Smorenburg CH, Stouthard J, Linn SC, Schmidt MK: **Risk estimations and treatment decisions in early stage breast cancer: Agreement among oncologists and the impact of the 70-gene signature.** *European Journal of Cancer* 2014, **50**:1045–1054.

Table 1. Molecular breast cancer subtypes by frequency and characteristics of patients
(Total number N= 269).

	Luminal A		Luminal B		HER2/neu		TN		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
	64	23.79	120	44.61	39	14.50	46	17.10	
Age categories									
≤ 30	4	6.25	1	0.83	1	2.56	1	2.17	0.0046
31-40	5	7.81	14	11.67	3	7.69	9	19.57	
41-50	10	15.63	46	38.33	8	20.51	5	10.87	
51-60	16	25.00	27	22.5	11	28.21	12	26.09	
> 60	29	45.31	32	26.67	16	41.03	19	41.30	
Mean age in years¹									
	58.25 ± 1.827		53.33 ± 1.153		56.59 ± 2.054		55.63 ± 2.025		0.1075
Menopause state									
Pre	10	22.73	28	38.89	7	26.92	10	33.33	0.3027
Post	34	77.27	44	61.11	19	73.08	20	66.67	
Missing	20		48		13		16		
Ancestry									

Mixed	8	16.00	14	15.73	4	16.67	3	8.82	0.7646
Caucasian	42	84.00	75	84.27	20	83.33	31	91.18	
Missing	14		31		15		12		

¹Pair wise comparison of Luminal A and Luminal B: p= 0.0182

Table 2. Molecular breast cancer subtypes by tumor histopathology (Total number N= 269).

	Luminal A		Luminal B		HER2/neu		TN		p
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Tumor size, cm (T category; T1: ≤ 2.0cm; T2: > 2.0cm ≤ 5.0cm; T3: > 5.0cm)¹									
T1	32	52.46	49	41.88	14	35.90	10	22.73	0.0803
T2	26	42.62	57	48.72	22	56.41	31	70.45	
T3	3	4.92	11	9.40	3	7.69	3	6.82	
Missing	3		3		0		2		
Lymph node status									
Positive	22	43.14	41	40.20	13	41.94	19	51.35	0.7067
Negative	29	56.86	61	59.80	18	58.06	18	48.65	
Missing	13		18		8		9		
Distant metastases									
Positive	9	16.36	14	12.73	6	18.18	8	17.78	0.7922

Negative	46	83.64	96	87.27	27	81.82	37	82.22	
Missing	9		10		6		1		
Histological grade									
Low (G1)	11	21.57	14	13.59	1	2.94	1	2.86	< 0.0001
Inter. (G2)	38	74.51	76	73.79	21	61.77	22	62.86	
High (G3)	2	3.92	13	12.62	12	35.29	12	34.28	
Missing	14		17		5		11		
Ki67 positive cells (%)									
Mean	6.05		36.71		36.43		50.38		< 0.0001
	± 0.467		± 1.819		± 4.120		± 4.691		

¹Pair wise comparison of Luminal A and TN: p= 0.0088; Luminal B and TN: p= 0.0448.

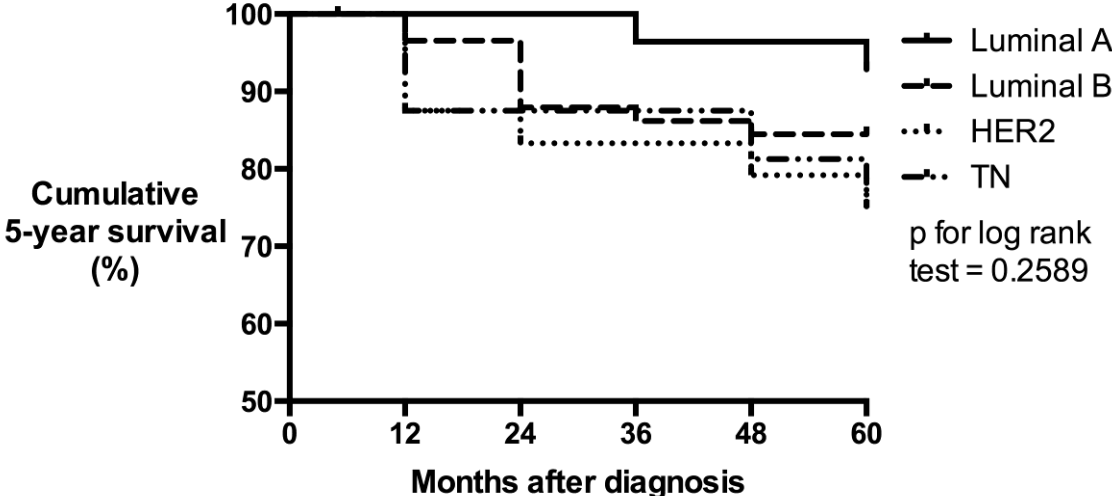
Table 3. Molecular breast cancer subtypes by histological stage and applied therapies (Total number N= 212).

	Luminal A		Luminal B		HER2		TNBC		p
	(N= 64)		(N= 120)		(N= 39)		(N= 46)		
	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	
	Stage								
IA	12	26.67	29	29.29	6	20.69	4	10.26	0.4960

IIA	13	28.89	34	34.35	7	24.14	14	35.90	
IIB	8	17.78	16	16.16	9	31.03	10	25.64	
IIIA	2	4.44	6	6.06	1	3.45	3	7.69	
IIIC	1	2.22	-	-	1	3.45	-	-	
IV	9	20.00	14	14.14	5	17.24	8	20.51	
Total	45		99		29		39		
n/a	19		21		10		7		
Adjuvant Chemotherapy									
Yes	34	54.84	72	61.02	32	86.49	27	62.79	0.0131
No	28	45.16	46	38.98	5	13.51	16	37.21	
Radiotherapy									
Yes	49	79.03	99	83.90	33	89.19	42	97.67	0.0462
No	13	20.97	19	16.10	4	10.81	1	2.33	
Hormone Therapy									
Yes	47	75.81	87	82.20	-	-	-	-	<0.0001
No	15	24.19	21	17.80	37	100.0	43	100.0	
n/a	2		2		2		3		

n/a= not available

Figure 1. Cumulative five-year survival by molecular subtype in 127 breast cancer patients of years from 2005 to 2008.



3.2 ARTIGO B

Reproductive risk factors differ among breast cancer patients and controls in a public hospital of Paraíba, Northeast Brazil

Gibran Sarmiento de Almeida¹, Layze Amanda Leal Almeida², Gilmar Marques Rodrigues Araújo³, Mathias Weller¹

¹Programa de pós- graduação em Saúde Pública, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, Brasil

²Serviço de Oncologia do Hospital da Fundação de Assistência da Paraíba (FAP), Campina Grande, Paraíba, Brasil

³Serviço de Radioterapia do Hospital da Fundação de Assistência da Paraíba (FAP), Campina Grande, Paraíba, Brasil

Corresponding author

Prof. Dr. Mathias Weller

Programa de pós- graduação em Saúde Pública. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).
Rua Juvêncio Arruda, S/N Campus Universitário (Bodocongó).

CEP. 58.109 – 790 Campina Grande, Paraíba, Brasil

Tel.: (0055)-83-9941-8090; (0055)-83-3333-1045

mathiasweller@uepb.edu.br

Abstract

The incidence and mortality rates of breast cancer in Northeast Brazil are increasing and little is known about prevailing reproductive factors contributing to this increase. A case-control study was conducted in a public hospital of Campina Grande, state of Paraíba. The study included 81 women with diagnosed invasive breast cancer and 162 age matched (± 5 years) controls. Binominal logistic regression analysis was applied to estimate odds ratio (OR) and confidence intervals (CI) of risk factors. In this model, age at menarche ≤ 12 (OR= 2.120; CI: 1.043- 4.308; $p= 0.038$), single child (OR=3.748; CI: 1.459- 9.627; $p= 0.06$) and reproductive period > 10 years (OR= 3.042; CI: 1.421- 6.512; $p= 0.04$) were identified as independent variables that significantly increased breast cancer risk of parous women. Compared to parous women who never practised breastfeeding, total breastfeeding time > 24 months decreased the risk of breast cancer (OR=0.258; CI: 0.084- 0.787; $p= 0.017$). The results indicated that modifiable reproductive factors contribute to breast cancer risk in women included in the present study. Women's knowledge about factors such as the protective effect of breastfeeding could reduce the risk of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, epidemiology, reproduction, risk factors, Northeast Brazil

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy and the leading cause of cancer-related death among women worldwide (Jemal et al., 2011; Benson and Jatoi, 2012; Youlden et al., 2012; Ferlay et al., 2013). Due to prolonged life expectation and lifestyle changes, the global incidence of breast cancer is progressively shifting from developed to developing countries (Benson and Jatoi, 2012; Formenti et al., 2012; Ferlay et al., 2013).

In Brazil, the National Institute of Cancer (INCA) expected 57,120 new cases of breast cancer for the year 2014 (INCA, 2014). In the years between 2012 and 2014, the incidence of breast cancer increased from 52 to 56 cases per 100 thousand women (INCA, 2012; INCA, 2014). In Brazil, the North-eastern region shows the highest increase of breast cancer (INCA, 2012; INCA, 2014). The mortality rate of breast cancer decreased and stabilized between the years 1994 and 2009 in the South-eastern and Southern regions of Brazil, respectively, whereas it increased 5.3% in the North-eastern region (Freitas-Junior et al., 2012). Increased life expectation and low mammography coverage may contribute to increase the incidence and mortality rate in this region (Viacava et al., 2009; Gebrim et al., 2006; IGBE, 2014). Furthermore, the register praxis of breast cancer in hospitals may have been improved.

Factors such as lifestyle and reproductive patterns may also increase the risk of breast cancer in North-eastern Brazil (Paiva et al., 2002; Souza-Pinho et al., 2007; Leite de Lima et al., 2008; Inumaru et al., 2012). It has been well established in literature that modified reproductive patterns towards delayed childbearing, low parity and short breastfeeding time increase the risk of breast cancer (Balasubramaniam et al., 2013; Hartz and He, 2013; Li et al., 2013; Hosseinzadeh et al., 2014; Lee et al., 2014; Namiranian et al., 2014; Yeo et al., 2014;). Previous studies have also shown a positive association between risk of breast cancer and early age at menarche and older age at menopause (Ghiasvand et al., 2012; Islam et al., 2012; Bhadoria et al., 2013; Tazhibi et al., 2014; Yeo et al., 2014).

Lifestyle-related characteristics such as overweight, obesity, increased body mass index (BMI) and lack of physical exercise have also been identified as risk factors that may increase the risk of breast cancer (Lodha et al., 2011; Alegre et al., 2013; Hartz and He, 2013; Kann et al., 2014; Namiranian et al., 2014; Yeo et al., 2014). Alcohol consumption and smoking were also positively associated with increased risk of breast cancer (Hosseinzadeh et al., 2014; Namiranian et al., 2014; Qian et al., 2014; Yeo et al., 2014). The consumption of

fruits was identified to have a protective effect, while poor dietary habits and use of oils with predominant saturated fats were associated with increased risk of breast cancer (Alegre et al., 2013; Balasubramaniam et al., 2013; Hosseinzadeh et al., 2014; Yeo et al., 2014). Dietary patterns can also have protective effects: A recent study has shown decreased risk of breast cancer among women who make use of Spanish Mediterranean diet, with a more pronounced protective effect against triple-negative breast cancer compared to other molecular subtypes (Castelló et al., 2014). Finally, family history of breast cancer, history of abortion and oral contraceptive use were also associated with increased risk of breast cancer (Islam et al., 2012; Yanhua et al., 2012; Bhadoria et al., 2013; Elkum et al., 2014; Hosseinzadeh et al., 2014; Tazhibi et al., 2014).

Previous case- control studies with Brazilian populations have shown that diet, family history, physical activity, overweight, use of oral contraceptives and reproductive factors are breast cancer risk factors (Tessaro et al., 2001; Vasconcelos et al., 2001; Paiva et al., 2002; Pietro et al., 2007; Lima et al., 2008; Inumaru et al., 2012). Other studies without control groups and statistical analysis identified diet, family history, physical activity, overweight, use of oral contraceptives, reproductive factors, alcohol, age and socio-economic status as risk factors (Lima et al., 2001; Scowitz et al., 2005; Souza- Pinho et al., 2007; Silva et al., 2009; Matos et al., 2011 and 2010). It is notable that nearly all of these studies referred to data from populations of the Southern, South- eastern and Midwestern regions of the country. To our best knowledge there exist only two studies about risk factors of breast cancer carried out in Northeast Brazil: One exception is a case- control study on diet and other risk factors of breast cancer performed in João Pessoa, capital of the state of Paraíba, Brazil (Lima et al., 2008). Furthermore, in the year 1993, Kalache and colleagues performed a case-control study on reproductive risk factors of breast cancer patients in Fortaleza and Recife, capitals of the states of Ceará and Pernambuco, respectively (Kalache et al., 1993).

Despite the ongoing screening mammography program and the increasing incidence and mortality rate of breast cancer in North- eastern Brazil, little is known about prevailing risk factors of the disease in populations of this region. Furthermore, there are no studies on breast cancer risk factors of populations from the hinterland of this region. In the state of Paraíba, the mortality rate due to breast cancer increased about 11.9% during the last decade (Freitas- Junior et al., 2012). In the present case-control study, several reproductive risk factors were analysed in a population from the hinterland state of Paraíba. The aim of this study was to identify main risk factors of breast cancer and to compare results with studies on populations from other regions of Brazil and other countries.

Methods

Study population and data collection

The data sampling protocol was reviewed and approved by the Brazilian National Research Ethics Committee (CAAE plataforma Brasil: 22358113.1.0000.5187). Written informed consent was obtained for this study from each participant. Participants were eligible if diagnosed within 24 months from recruitment with invasive breast cancer and aged 18 years or older. A structured questionnaire was applied for the interview and height and weight were measured to determine the body mass index. Breast cancer patients and controls were interviewed between March and November 2014. The study included 81 women with invasive operable breast cancer diagnosed and treated between 2012 and 2014. Data from breast cancer patients were obtained from the chemotherapy and radiotherapy units of the “Fundação de Assistência da Paraíba” public hospital (FAP) in Campina Grande, Paraíba, Brazil. The FAP hospital is a reference hospital of the region that receives mainly low-income patients. Campina Grande is located in the hinterland of this state, about 120km away from the state capital, João Pessoa, with a population of about 385.276 (2010) inhabitants (IGBE, 2014).

For each case, two controls were included in the study. All 162 controls were free of any type of cancer, heart disease or diabetes. They were randomly recruited from public health service centres of Campina Grande. Most of the controls recruited from public health service centres sought these services because they caught cold, were treated for fractures or sprains, back pain, and other diseases such as skin, eye, laryngological.

Statistical analyses

Data were age adjusted: For each patient, two controls of same age (± 5 years) were sampled. Chi-Square (χ^2) test and T-test were performed on GraphPad Prism[®] software version 6 (La Jolla, CA). Chi-Square (χ^2) test was applied to compare categorized variables.

T-test was applied to compare continuous parametric variables of age, obesity and weight.

Binominal logistic regression was performed using SPSS STATISTICS™ software (SPSS; IBM company; version 17). Significant variables of univariate regression analysis were used for binominal regression modeling. Variables with significance level less than 0.2 in the univariate analysis were entered to the model. Then, variables with significance level less than 0.05 were kept in the model. Backward selection method was used when significant variables in the model were selected. The final model was tested for fitness using the Hosmer- Lemeshow goodness of fit test. Results were presented as adjusted odd ratios (OR), 95% confidence interval (CI) and p value.

Results

Results of lifestyle risk factors, age and income, compared between breast cancer patients and the control group were summarized in Table 1. The mean age of breast cancer patients and control group was 53.32 (s= 11.22) and 53.03 (s= 10.67) years, respectively (Table 1). There was no significant difference of age, body mass index, weight, physical activity, smoking, alcohol consumption and income between breast cancer patients and control group (Table 1).

The odds ratios for breast cancer according to the presence of reproductive risk factors were summarized in Table 2. Risk of breast cancer was 1.680 higher (95% CI: 0.947- 2.980) for women aged ≤ 12 at menarche ($p= 0.076$; Table 2). If exclusively the 216 parous women were considered, odds ratio increased significantly to 2.057 (95% CI: 1.111- 3.808; $p= 0.022$; Table 2). Parity also showed significant effect on the risk of breast cancer: Compared to women with ≥ 2 children, nulliparity was associated with a 2.662 times higher risk of breast cancer (95% CI: 1.173- 6.041; $p= 0.019$; Table 2). Women aged ≥ 30 years at first gestation showed 2.8 times higher risk of breast cancer compared to the reference group aged ≤ 20 years (95% CI: 0.984- 7.965; $p= 0.054$; Table 2). Similarly, women aged ≥ 40 years at last gestation showed a 2.5 times higher risk of breast cancer compared to those aged < 30 years at last gestation (95% CI: 0.922- 6.778; $p= 0.072$). Reproductive period > 10 years increased 1.826 times the risk of breast cancer (95% CI: 0.973- 3.426; $p= 0.061$; Table 2). Breast feeding had a significant protective effect on the risk of breast cancer: Women with total breastfeeding time > 24 months showed decreased odds ratio of 0.308 (95% CI: 0.12- 0.847), compared to parous women who had never practised breastfeeding ($p= 0.022$; Table 2). Positive menopause status of 157 women was associated with a 1.605 times increased

risk of breast cancer (95% CI: 0.901- 2.858; $p= 0.108$). If only the 216 parous women were considered, odds ratio for positive menopause status was 1.735 (95% CI: 0.922- 3.266; $p= 0.088$; Table 2).

A binominal logistic regression model identified number of children, reproductive period, age at menarche and total breastfeeding time as independent variables that significantly increased the risk of breast cancer (Table 3). The model correctly classified 73.10% of cases. Women aged ≤ 12 years at menarche showed 2.12 times higher risk of breast cancer (95% CI: 1.043- 4.308) compared to those aged > 12 years ($p= 0.038$; Table 3). The risk of breast cancer among women with one child was 3.748 times higher compared to those with two or more children (95% CI: 1.459- 9.627; $p= 0.006$; Table 3). Reproductive period > 10 years led to 3.042 times higher risk of breast cancer (95% CI: 1.421- 6.512; $p= 0.004$; Table 3). Breastfeeding time > 24 months led to decreased odds ratio of 0.258 (95% CI: 0.084- 0.787), compared to parous women who had never practised breastfeeding ($p= 0.017$; Table 3).

Discussion

Hormonal changes triggered by hormones chorionic gonadotropin, progesterone and estrogen modify proliferation and differentiation of breast tissues during pregnancy, breastfeeding and also at menarche (Kobayashi et al., 2012). Early age at menarche is believed to increase the risk of breast cancer due to the increased number of mammary stem cells that accumulate DNA damage since initiation of pupertal development (Kobayashi et al., 2012). Results of the present study revealed that age at menarche ≤ 12 was an independent risk factor. Parous women aged ≤ 12 at menarche were more than 2 times likely to have increased risk of breast cancer. There is an agreement with previous studies that revealed a positive association between early age at menarche and risk of breast cancer (Bhadoria et al., 2013; Li et al., 2013; Yeo et al., 2014). In contrast, two studies from Malaysia and Brazil showed that early age at menarche did not significantly contribute to increased risk of breast cancer (Mohd Razif et al., 2011; Lima et al., 2008).

Parity is one of the most well- established modifiable factors involved in breast cancer in women (Albrektsen et al., 2005). The risk of women aged over 25 years is immediately increased after parturition due to inflammatory processes that occur in breast tissues during postpartum involution (Albrektsen et al., 2005; Kobayashi et al., 2012). Despite this initial increase, the overall life- time risk of parous women remains significantly reduced

(Albrektsen et al., 2005). A recent study indicated that pregnancy induces the differentiation of mammary stem and progenitor cells by the down-regulation of *Notch* and *Wnt* signalling (Meier-Abt et al., 2013). This in turn, may protect against malignancy of undifferentiated cells. Present results indicated a significant contribution of nulliparity and low number of children in increasing the risk of breast cancer. Furthermore, parity was identified as an independent variable of a logistic regression model. Recent studies from Asian and European countries, middle east and USA also identified low parity or nulliparity as an independent risk factor of breast cancer (Mohd Razif et al., 2011; Ghiasvand et al., 2012; Islam et al., 2012; Li et al., 2012; Yanhua et al., 2012; Balasubramaniam et al., 2013; Hartz and He, 2013; Li et al., 2013; Mousavi et al., 2013; Lee et al., 2014; Namiranian et al., 2014; Surdyka et al., 2014). Similarly, a previous study from North-eastern Brazil associated low parity with increased risk of breast cancer (Kalache et al., 1993). In contrast, a study carried out in João Pessoa including 89 cases of breast cancer and 94 controls did not show significant association between parity and breast cancer (Lima et al., 2008).

Results of the present study indicated that reproductive period of more than 10 years significantly contributed as independent variable to increase the risk of breast cancer. This is in agreement with studies from Finland, which showed that prolonged time interval between first and last childbirth increased the risk of breast cancer (Hinkula et al., 2001; Kauppila et al., 2012). A recent study revealed that the prolonged reproductive period of breast cancer patients was associated with increased T- class and metastasis formation (Mousavi et al., 2013).

Breastfeeding represents one of the most well- established protective factors of breast cancer (Ursin et al., 2005; Ip et al., 2007). In a meta-analysis of 47 studies carried out worldwide, the protective effect of breastfeeding on breast cancer was reported for pre and postmenopausal women (Colaborative group, 2002). It has been hypothesized that breastfeeding performs its protective effect through differentiation of breast tissues and reduction of the lifetime number of ovulatory cycles (França-Botelho et al., 2012). To our best knowledge this is the first time that breastfeeding was identified as a modifiable risk factor of breast cancer in a Brazilian population. Present results indicated that the protective effect of breastfeeding represented an independent variable. Women who had practised breastfeeding for more than 24 month had an odds ratio of 0.258, compared to parous women who never practised it. This is in agreement with recent studies of different populations that also revealed a protective effect of breastfeeding and the independency of this variable in logistic regression models (Lodha et al., 2011; Li et al., 2012; Yanhua et al., 2012; Bhadoria et al., 2013 Elkum et al., 2014; Hosseinzadeh et al., 2014). In another study,

total breastfeeding time was significantly different between controls and breast cancer patients, but represented a dependent variable (Hartz and He, 2013). Studies from Spain and the USA also revealed a specific protective effect of breastfeeding on the aggressive type of triple negative breast cancer (TNBC; Redondo et al., 2012; Li et al., 2013).

Older age at first or last gestation increased the risk of breast cancer among women in the present study. However, this contribution was not significant and did not represent an independent variable. Similarly, age at first childbirth was not identified as a factor that significantly contributed to increase the risk of breast cancer in 89 women from João Pessoa, North-eastern Brazil (Lima et al., 2008). In contrast, Kalache and colleagues (1993) identified that both, older age at first and last childbirth increased the risk of breast cancer in women from North-eastern Brazil. The latter study included 509 cases of breast cancer. Outcome variations may be due to differences in sample size and study design. Alternatively, there may also be biological differences between populations: Studies from China, India, Japan and Malaysia indicated that older age at first or last childbirth represents an independent variable that increased the risk of breast cancer (Lodha et al., 2011; Mohd Razif et al., 2011; Islam et al., 2012; Yanhua et al., 2012; Bhadoria et al., 2013). In a study from Iran, age at first childbirth did not independently contribute to the final logistic regression model (Ghiasvand et al., 2012).

Similarly, in the case of variables first and last gestation, women with positive menopause status had higher but insignificant risk of breast cancer. Furthermore, menopause status was not an independent variable in the logistic regression model. In contrast, previous studies identified post- menopause status as an independent variable that increased the risk of breast cancer (Elkum et al., 2014 Hosseinzadeh et al., 2014).

Lifestyle-associated risk factors analysed in this study were not significantly different between controls and breast cancer patients. This may be due to the limited number of data used in this study and could indicate that in the present population, modifiable reproductive variables contributed stronger to increase the risk of breast cancer than lifestyle- associated risk factors. In addition to the low number of data, another limitation of the present study was that all patients included belonged to the same health care centre. As reproductive patterns and ethnic composition vary among Brazilian regions, the results of the present study cannot be extrapolated to other regions of North-eastern Brazil. Therefore, multi-centre studies would be useful to further elucidate the contribution of reproductive factors to the risk of breast cancer.

Present results indicate that reproductive factors contribute to increase the risk of breast cancer in a population of North-eastern Brazil. Future studies should increase the number of patients from different health care centres to confirm present results. A recent study from Northeast Brazil identified an increased percentage of elderly women with TNBC and to date there do not exist Brazilian studies about the association between reproductive risk factors and molecular breast cancer subtypes (De Macêdo Andrade et al., 2014).

It will be also important to assess the knowledge of women about the risk of breast cancer linked to these reproductive factors. Information directed to women by public and private health services about protective factors such as longer breastfeeding time could help reducing the risk of breast cancer among women. Knowledge on reproductive risk factors such as low parity could motivate participation on the Brazilian public breast cancer screening program and positively stimulate breast self examination (BSE).

References

Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvale G (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer*, **92**, 167-75.

Alegre MM, Knowles MH, Robison RA, O'Neill KL (2013). Mechanics behind Breast Cancer Prevention - Focus on Obesity, Exercise and Dietary Fat. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**, 2207-12.

Amaro J, Severo M, Vilela S, Fonseca S, Fontes F, La Vecchia C, et al (2013). Patterns of breast cancer mortality trends in Europe. *Breast*, S0960 9776, **13**, 00038-6.

Autier P, Boniol M, La Vecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C, et al (2010). Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ*, **341**, c3620.

Balasubramaniam SM, Rotti SB, Vivekanandam S (2013). Risk factors of female breast

carcinoma: A case control study at Puducherry. *Indian Journal of Cancer*, **50**, 1.

Benson JR, Jatoi I (2012). The global breast cancer burden. *Future Oncol*, **8**, 697-702.

Bezerra de Vasconcelos A, Azevedo G, Mendonça S, Sichieri R (2001). Height, weight, weight change and risk of breast cancer in Rio de Janeiro, Brazil. *Sao Paulo Med J/Rev Paul Med*, **119**, 62-6.

Bhadoria AS, Kapil U, Sareen N, Singh P (2013). Reproductive factors and breast cancer: A case–control study in tertiary care hospital of North India. *Indian Journal of Cancer*, **50**, 316-21.

Carvalho de Matos J. Pelloso SM, de Barros Carvalho MD (2010). Prevalence of Risk Factors for Breast Neoplasm in the City of Maringá, Paraná State, Brazil. *Rev Latino- Am Enfermagem*, **18**, 352-9.

Carvalho de Matos J. Pelloso SM, de Barros Carvalho MD (2011). Fatores associados à realização da prevenção secundária do câncer de mama no Município de Maringá, Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública*, **27**, 888-98.

Castelló A, Pollán M, Buijsse B, Ruiz A, Casas AM, Baena- Canãda JM, (2014). Spanish Mediterranean diet and other dietary patterns and breast cancer risk: case–control EpiGEICAM study. *British Journal of Cancer* 2014, DOI:10.1038/bjc.2014.434.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, **360**, 187–95.

Da Silva EP, Pelloso SM, de Barros Carvalho MD, de Ornelas Toledo MJ (2009). Exploração de fatores de risco para câncer de mama em mulheres de etnia Kaingáng, Terra Indígena Faxinal, Paraná, Brasil, 2008. *Cad Saúde Pública*, **25**, 1493-1500.

De Macêdo Andrade AC, Alberis Ferreira Júnior C, Dantas Guimarães B, Pessoa Barros AW, Sarmiento de Almeida G, Weller M (2014). Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil. *BMC Women's Health*, **14**:110.

Di Pietro PF, Medeiros NI, Vieira FGK, Fausto MA and Belló- Klein A (2007). Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. *Nutr Hosp*, **22**, 565-72..

Elkum N, Al-Tweigeri T, Ajarim D, Al-Zahrani A, Bin Amer SM and Aboussekhra A (2014). Obesity is a significant risk factor for breast cancer in Arab women Elkum et al. *BMC Cancer*, **14**, 788.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, **49**, 1374-403.

Fernandes de Souza Pinho V, Silva Freire Coutinho E (2007). Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. *Cad Saúde Pública*, **23**, 1061-69.

Formenti SC, Arslan AA, Love SM (2012). Global breast cancer: the lessons to bring home. *Int J Breast Cancer*, **2012**:249501

França- Botelho AC, Carvalho Ferreira M, França JL, Luzia França E (2012). Breastfeeding

and its Relationship with Reduction of Breast Cancer: A Review. *Asian Pac J Cancer Prev*, **13**, 5327-32.

Freitas- Junior R, Maciel Reis Gonzaga C, Maya Aires Freitas N, Martins E, De Cássia de Maio Dardes R (2012). Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics*, **67**, 731-37.

Gebrim LH, Quadros LGA (2006). Rastreamento do câncer de mama no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*, **28**, 319–23.

Geimba de Lima M, Koifman S, Lins Scapulatempo I, Peixoto M, Naomi S, Curado do Amaral M (2001). Fatores de risco para câncer de mama em mulheres indígenas Teréna de área rural, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*, **17**, 1537-44.

Ghiasvand R, Bahmanyar S, Zendehdel K, Tahmasebi S, Talei A, Adami HO and Cnattingius S (2012). Postmenopausal breast cancer in Iran; risk factors and their population attributable fractions. *BMC Cancer*, **12**:414

Hartz AJ, He T (2013). Cohort study of risk factors for breast cancer in post menopausal women. *Epidemiol Health*, **35**, e2013003.

Hinkula M, Pukkala E, Kyyronen P, Kauppila A (2001). Grand multiparity and the risk of breast cancer: population-based study in Finland. *Cancer Causes Control*, **12**, 491–500.

Hosseinzadeh M, Ziaei JE, Mahdavi N, Aghajari P, Vahidi M, Fateh A, Asghari E (2014). Risk Factors for Breast Cancer in Iranian Women: A Hospital-Based Case-Control Study in Tabriz, Iran. *J Breast Cancer*, **17**, 236-243.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), Rio de Janeiro.

Instituto Nacional de Câncer (INCA): Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil.
[<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>]

Instituto Nacional de Câncer (INCA): Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil.
[<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>]

Inumaru LE, Gomes Duarte Quintanilha MI, da Silveira EA, Veloso Naves MM (2012). Risk and Protective Factors for Breast Cancer in Midwest of Brazil. *Journal of Environmental and Public Health*, doi:10.1155/2012/356851.

Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D et al (2007). Breastfeeding and Maternal and Infant Health Outcomes in Developed Countries. *Evidence Report Technology Assessment (Full Rep)*, **153**, 1-186.

Islam T, Matsuo K, Ito H, Hosono S, Watanabe M, Iwata H, Tajima K, Tanaka H (2012). Reproductive and hormonal risk factors for luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in Japanese women. *Annals of Oncology*, **23**, 2435–41.

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **19**, 1893–907.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, **61**, 69–90.

Jung Sun L, Minkyung O and The Korean Breast Cancer Society (2014). Effects of interval

between age at first pregnancy and age at diagnosis on breast cancer survival according to menopausal status: a register-based study in Korea. *BMC Women's Health*, **14**, 113.

Kalache A, Maguire A, Thompson SG (1993). Age at last full-term pregnancy and risk of breast cancer. *Lancet*, **341**, 33-6.

Kann S, Schmid SM, Eichholzer M, Huang DJ, Amann E, Güth U (2014). The impact of overweight and obesity on breast cancer: data from Switzerland, so far a country little affected by the current global obesity epidemic *Gland Surgery*, **3**, 181-197.

Kauppila A, Kyyronen P, Lehtinen M, Pukkala E (2012). Dual effect of short interval between first and second birth on ductal breast cancer risk in Finland. *Cancer Causes Control*, **23**, 187–93.

Kobayashi S, Sugiura H, Ando Y, Shiraki N, Yanagi T, Yamashita H et al (2012). Reproductive history and breast cancer risk. *Breast Cancer*, **19**, 302-8.

Kruk J (2014). Association between Vegetable, Fruit and Carbohydrate Intake and Breast Cancer Risk in Relation to Physical Activity. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 4429-36.

Leite de Lima FE, do Rosário Dias de Oliveira Latorre M, de Carvalho Costa MJ, Fisberg RM (2008). Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saúde Pública*, **24**, 820-828.

Li CI, Beaber EF, Tang MC, Porter PL, Daling JR, Malone KE (2013). Reproductive factors and risk of estrogen receptor positive, triple-negative, and HER2-neu overexpressing breast cancer among women 20–44 years of age. *Breast Cancer Res Treat*, **137**, 579–587.

Li L, Ji J, Wang J, Niyazi M, Qiao Y, Boffetta P (2012). Attributable Causes of Breast Cancer and Ovarian Cancer in China: Reproductive Factors, Oral Contraceptives and Hormone Replacement Therapy. *Chin J Cancer Res*, **24**, 9-17.

Meier-Abt F, Milani E, Roloff T, Brinkhaus H, Duss S, Meyer DS et al (2013). Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast Cancer Research*, **15**, R36.

Mousavi SM, Försti A, Sundquist K, Hemminki K (2013). Do Reproductive Factors Influence T, N, and M Classes of Ductal and Lobular Breast Cancers? A Nation-Wide Follow-Up Study. *PloSONE*, **8**, e58867.

Namiranian N, Moradi-Lakeh M, Kazem S, Ratki R, Doayie M, Nojomi M (2014). Risk Factors of Breast Cancer in the Eastern Mediterranean Region: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 9535-41.

Narod SA (2012). Breast cancer in young women. *Nat Rev Clin Oncol*, **9**, 460-70.

Paiva CE, Sakamoto Ribeiro B, Alvarenga Godinho A, de Souza Portes Meirelles R, Vignoli Guzella da Silva E, D'Addazio Marques G et al (2002). Fatores de Risco para Câncer de Mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle. *Rev Bras Cancerologia*, **48**, 231-237.

Razif SM, Sulaiman S, Dietetics PGD, Hanie SS, Aina EN, Rohaizak M, Sharifah NA (2011). The Contribution of reproductive factors and family history towards premenopausal breast Cancer risk in Kuala Lumpur, Malaysia. *Med J Malaysia*, **66**, 220-26.

Qian F, Ogundiran F, Hou N, Ndom P, Gakwaya A, Jombwe J et al (2014). Alcohol

Consumption and Breast Cancer Risk among Women in Three Sub-Saharan African Countries. *PLoS ONE*, **9**, e106908.

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al (2007). The decrease in breast- cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*, **356**, 1670-74.

Redondo CM, Gago- Domínguez M, Ponte SM, Enguix Castelo M, Jiang X, Alonso García A et al (2012). Breast feeding, parity and breast cancer subtypes in a spanish cohort. *PLoS ONE*, **7**, e40543.

Scowitz ML, Baptista Menezes AM, Petrucci Gigante D, Tessaro S (2005). Conduas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Rev Saúde Pública*, **39**, 340- 9.

Sepandi M, Akrami M, Tabatabaee H, Rajaeefard A, Tahmasebi S, Angali KA et al (2014). Breast Cancer Risk Factors in Women Participating in a Breast Screening Program: a Study on 11,850 Iranian Females. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 8499-502.

Surdyka JA, Surdyka D, Stanisławek A, Starosławska E, Patyra KI (2014). Selected breast cancer risk factors and early detection of the neoplasm in women from Lublin region attending screening program in St. John's Cancer Center, years 2005–2006. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **21**, 792–98.

Tazhibi M, Dehghani M, Babazadeh S, Makkarian F, Tabatabaeian M, Sadeghi M, Rezaei P, Faghihi M (2014). Hormonal and reproductive risk factors associated with breast cancer in Isfahan patients. *Journal of Education and Health Promotion*, **3**, 106-10.

Tessarola S, Béria JU, Tomasi E, Barros AJD (2001). Contraceptivos orais e câncer de mama: estudo de casos e controles. *Rev Saúde Pública*, **35**, 32-8.

Ursin G, Bernstein L, Lord SJ, Karim R, Deapen D, Press MF, et al (2005). Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *Br J Cancer*, **93**, 364–71.

Viacava F, Souza-Junior PRB, Moreira RS (2009). Estimativas da cobertura de mamografia segundo inquéritos de saúde no Brasil. *Rev Saúde Pública*, **43**, 117–125.

Yanhua C, Geater A, You J, Li L, Shaoqiang Z, Chongsuvivatwong V et al (2012). Reproductive Variables and Risk of Breast Malignant and Benign Tumours in Yunnan Province, China. *Asian Pac J Cancer Prev*, **13**, 2179-84.

Yeo W, Lee HM, Chan A, Chan EYY, Chan MCM, Chan KW et al (2014). Risk factors and natural history of breast cancer in younger Chinese women. *World J Clin Oncol*, **5**, 1097-106.

Table 1. Comparison of lifestyle risk factors, age and income between breast cancer patients and control group

Variable	Cases (N= 81)		Controls (N= 162)		P value
	Mean	SD	Mean	SD	
Age	53.32	11.22	53.03	10.67	0.8445
Body mass index	27.74	5.124	28.18	4.528	0.5002
Weight (kg)	68.49	14.25	69.03	12.19	0.7637
	N	%	N	%	
Physical activity					
Yes	46	57.50	89	54.94	0.7058
No	34	42.50	73	45.06	
Missing	1		-		
Alcohol consumption					
No consumption	52	64.20	92	56.79	0.2518
Consumption	29	35.80	70	43.21	
Smoking					
Never	40	49.38	66	40.74	0.2003
Ever	41	50.62	96	59.26	
Income					
≤ 3 minimum wages	54	84.37	146	90.12	0.2224
> 3 minimum wages	10	15.63	16	9.88	
Missing	17		-		

Table 2. Odds ratio (OR) and confidence intervals (CI) of reproductive risk factors represented for the 243 women.

Variable	Case (N= 81)		Control (N= 162)		OR (95% CI)	P value*
	N	%	N	%		
Age at menarche- all women						
> 12 years	49	62.02	118	73.29	1	0.076
≤ 12 years	30	37.98	43	26.71	1.680 (0.947- 2.980)	
Missing	2		1			
Age at menarche- only parous women						
> 12 years	38	58.46	110	74.32	1	0.022
≤ 12 years	27	41.54	38	25.68	2.057 (1.111- 3.808)	
Missing	2		1			
Number of children						
≥ 2	53	65.44	131	80.86	1	0.027
1	14	17.28	18	11.11	1.922 (0.892- 4.143)	0.095
Nuliparity	14	17.28	13	8.03	2.662 (1.173- 6.041)	0.019
Age at first gestation						
≤ 20	18	27.27	56	37.84	1	0.142
21 -29	39	59.09	82	55.40	1.480 (0.770- 2.845)	0.249
≥ 30	9	13.64	10	6.76	2.800 (0.984- 7.965)	0.054
Missing	1		1			

Age at last gestation						
< 30	18	32.14	65	44.52	1	0.168
30- 39	29	51.79	68	46.58	1.540 (0.781- 3.038)	0.231
≥ 40	9	16.07	13	8.90	2.500 (0.922- 6.778)	0.072
Missing	11		3			
Reproductive period						
≤ 10 years	30	53.57	99	67.81	1	0.061
> 10 years	26	46.43	47	30.19	1.826 (0.973- 3.426)	
Missing	11		3			
Total breastfeeding time**						
Not at all	10	14.93	14	9.40	1	0.021
≤ 12	36	53.73	55	36.91	0.916 (0.367- 2.285)	0.851
13 – 24	8	11.94	21	14.09	0.533 (0.169- 1.684)	0.284
> 24	13	19.40	59	39.60	0.308 (0.12- 0.847)	0.022
Menopause status- all women						
Negative	23	28.40	63	38.89	1	0.108
Positive	58	71.60	99	61.11	1.605 (0.901- 2.858)	
Menopause status – only parous women						
Negative	18	26.87	58	39.93	1	0.088
Positive	49	73.13	91	60.07	1.735 (0.922- 3.266)	

* Wald statistic

** In months

Table 3. Odds ratios (OR) and confidence intervals (CI) of a binominal logistic regression model represented for the 216 parous women.

Variable	OR (95% CI)	<i>P</i> value*
Age at menarche		
> 12	1	0.038
≤ 12	2.120 (1.043- 4.308)	
Number of children		
≥ 2	1	0.006
1	3.748 (1.459- 9.627)	
Reproductive period		
≤ 10 years	1	0.004
> 10 years	3.042 (1.421- 6.512)	
Total breastfeeding time**		
Not at all	1	
≤ 12	0.515 (0.187- 1.418)	0.199
13 – 24	0.633 (0.184- 2.175)	0.468
> 24	0.258 (0.084- 0.787)	0.017

* Wald statistic

** In months

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos da pesquisa foram alcançados, entretanto, não foram encontradas evidências para corroborar dados de literatura. Apenas fatores de risco reprodutivos tiveram de fato associações significativas com CM. Isto pode ser explicado pelo número limitado de dados utilizados nos nossos estudos, o que pode ter inviabilizado a análise de fatores de riscos associados ao estilo de vida. Além do baixo número de dados, outra limitação dos nossos estudos foi a de que todos os pacientes incluídos pertenciam ao mesmo centro de saúde. Como padrões reprodutivos e composição étnica variam entre as regiões brasileiras, os nossos resultados não podem ser usados para descrever outras regiões fora do Nordeste do Brasil. Portanto, estudos multicêntricos seriam necessários e úteis para elucidar melhor a contribuição de diferentes fatores reprodutivos para o risco de CM. Em pesquisas futuras, o ideal é aumentar o número de pacientes de diferentes centros de saúde para melhor delineamento dos estudos. Também é importante investigar o conhecimento das mulheres sobre o risco de CM vinculado com esses fatores reprodutivos, já que esse conhecimento é importante para prevenção e pode estimular positivamente a preocupação com o auto exame.

No caso dos subtipos moleculares, a comparação do nosso estudo com outros realizado em diferentes populações mostrou uma taxa elevada de doentes com tumores TN com idade superior a 50 anos. Até o momento, não existem estudos sobre os fatores de risco que aumentam a frequência de TN em populações de câncer de mama no Nordeste do Brasil. Os potenciais fatores de risco específicos para TN poderão ser investigados em estudos futuros, assim como estratégias e programas de prevenção que possam contribuir para reduzir a incidência desta forma agressiva de câncer de mama. Além disso, nossos dados indicaram um aumento da frequência de pacientes com subtipo HER2 positivo e alta graduação tumoral do subtipo molecular HER2, respectivamente. Estes pacientes não receberam imunoterapia. Este achado mostra a necessidade de melhorar o tratamento do câncer de mama HER2 positivo no Nordeste do Brasil, por meio de da aplicação de imunoterapia como opção terapêutica adicional. Uma melhor avaliação sobre as estratégias terapêuticas também poderia ser oferecida às pacientes, caso houvesse aplicação de ensaios com marcadores moleculares para prever os benefícios, por exemplo, da quimioterapia.

5. REFERÊNCIAS

Alegre MM, Knowles MH, Robison RA, O'Neill KL (2013). Mechanics behind Breast Cancer Prevention - Focus on Obesity, Exercise and Dietary Fat. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(4):2207-12.

Amaro J, Severo M, Vilela S, Fonseca S, Fontes F, La Vecchia C, Lunet N (2013). Patterns of breast cancer mortality trends in Europe. *Breast*, S0960 9776(13)00038-6.

Anderson BO, Braun S, Lim S, Smith RA, Taplin S, Thomas DB (2002). Global Summit early detection panel. *Breast J*, (Suppl2): S51-9.

Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA (2001). Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Clin Oncol* 19:18-27.

Anothaisintawee T, Wiratkapun C, Lersitthichai P, Kasamesup V, Wongwaisayawan S, Srinakaran J, Hirunpat S, Woodtichartpreecha P, Boonlikit S, Teerawattananon Y, Thakkinstian A (2013). Risk Factors of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asia Pac J Public Health*, May 23. [Epub ahead of print].

Araújo da Silva P, da Silva Riul S (2011). Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce *Rev. Bras. Enferm*, 64 no.6.

Autier P, Boniol M, La Vecchia C, Vatten L, Gavin A, Héry C, *et al* (2010). Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ*, 341:c3620.

Bandeira Lages R, Da Paz Oliveira G, Morais Simeão Filho V, Melo Nogueira F, Batista Mendes Teles J, Carlos Vieira S (2012). Inequalities associated with lack of mammography in Teresina-Piauí-Brazil, 2010-2011. *Rev Bras Epidemiol*, 15(4): 737-47.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*, 2:1973–1979.

Batina NG, Trentham-Dietz A, Gangnon RE, Sprague BL, Rosenberg MA, Stout NK, Fryback DG, Alagoz O (2013). Variation in tumor natural history contributes to racial disparities in breast cancer stage at diagnosis. *Breast Cancer Res Treat*, 138(2):519-28.

Basílio DV, Mattos IE (2008). Câncer em mulheres idosas das regiões Sul e Sudeste do Brasil: Evolução da mortalidade no período 1980-2005. *Rev Bras Epidemiol*, 11(2): 204-14.

Benson JR, Jatoi I (2012). The global breast cancer burden. *Future Oncol*, 8(6):697-702.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D (2006). Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *OMICS*, 10: 429-43.

Cantinelli FS, Camacho RS, Smaletz O, Gonsales BK, Braguittoni E, Rennó JR (2006). A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. *Rev Psiquiatr Clín*, 33(3): 124-33.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21):2492-502.

Carvalho de Matos J, Marisa Pelloso S, de Barros Carvalho MD (2010). Prevalence of Risk Factors for Breast Neoplasm in the City of Maringá, Paraná State, Brazil. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, 18(3):352-9.

Cancer research uk (2015). What hormone therapy is. London. Disponível em: < <http://www.cancerhelp.org.uk/help/default.asp?page=24253> >. Acesso em: 11 ago. 2015

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, S Leung, et ai. (2009) índice de Ki67, estado HER2

e prognóstico de pacientes com luminal B câncer de mama. *Journal of the National Cancer Institute* 101: 736-750. doi: 10.1093 / JNCI / djp082

Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol*, 26:5697–5704.

Cibeira GH, Guaragna RM (2006). Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. *Rev Nutr*: 19(1), 65-75.

Corbex M, Kreps GL, McTiernan A (2008). Breast Health Global Initiative Early Detection Panel. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries: early detection resource allocation. *Cancer*, 113 (8Suppl):2244-56.

Corrêa, P (2010). Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana – *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9(Supl.1):3-7.

Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C (2002) Chromogenicin situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest*, 82:1007–1014.

Desantis C, Naishadham D, Jemal A (2013). Cancer statistics for African Americans, 2013. *CA Cancer J Clin*, doi: 10.3322/caac.21173.

Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R (2006). Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol* 17:818–826.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9:R6.

Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J (2000). Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2,

by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*, 89:111–117.

Elston CW and Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19: 403-410.

Easton DF (1999). Quantas mais genes de predisposição câncer de mama estão lá? *Breast Cancer Research*; 1 (1): 14-17

Barreto-Neto NJS, Pinheiro AB, Oliveira JF, Crusoé NSDR, Bertrand SAB, Machado MCM, Pinto RMO, Carvalho-Junior JD, Machado CAC. Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia. *Rev Bras Mastologia*. 2014;24(4): 98-102

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6):1374-1403.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127(12):2893-917.

Fernandes de Souza Pinho V e da Silva Freire Coutinho E (2005). Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 21(2):351-360.

Filomena MC, Lívia MB, Kátia MP, Matt VR and Calos EB. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. *BMC Women's Health* 2014, 14:102

Fonseca LA, Eluf-Neto J, Wunsch Filho V (2010). Cancer mortality trends in Brazilian state capitals, 1980-2004. *Rev Assoc Med Bras*, 56(3):309-12.

Freitas- Junior R, Maciel Reis Gonzaga C, Maya Aires Freitas N, Martins E, De Cássia de Maio Dardes R (2012). Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics*, 67(7):731-737.

Fundação do Câncer. Introdução para TNM. Link: <http://www.cancer.org.br/tnm>; Acesso em: 20/05/2013.

Wayt G (2003). Untangling the Roots of Cancer. *Scientific American*, 289, 56 – 65.

Gleason MX, Mdzinarishvili T, Sherman S (2012). Breast cancer incidence in black and white women stratified by estrogen and progesterone receptor statuses. *PLoS One*, 7(11):e49359.

GLOBOCAN (2012). International Agency for Câncer Research (Internet): section of cancer information. 2012 (cited 2014 Jun 28). Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, et al. (2009) Limiares para terapias: destaques do Consenso Internacional St Gallen Peritos sobre a terapia primária do câncer de mama precoce 2009. *Annals of Oncology* 20: 1319-1329. doi: 10.1093 / annonc / mdp322

Goldhirsch A, Madeira WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, et al. (2011) Estratégias para subtipos de lidar com a diversidade de câncer de mama: destaques do St. Gallen Consenso Internacional de Peritos sobre a terapia primária do câncer de mama precoce 2011. *Annals of Oncology* 22: 1736-1747. doi: 10.1093 / annonc / mdr304

Goussard J, Genot JY (1994) What can be now expected of the determination of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancers. *Bull Cancer* 81:22–28.

Gonçalves ATC (2007). Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad. Saúde Pública*, 23(8):1785-1790

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemio-lógicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol*, 51:227-34.

Hackshaw AK, Paul EA (2003). Breast self-examination and death from breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 88:1047-53.

Haddad N, Silva MB (2001). Mortalidade por neoplasmas em mulheres em idade reprodutiva - 15 a 49 anos - no estado de São Paulo, Brasil, de 1991 a 1995. *Rev Assoc Med Bras*, 47(3): 221-30.

Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1593-603.

Hartz AJ, He T (2013). Cohort study of risk factors for breast cancer in post menopausal women *Epidemiol Health*, 30;35:e2013003. doi: 10.4178/epih/e2013003.

Henderson, B.E.; Feigelson, H.S (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.21, n.3, p.427-433, 2000.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.*; 8:R76.

INCA (2008). Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer. 3ª ed. Rio de Janeiro, INCA: 2008.

INCA (2009). Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA: 2009.

INCA (2011). Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Rastreamento organizado do câncer de mama: a experiência de Curitiba e a parceria com o Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, INCA: 2011.

INCA (2012). Ministério da Saúde- Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro.

[<http://www.gov.br/estimativa/2012>].

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8):1893–1907.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*, 61(2):69–90.

Lima FEL, Latorre MRDO, Costa MJC, Fisberg RM (2008). Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad. Saúde Pública*; 24(4):820-828

Kalache A, Maguire A, Thompson SG (1993). Age at last full-term pregnancy and risk of breast cancer. *Lancet*, 341:33-6.

Kasami M, Uematsu T, Honda M, Yabuzaki T, Sanuki J, Uchida Y, *et al* (2008). Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast*, 17(5):523-7.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H (2007). Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol*, 18:1927–1934.

Koifman S, Koifman R (2003). Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res*., 544:305-11.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95:142–153.

Kumar V, Abbas AK (2004). *Fausto N: the breast*, vol 3, 7th edn. Elsevier, Philadelphia, PA

Lanari C, Lamb CA, Fabris VT, Helguero LA, Soldati R, Bottino MC (2009). The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 16:333–350.

Lima JQ, Falk JAA (1998). Importância da identificação dos fatores de risco na luta contra o câncer. 2a Ed. Recife, Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000): ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321(7261):624–628.

Meads C, Ahmed I, Riley RD (2012). A systematic review of breast cancer incidence risk prediction models with meta-analysis of their performance. *Breast Cancer Res Treat*, 132(2):365-77.

Mousavi SM, Försti A, Sundquist K, Hemminki K (2013). Do reproductive factors influence T, N, and m classes of ductal and lobular breast cancers? A nation-wide follow-up study. *PLoS One*, 29;8(5):e58867. doi: 10.1371/journal.pone.0058867.

Muss HB, Case LD, Atkins JN, et al (1994). Tamoxifen versus high-dose oral medroxyprogesterone acetate as initial endocrine therapy for patients with metastatic breast cancer: a Piedmont Oncology Association study. *J Clin Oncol*;12(8):1630-8.

Nagatsuma AK, Shimizu C, Takahashi F, Tsuda H, Saji S, Hojo T, Sugano K, Takeuchi M, Fujii H, Fujiwara Y (2013). Impact of recent parity on histopathological tumor features and breast cancer outcome in premenopausal Japanese women. *Breast Cancer Res Treat*, 138(3):941-50.

Naraynsingh V, Hariharan S, Dan D, Bholra S, Bholra S, Nagee K (2010). Trends in breast cancer mortality in Trinidad and Tobago--a 35-year study. *Cancer Epidemiol*, 34(1):20-3.

Narod SA (2012). Breast cancer in young women. *Nat Rev Clin Oncol*, 26:460-70. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.102.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. cancer res.* 2004;10:5367-74.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P, (2005). Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2): 74-108.

Paulinelli RR, Freitas JR, Curado MP, Souza AA (2003). A situação do câncer de mama em Goiás, no Brasil e no mundo: tendências atuais para a incidência e a mortalidade. *Rev Bras Saude Mater Infant*, 3(1): 17-24.

Prat A, Perou CM (2009). Mammary development meets cancer genomics. *Nat. med.*;15:907-13.

Perou, C. M. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* 16 (suppl. 1). 61–70

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al.(2000); Molecular portraits of human breast tumours [carta]. *Nature*;406:747-52.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659–1672.

Pires Batiston A, Mamoru Tamaki E, Alves de Souza L, de Moraes dos Santos ML (2011). Conhecimento e prática sobre os fatores de risco para o câncer de mama entre mulheres de 40 a 69 anos. *Rev. Bras. Saude Mater Infant*, 11 no.2.

Press MF, Finn RS, Cameron D, Di Leo A, Geyer CE, Villalobos IE (2008). HER-2 gene amplification, HER-2 and epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression, and lapatinib efficacy in women with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 14:7861–7870.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO (2010). Combinatorial biomarker expression in breast

cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 120:293–308.

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, *et al* (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*: 356(16), 1670-1674.

Redondo CM, Gago-Domínguez M, Ponte SM, Castelo ME, Jiang X, García AA, Fernández MP, Tomé MA, Fraga M, Gude F, Martínez ME, Garzón VM, Carracedo Á, Castelao JE (2012). Breast feeding, parity and breast cancer subtypes in a Spanish cohort. *PLOS One*,7(7): e40543. doi: 10.1371/journal.pone.0040543.

Reis-Filho JS, Tutt ANJ (2008). Triple negative tumors: a critical review. *Histopathology*; 52:108-118.

Richard K. Albert MD, Glenn D. Braunstein MD; Sidney Cohen MD, Eugene P. Frenkel, MD (2012). *The Merck Manual for Healthcare Professionals*. Merck Sharp & Dohme Corp. 2012

Riggs BL, Hartmann LC (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*;348(7):618-29.

Robles SC, Galanis E (2001). *Breast cancer in Latin America and the Caribbean*. PAHO/WHO, 2001.

Romond EH; Perez EA; Bryant J (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673-1684.

Salzano FM, Bortolini MC: *The evolution and genetics of Latin American populations*. New York: Cambridge University Press; 2002.

Rosner B, Glynn RJ, Tamimi RM, Chen WY, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE (2012). Breast Cancer Risk Prediction with Heterogeneous Risk Profiles According to Breast Cancer Tumor Markers. *Am J Epidemiol* [Epub ahead of print].

Ross, JS, Harbeck, N. Prognostic and Predictive Factors Overview. In *Molecular Oncology of Breast Cancer*, Ross, J.S.; Hortobagyi, G.N (2005)., Eds.; Jones and Bartlett Publishers: Sudbury, MA, pp. 128-141.

Santos JS (2009). A influência dos fatores de risco nutricionais no desenvolvimento de câncer de mama em pacientes ambulatoriais do interior do Rio Grande do Sul, Brasil. *Scientia Medica*, v. 19, n. 3, p. 115-121

Scowitz ML, Menezes AMB, Gigante DP, Tessaro S (2005). Condições na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Rev Saúde Pública*, 39(3): 340-9.

SILVA, A. S. et al. A quantitative theoretical model for the development of malignancy in ductal carcinoma in situ. *J Theor Biol*, v. 262, n. 4, Feb 21, p.601-613. 2010.

SEER (2008). *Cancer Statistics Review, 1975–2005*. Edited by Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK. Bethesda, MD: National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER website.

Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivetto I, Whelan T, Reyno L (2004). Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer, 15: treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. *Can Med Assoc J*, 170(6):983-94.

SILVA, A. S. *et al* (2010). A quantitative theoretical model for the development of malignancy in ductal carcinoma in situ. *J Theor Biol*, 262 :601-613.

Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M (2006). Trends in breast cancer by race and ethnicity: update. *CA Cancer J Clin*, 56(3):168–183.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235:177–182.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. natl. acad. sci. USA*;100:8418-23.

Scholzen T, Gerdes J (2000) A proteína Ki-67: a partir do conhecido eo desconhecido. *Jornal da fisiologia celular* 182: 311-322. doi: 10.1002 / (SICI) 1097-4652 (200003) 182: 3 <311 :: auxílio-jcp1> 3.0.co; 2-9

Tavassoli FA, Devilee P (2003). *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, IARC Press; 2003.

Thomas DB, Gao DL, Ray RM, et al (2002). Randomized trial of breast selfexamination in Shanghai: final results. *J Natl Cancer Inst*, 94:1445-7.

TNM (2002). *Classification of Malignant Tumours - 6th ed*. Edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. John Wiley & Sons, INC., Publication – 2002.

Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. j. pathol.* 2002;161:1991-96.

Ward S, Pilgrim H, Hind D (2009) Trastuzumab for the treatment of primary breast cancer in HER2-positive women: a single technology appraisal. *Health Technol Assess* 13(Suppl1):1–6.

Whelan TJ, Julian J, Wright J, Jadad AR, Levine ML (2000). Does locoregional radiation therapy improve survival in breast cancer? A meta-analysis. *J Clin Oncol*, 18:1220-9.

WHO. World Health Organization. Fact Sheet N° 297. Geneva: WHO/CHP; 2006.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ (2007). American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–145.

World Cancer Research Fund (2007)/ American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: American Institute for Cancer Research, 2007.

Wünsch FV, Moncau JEC (2002). Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: Padrões regionais e tendências temporais. Rev Assoc Méd Bras, 48:250-7.

APÊNDICES

APÊNDICE A

QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES DO HOSPITAL DA FAP									
Número do Prontuário:					Data da coleta:				
Idade :		Cidade onde reside:			Raça:				
Peso:		Altura:		Renda familiar:					
Plano de saúde:				Obesidade central:					
Idade menarca:				Idade menopausa:					
Nuliparidade:		Sim Não		Número de filhos:					
Idade da primeira gestação:				Idade da última gestação:					
Tempo de amamentação em meses:		Filhos		1.		2.		3.	
4.		5.		6.		7.		Mais >	
Uso de anticoncepcionais:					Tempo:				
Terapia de reposição hormonal (TRH) após a menopausa:					Sim		Não		
Consumo de álcool:		Durante a semana:		1x		2x		3x	
destilado:		4x		5x		6x		7x	
Tabagismo:		Quantidade de cigarros/dia:			Parou há:				
Consumo de frutas:								Tipo de fruta:	
Quantidade/ Semana:									
1. _____									
2. _____									
Mais> _____									
Atividade física:		Sim Não		Horas/Semana:					
Detectou inicialmente a doença:		ECM*		Mamografia		AEM**			
Casamento consanguíneo entre os pais:		Sim Não		Histórico familiar e tipo de CA:					
1. Pai		2. Mães		3. Filho		4. Filha		5. Avôs paternos	
6. Avôs maternos		7. Tios paternos		8. Tios maternos		9. Sobrinhos		10. Primos paternos	
11. Primos maternos		12. Irmã		13. Irmão					
Tipo de CM:									
Tamanho do maior tumor principal:					diâmetro em cm				
Estado dos Nodos Linfáticos				Positivo			Negativo		
Grau histológico:					KI67:				
Estado de ER, PR e HER2/NEU: 1. ER: () 2. PR: () 3. HER2/NEU: ()									
Mês e ano do diagnóstico:									

*Exame Clínico de Mamas (ECM);

**Autoexame de Mamas (AEM)

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE

(OBSERVAÇÃO : para o caso de pessoas maiores de 18 anos e não incluídas no grupo de vulneráveis)

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido eu, _____, em pleno exercício dos meus direitos me disponho a participar da Pesquisa **“Fatores de Risco do Câncer de Mama em Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande”**

Declaro ser esclarecido e estar de acordo com os seguintes pontos:

O trabalho **“Fatores de Risco do Câncer de Mama em Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande”** terá como objetivo geral de identificar fatores de risco de câncer de mama para melhorar a prevenção da doença.

Ao voluntário só caberá a autorização de disponibilizar os dados anônimos do pontuário médico e do questionário e não haverá nenhum risco ou desconforto ao voluntário.

Ao pesquisador caberá o desenvolvimento da pesquisa de forma confidencial, revelando os resultados ao médico, indivíduo e/ou familiares, cumprindo as exigências da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

- O voluntário poderá se recusar a participar, ou retirar seu consentimento a qualquer momento da realização do trabalho ora proposto, não havendo qualquer penalização ou prejuízo para o mesmo.
- Será garantido o sigilo dos resultados obtidos neste trabalho, assegurando assim a privacidade dos participantes em manter tais resultados em caráter confidencial.
- Não haverá qualquer despesa ou ônus financeiro aos participantes voluntários deste projeto científico e não haverá qualquer procedimento que possa incorrer em danos físicos ou financeiros ao voluntário e, portanto, não haveria necessidade de indenização por parte da equipe científica e/ou da Instituição responsável.
- Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, o participante poderá contatar a equipe científica no número (083) **9941-8090; 3333-1045** ou o E-mail: mathiasweller@uepb.edu.br com **Prof. Dr. Mathias Weller.**
- Ao final da pesquisa, se for do meu interesse, terei livre acesso ao conteúdo da mesma, podendo

discutir os dados, com o pesquisador, vale salientar que este documento será impresso em duas vias e uma delas ficará em minha posse.

- Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino este termo de consentimento livre e esclarecido.



Prof. Dr. Mathias Weller

Assinatura do participante

ANEXO

ANEXO I – Autorização Institucional



Fundação Assistencial da Paraíba - FAP

CNPJ: 08.841.421/0001-57 Inscrição Estadual: Isento
Av. Dr. Francisco Pinto, s/n - Bodocongó - Cx. Postal 405
CEP 58.109-783 - Campina Grande - PB
Telefone/fax: (83) 2102-0300 – E-mail: fapcg@uol.com.br

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins e a quem interessar que estamos cientes da intenção da realização da Pesquisa intitulada Fatores de Risco do Câncer de Mama em Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande. Sob orientação e supervisão do Prof. Dr. MATHIAS WELLER, co-orientadora Prof^a Dr^a SANDRA MARIA PEREIRA DE OLIVEIRA e colaborador Dr. LAUDEMIR NASCIMENTO VITORINO, desenvolvida pelo mestrando em Saúde Pública, Gibran Sarmento de Almeida, matrícula 2013.0511.06 da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Sendo o orientador responsável pelo orientando, caso contrário, o primeiro não poderá desenvolver e/ou orientar projetos na Instituição FAP. Após aprovação do Comitê de Ética, toda documentação relativa a este trabalho deverá ser entregue em duas vias (sendo uma em CD e outra em Papel) ao Centro de Pesquisa da FAP e arquivado por cinco anos de acordo com a Res 196/96 do Ministério da Saúde.

Campina Grande, 06 de setembro de 2013

Dr^a Prof^a Lindomar de Farias Belém
Coordenadora de Pesquisa da FAP

Gilmara Marque Rodrigues Araújo
Coordenadora de Pesquisa da FAP

Adriana de Araújo Lima Queiroga
Gerente Administrativo

ANEXO II - Parecer do Comitê de Ética em pesquisa com Seres Humanos – UEPB



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEP/UEPB
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Prof.ª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO RELATOR: (15)

CAAE PLATAFORMA BRASIL: 22358113.1.0000.5187

Data da 1ª relatoria PARECER DO AVALIADOR: 02/10/2013

Pesquisador(a) Responsável: Gibran Sarmiento de Almeida

Apresentação do Projeto:

O Projeto é intitulado: “Fatores de Risco do Câncer de Mama em Pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande, PB”. Será utilizado para elaboração da Dissertação de conclusão do Mestrado em Saúde pública da Universidade Estadual da Paraíba. Essa pesquisa será um estudo prospectivo, transversal descritivo. Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, iniciará a coleta de dados no Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande. O Pesquisador responsável, Sr. Gibran Sarmiento de Almeida é quem realizará as entrevistas das pacientes de CM em cooperação com a Dra Sandra Maria Pereira de Oliveira e Dr. Laudemir Nascimento Vitorino, ambos oncologistas clínicos no Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP), em Campina Grande. A Dra Sandra Maria Pereira de Oliveira ou o Dr. Laudemir Nascimento Vitorino será sempre presente, durante todas as entrevistas. Os horários semanais das coletas iniciarão depois da aprovação do projeto pelo comitê de ética, todas as quartas-feiras no período da manhã das 08:00 às 12:00 horas. Para concordar com a pesquisa as pacientes devem ler e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Somente participarão pacientes acima dos 18 anos que aceitarem o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A quantidade de dados amostrais constituintes da pesquisa será o mínimo 200 pacientes entrevistados e elas serão entrevistadas durante um período de nove meses. No questionário constará informações relativas à idade, cidade onde reside, estágio do tumor de CM, tamanho do

maior tumor principal, estado dos nodos linfáticos, grau histológico do tumor, estado de ER, PR e HER2/NEU, histórico familiar e grau de parentesco, obesidade central (medição), idade durante a menarca, começo da menopausa, nuliparidade, número de filhos, idade na primeira gestação, tempo de amamentação, uso de contraceptivos, terapia de reposição hormonal, consumo de álcool, tabagismo, consumo de frutas e exercício físico. As medições relacionadas à obesidade central serão realizadas através de uma fita métrica na região abdominal das pacientes. Também estará presente no questionário o método utilizado na detecção inicial da doença: autoexame, mamografia e/ou exames clínicos. Todos os dados serão transferidos para uma planilha de Excel. Os fatores de risco e os parâmetros clínicos- histopatológicos (TNM, estado de menopausa, idade, obesidade e outros) serão categorizados. (Por exemplo: 5 categorias de idade- Primeira categoria: \leq 30 anos; Segunda categoria: 31- 40 anos; Terceira categoria: 41- 50anos; Quarta categoria: 51- 60 anos; Quinta categoria: \geq 61 anos). Os dados serão analisados com o software PRISM (GraphPad, California, EUA) e SPSS (IBM Company; version 17). Serão aplicados o teste X quadrado e o teste exato de Fisher para descobrir associações significativas entre fatores de risco e parâmetros clínicos- histopatológicos. Para analisar o efeito de combinações dos fatores de risco (variáveis independentes) a um parâmetro clínico- histopatológico (variável dependente), será aplicado a análise de regressão logística.

Objetivo da Pesquisa: A pesquisa tem como objetivo geral: associar fatores de risco com parâmetros clínico- histopatológicos da paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos consideráveis no presente estudo. Benefícios: O estabelecimento de medidas eficazes para o controle de Câncer de mama exige informação de qualidade sobre a distribuição de sua incidência e mortalidade. A realização deste trabalho oferecerá dados qualitativo e quantitativo dos pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP). Existem poucos estudos antigos, da década 90 sobre fatores de risco de CM no Nordeste do Brasil. Estes poucos estudos não refletem a situação atual da provável mudança dos fatores de risco de CM, associado com um aumento desta doença. Os estudos publicados nos últimos 10 anos incluíram populações do Sul, Centro-leste e Centro-oeste mas existem poucas informações do Nordeste, a região que mostra juntos com o Norte, o maior aumento da incidência e da taxa de mortalidade de CM. Adicionalmente, a maioria dos estudos realizados comparam entre grupos com CM e grupos sem CM e não existem estudos no Brasil, quais objetivam de associar fatores de risco com agressividade tumoral, incluindo exclusivamente pacientes com CM, sem grupo de controle. A identificação de fatores de risco quais

aumentam na população local pode apoiar o levantamento de medidas pelo SUS no combate de CM pela conscientização de mulheres sobre riscos e medidas da prevenção de CM. O estudo pode apoiar o SUS para proporcionar orientações quanto aos riscos e detecção precoce de CM.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo encontra-se com uma fundamentação teórica estruturada atendendo as exigências protocolares do CEP-UEPB mediante a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e RESOLUÇÃO/UEPB/CONSEPE/10/2001 que rege e disciplina este CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos encontram-se devidamente anexados.

Recomendações: Sem recomendações.


Situação do parecer: APROVADO.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA/
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Prof.ª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO III – Autorização Institucional


PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPINA GRANDE
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE GESTÃO DO TRABALHO E EDUCAÇÃO NA SAÚDE

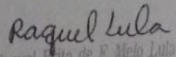
Autorização

Campina Grande, 24 de Setembro de 2014.

Estamos autorizando o estudante do Curso de Mestrado em Saúde Pública da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB: Gibran Sarmiento de Almeida, a desenvolver o Projeto intitulado: “Fatores de risco do câncer de mama em pacientes do Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP) e das Unidades Básicas de Saúde (UBS), em Campina Grande, PB”. Sob a orientação do Professor: **Doutor Mathias Weller**. O projeto será desenvolvido nas unidades básicas de saúde da família e centros de saúde. O projeto já está aprovado pelo Comitê de Ética e de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012. Certo da importância da parceria ensino-serviço agradecemos o acolhimento.

Obs.: A produção final com os resultados obtidos deverá ser encaminhada obrigatoriamente a esta diretoria.

Atenciosamente,


Raquel Brito de Figueiredo Melo Lula
COORDENADORA DE EDUCAÇÃO
NA SAÚDE

Raquel Brito de Figueiredo Melo Lula
(Coordenadora de Educação na Saúde)

Av. Assis Chateaubriand, 1376 – Liberdade – 58.414-060 – Campina Grande-PB.
Telefones: (83) 3315-5111