



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Cirurgia II

Análise Comparativa das Características Clínicas dos Subtipos Imunohistoquímicos de Cancro da Mama

Inês Rufino Hormigo

Julho'2018



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Cirurgia II

Análise Comparativa das Características Clínicas dos Subtipos Imunohistoquímicos de Cancro da Mama

Inês Rufino Hormigo

Orientado por:

Professora Doutora Catarina Rodrigues dos Santos

Julho'2018

Resumo

Contexto: O cancro da mama é a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino, e importante causa de mortalidade. Vários estudos têm vindo a dar relevância a características biológicas e marcadores imunohistoquímicos tumorais, que permitem definir 4 subgrupos principais, aparentemente com implicações terapêuticas e prognósticas.

Objetivo: O objetivo principal do estudo é analisar as características clínicas e anatomopatológicas nos 4 subtipos imunohistoquímicos de cancro da mama.

Métodos: Foram avaliados retrospectivamente 1253 casos de tumores da mama dos quais 868 foram estudados e divididos por subtipos tumorais. Foram avaliadas e comparadas as características clínicas e anatomopatológicas de cada subtipo e a evolução durante o seguimento.

Resultados: Obteve-se uma distribuição por subtipos tumorais com 70,5% de Luminais A, 10,9% Luminais B, 5,3% HER2-type e 9,9% Triplos negativos (TN). Houve diferença estatisticamente significativa em relação a idade, índice de massa corporal (IMC), tamanho tumoral, grau de diferenciação, número de gânglios positivos, tipo de cirurgia e sobrevivência específica de doença. Concluiu-se que o subtipo Luminal A se associou a idades mais avançadas e o subtipo TN a menor IMC. Os subtipos HER2-type e TN associaram-se mais frequentemente a maior tamanho tumoral, maior grau histológico e maior número de gânglios positivos, o que condicionou um pior prognóstico em ambos os grupos, sendo que HER2-type mostrou ter o pior prognóstico. O subtipo Luminal A associou-se a menor tamanho tumoral e grau histológico, menor número de gânglios positivos e melhor sobrevivência para o período de estudo.

Conclusão: Os subtipos imunohistoquímicos apresentam características clínicas, anatomopatológicas e prognósticas próprias.

Palavras-chave

Cancro da mama; subtipos imunohistoquímicos; características clínicas; sobrevivência.

O Trabalho Final de Mestrado exprime a opinião do autor e não da FML.

Abstract

Background: Breast cancer is globally the most common malignancy in women, and an important cause of death. Previous studies have been discussing the importance of biological and immunohistochemical (IHC) characteristics for the breast cancer classification, proposing them as being a tool capable of defining the 4 IHC subtypes, apparently with clinical, therapeutic and prognostic implications.

Objective: The main objective of the work is to study the clinical and anatomopathological characteristics of the 4 immunohistochemical subtypes of breast cancer.

Methods: The records of 1253 patients with breast cancer were retrospectively analyzed. 868 of these were included in the study and they were divided into subtypes. Clinical and anatomopathological characteristics were studied as well as the occurrences during the follow-up.

Results: As the tumors were divided into subtypes, 70,5% were Luminal A, 10,9% Luminal B, 5,3% HER2-type and 9,9% Triple Negative (TN). There were significant differences in the distribution of tumor size, grade, type of surgery, node status, age, body mass index (BMI), recurrence and specific disease survival. Luminal A were associated with older age and TN were associated with lower BMI. HER2-type and TN subtypes were significantly associated with higher tumor size, grade and positive node status, which conditioned a worse prognosis. HER2-type have had the worse survival. Luminal A subtype were significantly associated with lower tumor size and grade, less positive node status and better disease specific survival in the follow-up studied.

Conclusion: Immunohistochemical subtypes have typical clinical, anatomopathological and prognostic characteristics.

Keywords

Breast cancer; immunohistochemical intrinsic subtypes; clinical characteristics; survival.

Índice

RESUMO/ABSTRACT	2
ÍNDICE.....	4
INTRODUÇÃO	5
MÉTODOS.....	8
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	22
ANEXOS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

Introdução

As neoplasias malignas são a segunda causa de morte por doenças não transmissíveis no mundo, responsáveis por 1 em cada 6 mortes(1).

Segundo o GLOBOCAN, em 2012 foram diagnosticados 1,67 milhões de casos de cancro da mama no sexo feminino (25% de todos os cancros), correspondendo à neoplasia mais frequente e à segunda causa de morte por cancro neste grupo(2).

As neoplasias da mama constituem um grupo heterogêneo de elevada complexidade. Tratam-se de tumores malignos que, embora afetem a mesma estrutura anatómica, diferem a nível genómico, histológico e comportamento clínico(3).

Diferentes características podem ser tidas em conta para a classificação das neoplasias invasivas da mama, nomeadamente tipo histológico, grau de diferenciação histológica, características moleculares, imunohistoquímicas e a combinação destas em sistemas de estadiamento(4).

A classificação histológica tem por base características morfológicas. Permite diferenciar carcinomas in situ (apenas afetam o componente epitelial do tecido mamário) de carcinomas invasivos (invadem o componente estromal)(5). Com base na avaliação histológica, podem também identificar-se os principais tipos de tumores, nomeadamente carcinomas ductal invasivo e lobular invasivo (cerca de 80% dos tumores); ductal/lobular; mucinoso; tubular; medular e papilar(6)(7).

A caracterização molecular pode ser obtida através da avaliação de padrões de expressão génica. Permite identificar 4 subtipos tumorais intrínsecos principais: Luminal A, Luminal B, HER2-type e Basal-like, com características clínicas, prognósticas e de resposta terapêutica próprias (8–10).

A complexidade e os elevados custos implicados na caracterização molecular através de testes multigénicos, faz com que sejam pouco aplicáveis na prática clínica. No entanto, as técnicas de imunohistoquímica tinham já mostrado capacidade de identificar fenótipos moleculares e marcadores diagnósticos e prognósticos(11), e que parecem ter boa correlação com os marcadores moleculares(12).

Através do padrão de expressão dos recetores de estrogénio (ER), de progesterona (PR), da sobreexpressão e/ou amplificação do oncogene do recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e do marcador de proliferação celular Ki67, podem definir-se 4 subtipos imunohistoquímicos: Luminal A, Luminal B, grupo com sobreexpressão de HER2 e basal-like(12,13). Estes subtipos parecem estar associados a grupos com diferenças em termos de incidência, prognóstico e sensibilidade ao tratamento(13).

O subtipo Luminal A corresponde a cerca de 60% dos tumores invasivos da mama. Apresenta positividade para ER e PR e negatividade para HER2. Tipicamente são tumores de baixo grau histológico e de melhor prognóstico(13,14). A terapêutica hormonal é um dos pilares principais do tratamento deste grupo de tumores, caracterizando-se por uma boa resposta ao tratamento com inibidores da aromatase (como o tamoxifeno e letrozol) e moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (como fulvestrant)(15).

O subtipo Luminal B corresponde a cerca de 19% dos tumores invasivos da mama. Os recetores hormonais (ER/PR) são positivos com expressão variável de HER2/neu (positiva ou negativa). Diferencia-se do subtipo luminal A por apresentar índice de proliferação elevado (Ki-67 igual ou superior a 14-20%), tipicamente superior grau histológico e pior prognóstico(13,14). Dada a presença de recetores hormonais e de HER2, este subtipo tumoral pode responder a terapêutica com quimioterapia, hormonoterapia ou trastuzumab (anticorpo anti-HER2), embora tumores HER2+ tenham tipicamente algum grau de resistência à terapêutica hormonal(15,16).

O grupo com sobreexpressão de HER2 (grupo HER2-type) corresponde a cerca de 7% dos casos. Por definição, apresentam HER2 fortemente positivo, recetores hormonais ausentes (ER/PR negativos) e apresentam um Ki-67 elevado. Tipicamente têm pior prognóstico que os tipos Luminal A e Luminal B(13,14). Geralmente respondem a terapêutica com trastuzumab(16).

Finalmente, o grupo Basal-like corresponde a cerca de 14% dos casos. Apresenta tipicamente um padrão triplo-negativo com recetores hormonais e HER2 negativos. É comum observar-se KI-67 elevado e geralmente têm pior prognóstico(13,14).

Diferentes sistemas de estadiamento têm sido desenvolvidos, sendo que um dos

globalmente mais utilizados é o sistema TNM: tumor primário, nódulos linfáticos e metástases, criado em 1959 pela American Joint Committee for Cancer (AJCC)(17). Desde então foram publicadas 7 edições do “Manual de Estadiamento Tumoral” onde foram sendo ajustadas as definições das categorias avaliadas (tamanho e extensão do tumor primário, invasão tumoral dos nódulos linfáticos locais e presença/ausência de metástases à distância) refletindo a evolução da ciência e dos novos meios complementares de diagnóstico baseados na melhor evidência científica(18).

Muitos estudos têm sugerido que os subtipos tumorais intrínsecos apresentam comportamento clínico e prognóstico próprios, podendo beneficiar por isso de medidas terapêuticas individualizadas(19)(20). Ainda assim persistem dúvidas de que estas diferenças sejam consistentes quando é usada a classificação por marcadores imunohistoquímicos (21)(22).

Já no decorrer deste trabalho, Donald R et al, num estudo publicado em 2017 no The New England Journal of Medicine, demonstraram que não só o tamanho tumoral como determinadas características biológicas tumorais têm influência prognóstica. Verificaram que tumores de grandes dimensões com características biológicas definidas como favoráveis têm melhor prognóstico do que tumores de pequenas dimensões com características biológicas consideradas desfavoráveis(23).

Estes dados permitem fundamentar a hipótese de que determinadas características tumorais possam ser incluídas no estadiamento e decisão terapêutica.

Na última década, outros estudos semelhantes implicaram uma mudança na compreensão da biologia dos tumores da mama, levando à modificação das abordagens diagnóstica e terapêutica(18).

Em 2018 a AJCC considerou existir nível de evidência científica suficiente para adicionar biomarcadores tumorais à 8ª edição do sistema de classificação TNM, nomeadamente o grau histológico, expressão de recetores hormonais (ER e PR), sobreexpressão HER2, e perfil génico (avaliação por painéis multigénicos)(18).

O objetivo principal deste estudo foi analisar as características clínicas e anatomopatológicas nos 4 subtipos imunohistoquímicos de tumores invasivos da mama.

Métodos

Cerca de 1253 doentes com tumores da mama foram submetidos a cirurgia no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, num período de 3 anos (entre Janeiro de 2002 e Dezembro de 2004) e os seus processos clínicos foram analisados. Do total dos casos, selecionaram-se os carcinomas invasivos obtendo-se um total de 1029.

Foram considerados como critérios de exclusão, o diagnóstico de tumores benignos; diagnóstico de carcinoma in situ; e doentes dos quais não foi possível obter informação acerca da presença/ausência da expressão de recetores hormonais (Figura 1).

Em alguns dos doentes submetidos a quimioterapia neoadjuvante, não foi possível conhecer o estadiamento pré-quimioterapia. Por esta razão, foram excluídos da avaliação do tamanho tumoral (T), após divisão pelos subtipos tumorais.

Selecionaram-se assim 868 doentes (Figura 1). Foi feita uma caracterização da população em estudo tendo em consideração a idade, índice de massa corporal (IMC), tipo e características da cirurgia realizada, outras abordagens terapêuticas (quimioterapia, radioterapia e/ou hormonoterapia), número de gânglios positivos, e evolução clínica (recorrência local, metastização e/ou morte). Foram também avaliadas características anatomo-patológicas e imunohistoquímicas dos tumores primários, entre elas o tipo histológico, presença/ausência de invasão vascular, grau histológico, tamanho tumoral e presença de tumores múltiplos.

Foi estudada a evolução dos subtipos tumorais com recurso a curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, com um seguimento mediano de 57,5 meses (60,1 - 105,9), considerando-se sobrevivência global e sobrevivência específica de doença.

Os tumores foram subdivididos, baseados na classificação imunohistoquímica definida na Conferência St Gallen 2013, considerando-se:

- Luminal A - Tumores ER positivos, PR não negativos e HER2 não positivos;
- Luminal B - Tumores ER positivos, HER2 positivos, PR positivo ou negativo; e Tumores ER negativos, PR positivos e HER2 positivo ou negativo.

-HER2-type - Tumores ER negativos, PR não positivos e HER2 positivos;

-TN - Tumores ER negativos, PR não positivos e HER2 negativos.

Apesar do valor de Ki67 ser usado para distinção de Luminal A e Luminal B na classificação de St Gallen, esta variável não foi incluída pela escassez destes dados nos tumores tratados no período do estudo (2002-2004).

A análise estatística foi feita através do software SPSS. As variáveis categóricas foram comparadas entre os subgrupos pelo Teste de Mann-Whitney e as variáveis contínuas com ANOVA. Considerou-se significancia estatística para um valor de p inferior a 0,05.

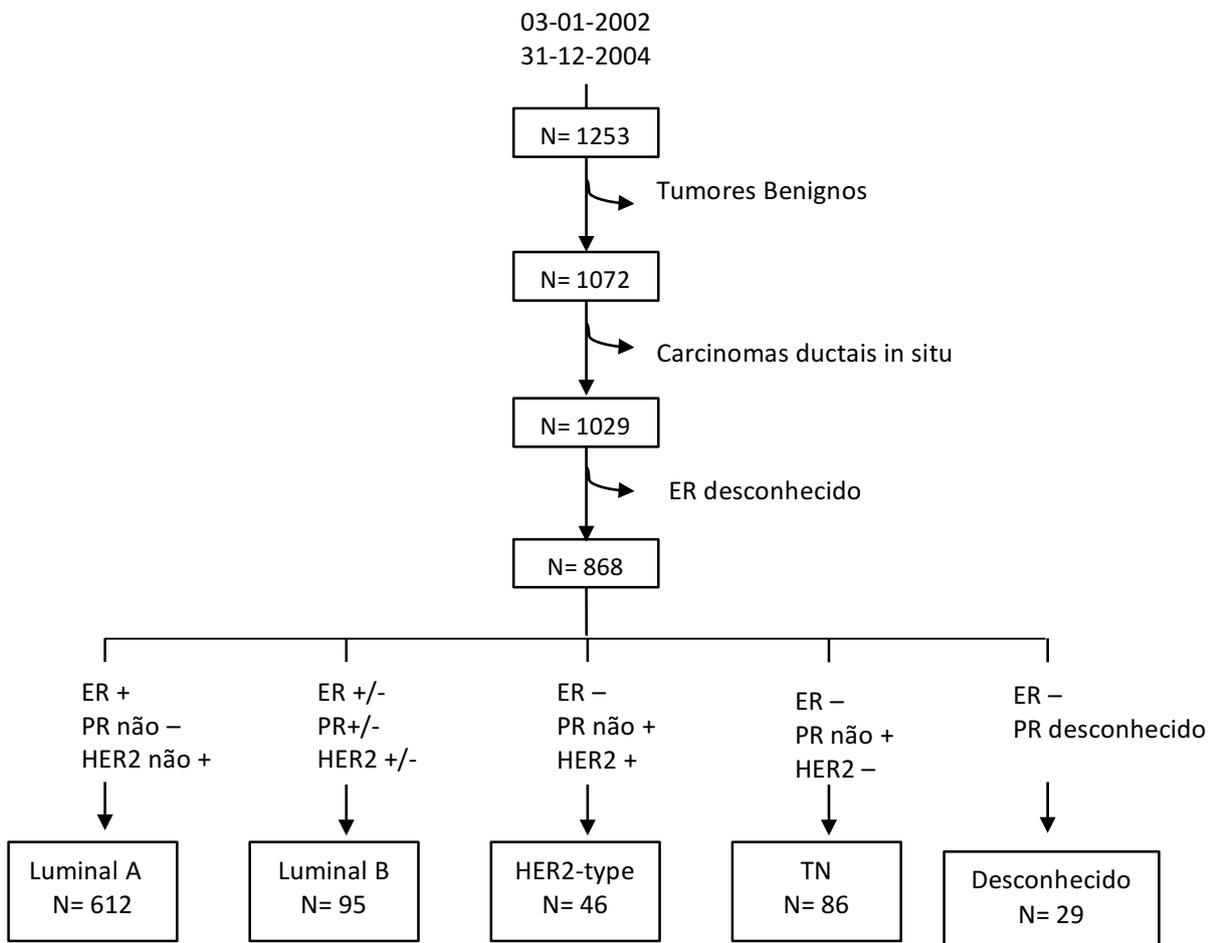


Figura 1: Fluxograma do estudo.

Resultados

Foram incluídos no estudo 868 doentes, dos quais 89,5% se tratavam de carcinomas ductais invasivos. As características da população geral estão presentes na tabela 1.

Todos os doentes foram submetidos a cirurgia, sendo 53,2% tratados com cirurgia conservadora e 46,4% com mastectomia.

Ao avaliar o tamanho tumoral, observou-se que 43,8% dos tumores se encontravam no estadio T1, 47,5% no estadio T2, 6,5% no estadio T3 e 2,1% no estadio T4, com um tamanho mediano de 20 mm (13-27).

Observou-se a presença de tumores multicêntricos em 5% dos casos.

Cerca de 40,8% dos doentes apresentou metastização ganglionar axilar de pelo menos 1 gânglio linfático.

Relativamente ao grau de diferenciação, 42% dos tumores eram G2 (moderadamente diferenciados), 17% eram G1 (bem diferenciados) e 12% eram G3 (pouco diferenciados).

Dos doentes com terapêutica adjuvante conhecida, 59% receberam tratamento com quimioterapia, 78% radioterapia e 67% hormonoterapia, sendo que 15% dos doentes foram submetidos a quimioterapia neoadjuvante (Tabela 2).

Foi avaliado o seguimento dos doentes, por um período mediano 57,5 meses (60,1-

Tabela 1: Caracterização da População.

População em Estudo	
N= 868 (Porcentagem)	
Idade	
≤40	43 (5%)
40-65	439 (51%)
>65	386 (44%)
Tipo histológico	
Carcinoma ductal invasivo	777 (89,5%)
Carcinoma lobular invasivo	19 (2,2%)
Outros	70 (8%)
Desconhecido	2 (0,2%)
Subtipo tumoral	
Luminal A	612 (70,5%)
Luminal B	95 (10,9%)
HER2-type	46 (5,3%)
Tripló Negativo	86 (9,9%)
Desconhecido	29 (3,3%)
Estadio T	
Desconhecido	2 (0,2%)
T1	380 (43,8%)
T2	412 (47,5%)
T3	56 (6,5%)
T4	18 (2,1%)
Gânglios positivos	
Desconhecido	23 (2,6%)
0 gg	491 (56,6%)
1-3 gg	204 (23,5%)
4-9 gg	100 (11,5%)
>10 gg	50 (5,8%)
Tumor múltiplo	
Bilateral síncrono/ sucessivo	70 (8%)
Multicêntrico	42 (4,8%)
Desconhecido	12 (1,4%)
Invasão Vascular	
Presente	176 (20,3%)
Ausente	499 (57,5%)
Desconhecido	193 (22,2%)
Grau diferenciação	
G1	147 (16,9%)
G2	362 (41,7%)
G3	105 (12,1%)
Desconhecido	248 (28,6%)
Cirurgia	
Conservadora	462 (53,2%)
Mastectomia	403 (46,4%)
Outros	3 (0,3%)
Seguimento	
nº de meses. Mediana (variação interquartil)	57,5 (60,1-105,9)

105,9). De acordo com o protocolo da instituição, os doentes sem evidência de progressão da doença (recidiva loco-regional ou metastização sistémica) em 5 anos podem ter alta clínica, sendo este o último registo de seguimento. Verificou-se recidiva loco-regional em 62 doentes e metastização sistémica em 156 casos.

Aos 57,5 meses (60,1-105,9), tinham ocorrido 251 falecimentos, 140 dos quais relacionados com a progressão tumoral (Tabela 2).

Tabela 2: Terapêutica adjuvante e neoadjuvante na população em estudo (esquerda) e eventos durante o seguimento (direita). QT - quimioterapia; RT - radioterapia; HT – hormonoterapia.

Terapêutica adjuvante e neoadjuvante		Eventos durante seguimento	
População Geral N= 868 (Percentagem)		N= 868 (Percentagem)	
Tratamento QT		Seguimento	
Sim	213 (24,5%)	Nº meses. Mediana	57,5 (60,1-105,9)
Não	148 (17,1%)	(variação interquartil)	
Desconhecido	478 (55,1%)	Recidiva loco-regional	
Tratamento RT		Sim	62 (7,1%)
Sim	288 (42,0%)	Não	623 (71,8%)
Não	81 (11,8%)	Desconhecido	183 (21,1%)
Desconhecido	470 (68,5%)	Metastização	
Tratamento HT		Sim	156 (18,0%)
Sim	276 (31,8%)	Não	681 (78,5%)
Não	138 (15,9%)	Desconhecido	31 (3,6%)
Desconhecido	425 (49,0%)	Falecimento	
Tratamento QT neoadjuvante		Sim	251 (28,9%)
Sim	129 (14,9%)	Não	597 (68,8%)
Não	739 (85,1%)	Desconhecido	20 (2,3%)
Desconhecido	0 (0,0%)		

Com base nas características imunohistoquímicas ER, PR e HER2, os 868 tumores em estudo foram divididos nos diferentes subgrupos, e analisadas as características clínicas e anatomopatológicas. A distribuição destas características encontra-se esquematizada na Tabela I em anexo.

Observou-se que o subtipo tumoral mais frequente foi o Luminal A correspondendo a 70,5% dos casos. A divisão pelos restantes grupos resultou em 10,9% de Luminais B, 5,3% de HER2-type e 9,9% de TN (Tabela 1). Foram considerados desconhecidos 29 casos (3,3%), por se tratarem de tumores ER negativos com PR desconhecido, não permitindo a classificação em nenhum dos subtipos, e por isso excluídos da análise estatística.

O diagnóstico de carcinoma da mama foi feito numa idade mediana de 62 anos (52–71). O subtipo Luminal A associou-se a idades mais avançadas, quando comparado com os restantes grupos (p=0,0041)(Figura 2).

O índice de massa corporal (IMC) foi comparado entre os subgrupos, verificando-se que tumores TN se associaram a menores valores de IMC ($p=0,0001$) (Figura 3).

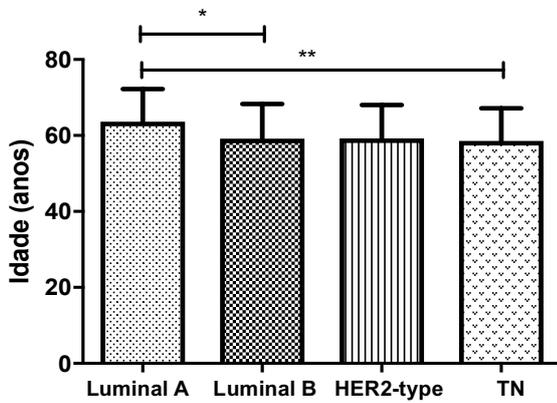


Figura 2: Idade em função dos subtipos tumorais. * $p=0,01$; ** $p=0,001$;

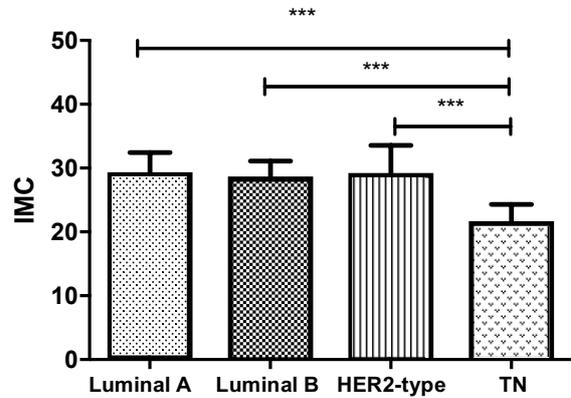


Figura 3: Índice de massa corporal (IMC) em função dos subtipos tumorais. *** $p=0,0001$

Em todos os subgrupos, o tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal invasivo.

O subtipo HER2-type associou-se mais frequentemente à presença de tumores multicêntricos (em 8,7% dos casos), quando comparado com os restantes grupos (entre 3,5 e 4,9%; $p=0,01$)(Figura 4).

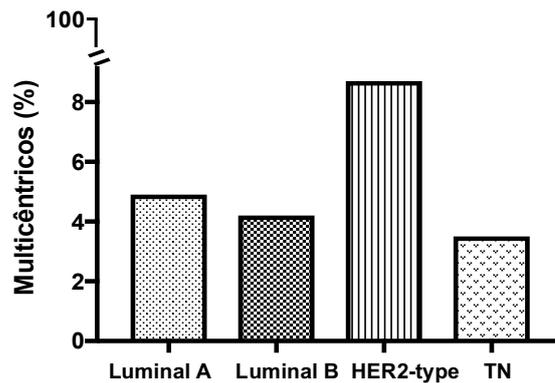


Figura 4: Percentagem de tumores multicêntricos em função dos subtipos tumorais.

Relativamente ao tamanho tumoral, observou-se que HER2-type e TN se associaram a tumores de maiores dimensões ($P < 0,0001$) (Figura 5). Especificamente observaram-se 57,8% de tumores T1 no grupo Luminal A e 59,2% no Luminal B. HER2-type e TN associaram-se a maior percentagem de tumores T2 ou superiores (70% e 66,6%, respetivamente).

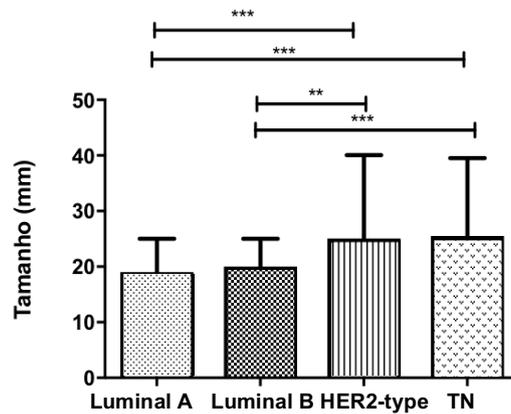


Figura 5: Tamanho tumoral em função dos subtipos tumorais. ** $p=0,001$; *** $p=0,0001$

O grau de diferenciação G2 foi o mais frequentemente encontrado em todos os grupos tumorais, com exceção dos TN onde a percentagem de tumores G3 foi superior ($p < 0,0001$) (Figura 6).

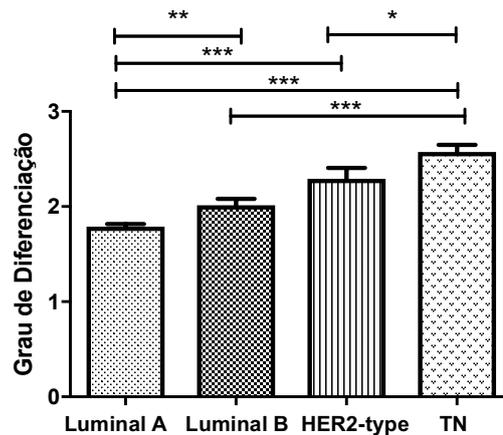


Figura 6: Grau de diferenciação histológica em função dos subtipos tumorais. * $p=0,01$; ** $p=0,001$; *** $p=0,0001$

Observou-se invasão vascular em cerca de 20,3% dos tumores, sem evidência de disparidade entre os grupos (p=0,8381).

Os subtipos luminal B e HER2-type apresentaram mais probabilidade de metastização ganglionar(p=0,0207). Verificou-se que em 8,4% dos tumores Luminal B e em 6,5% dos HER2-type existia positividade de mais de 10 gânglios, superior ao verificado nos tumores Luminal A (em 5,2%) e TN (em 5,8%) (Figura 7).

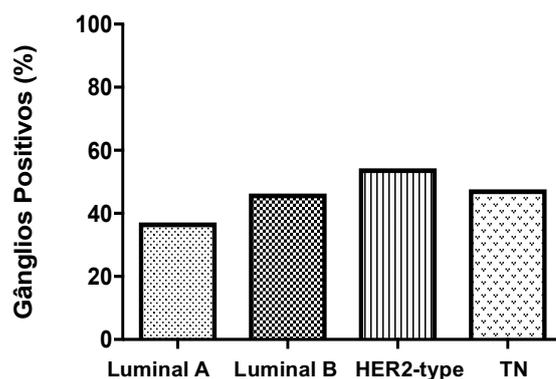


Figura 7: Percentagem de doentes com positividade de pelo menos 1 gânglio linfático em função dos subtipos tumorais.

Doentes com os subtipos Luminal A e B foram mais frequentemente submetidos a cirurgia conservadora (57,4% e 52,6% respetivamente), enquanto doentes com subtipos HER2-type e TN foram mais frequentemente submetidos a mastectomia (63% e 57% respetivamente) (p=0,0054) (Figura 8).

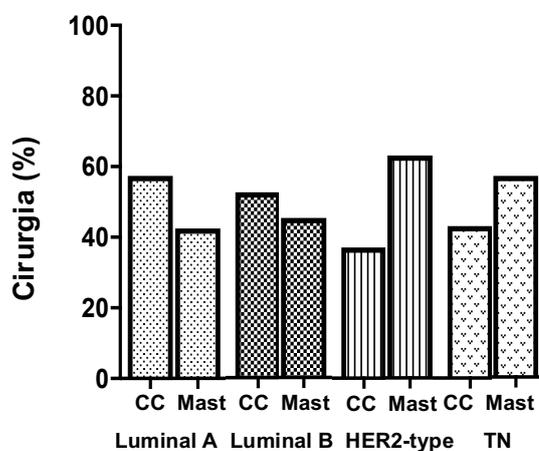


Figura 8: Tipo de cirurgia (percentagem de doentes submetidos) em função dos subtipos tumorais. CC - cirurgia conservadora; Mast - mastectomia.

Foram avaliadas as sobrevivências global e específica de doença, pelas curvas de Kaplan-Meier, tendo sido comparadas entre os subtipos tumorais. Esta avaliação foi realizada para um período de seguimento mediano de 57,5 meses (60,1 -105,9).

Quando divididos por estadios, os doentes em estadio I apresentaram sobrevivência global de 85,9%, estadio II de 69,4% e estadio III de 45,3% ($p < 0,0001$) (Figura 9).

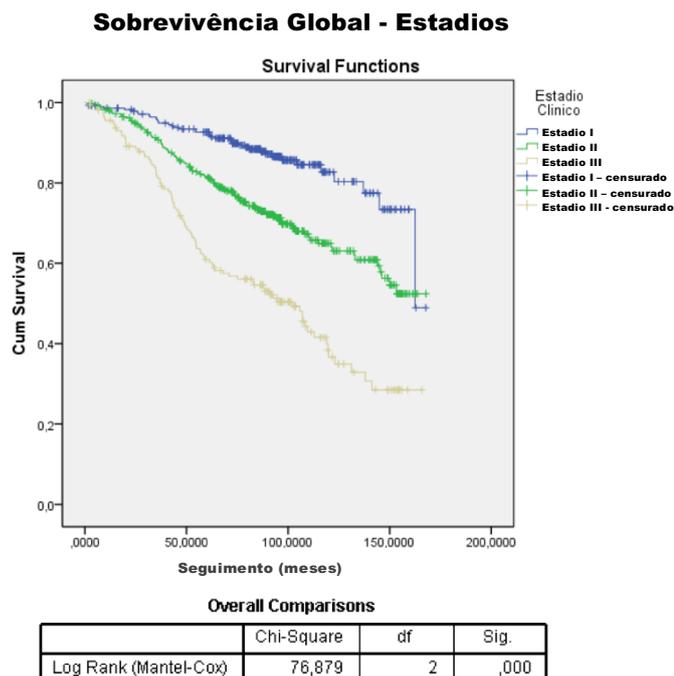
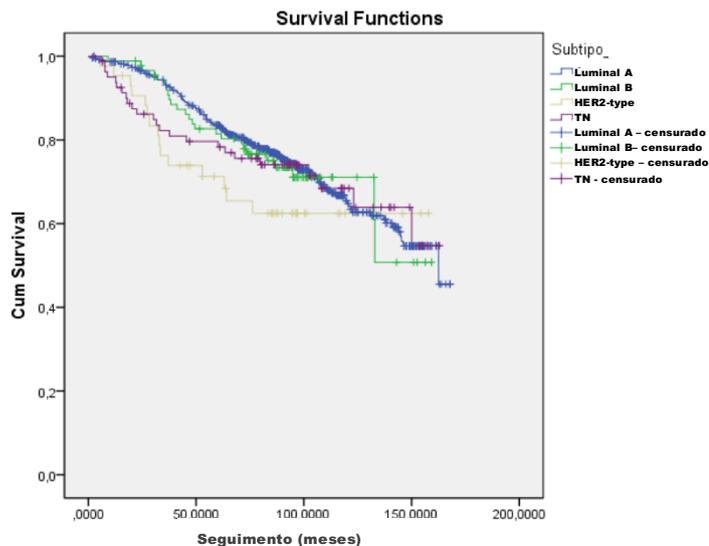


Figura 9: Sobrevivência global em função do estadios clínicos

A sobrevivência global, avaliada em função dos subtipos tumorais, não apresentou diferença entre os grupos ($p=0,419$) (Figura 10).

No entanto, a avaliação da sobrevivência específica de doença mostrou que os subgrupos apresentaram diferentes probabilidades de sobrevivência dependente da doença ($p=0,0001$), tendo sido a menor probabilidade associada a HER2-type (67,4%), sendo nos restantes subgrupos, Luminal A 86,3%, Luminal B 79,5% e TN 79,5% (Figura 10). Esta diferença mantém-se quando as curvas de cada subtipo são ajustadas em função do estadio clínico ($p=0,019$) (Figura 11).

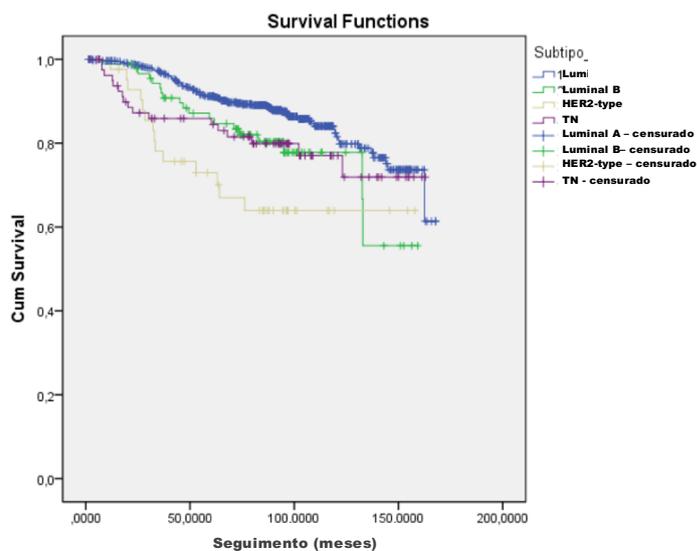
Sobrevivência Global - Subtipos



Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,827	3	,419

Sobrevivência Específica de doença - Subtipos

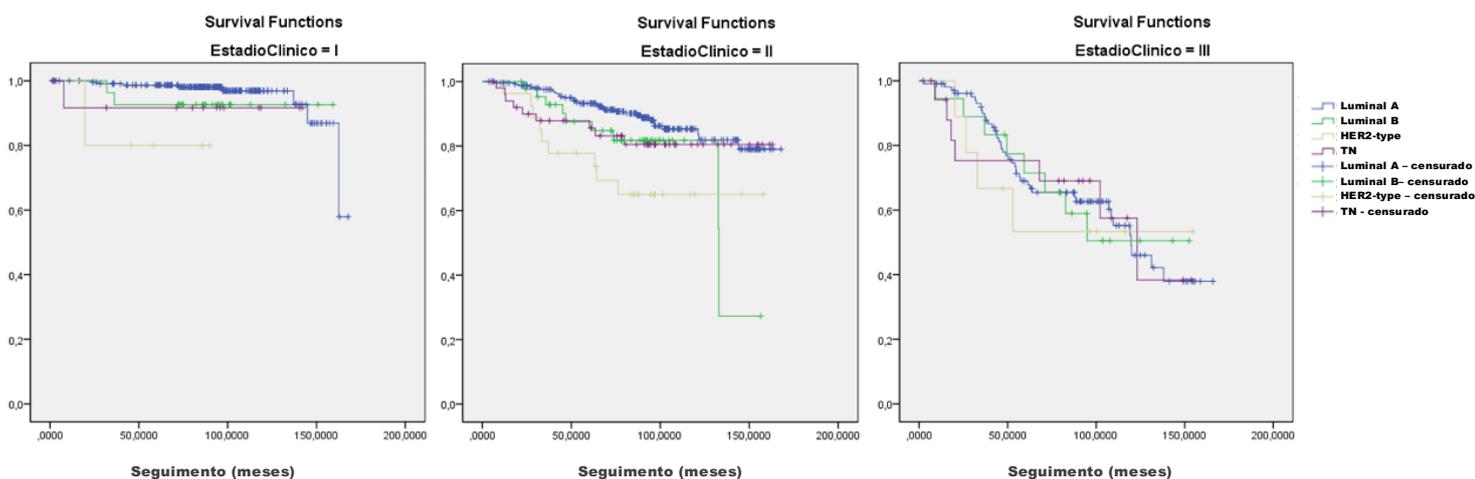


Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	19,121	3	,000

Figura 10: Sobrevivência global (esquerda) e sobrevivência específica de doença (direita) em função dos subtipos tumorais

Sobrevivência Específica de doença – Subtipos e Estádios



Overall Comparisons^a

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	9,897	3	,019

Figura 11: Sobrevivência específica de doença em função dos subtipos tumorais e ajustada ao estadió clínico tumoral.

Discussão

Os tumores da mama constituem um grupo heterogêneo com características biológicas, clínicas e prognósticas distintas, pelo que surgiu a necessidade de os subclassificar.

Em 2000, C. Perou, T. Sorlie e colaboradores, com base em características génicas, identificaram 4 subtipos tumorais intrínsecos principais: luminal-like (ER+) – subdividido em Luminal A e Luminal B; basal-like e Erb-B2+(8,9). Concluíram também que existia uma boa correlação entre alguns genes usados para a subclassificação e achados imunohistoquímicos(8). Estes resultados foram confirmados e validados em trabalhos subsequentes. Contudo, a caracterização multigénica dos tumores da mama por microarrays não é uma técnica facilmente acessível, não sendo possível realizar em todos os doentes(12). Na prática clínica, há frequentemente a necessidade de classificar os tumores através de marcadores imunohistoquímicos, tentando mimetizar os subtipos moleculares génicos de Perou et al. Os subtipos imunohistoquímicos assim definidos, parecem reproduzir as diferenças clínicas e prognósticas dos subtipos moleculares.

Neste sentido, em 2013 o painel de especialistas da 13^o St Gallen International Breast Cancer Conference propuseram uma classificação em 4 subtipos tumorais com base em quatro principais marcadores imunohistoquímicos - ER, PR, HER2 e Ki67(12). Definiram assim: (1)Grupo Luminal A que inclui todos os tumores ER e PR positivos, HER2 negativos, com Ki67 baixo (menor 14-20%) e baixo risco de recorrência (baseado na avaliação multigénica); (2)Grupo Luminal B que inclui os tumores luminais que não cumprem os critérios do grupo anterior; (3)Grupo com sobreexpressão de HER2 que inclui tumores com negatividade para ER e PR, e sobreexpressão de HER2; (4)Grupo Basal-like que corresponde a tumores triplo negativos (ER e PR negativo, HER2 negativo).

Já no decorrer do presente trabalho, foi publicada a 8^o edição do sistema de classificação TNM pela AJCC que confirma a noção da existência de diferenças prognósticas entre subtipos. É de notar a introdução de características tumorais como o grau histológico, a expressão de recetores hormonais (ER e PR) e a sobreexpressão HER2 como moduladores do estadiamento, vindo evidenciar a importância destas características para a decisão terapêutica(17).

Neste estudo, a classificação dos doentes foi baseada apenas nos marcadores imunohistoquímicos e a distribuição pelos diferentes subtipos tumorais intrínsecos demonstrou um predomínio de Luminais A (70,5%) seguido de Luminais B (10,9%), TN (9,9%) e HER-type (5,3%), o que está de acordo com dados encontrados por outros autores(24).

Estudos incluindo populações dos Estados Unidos da América tendem a apresentar uma percentagem de doentes TN superior (15,8% quando comparado com os 9,9% identificados na população em estudo)(25). Esta variação poderá estar relacionada, em parte, com o facto de existir uma maior percentagem de participantes afro-americanos que se verificou terem maior incidência de tumores TN(26).

A concordância da distribuição dos tumores por subtipos tumorais entre diferentes investigações é importante uma vez que permite a comparação dos resultados das mesmas.

Vários autores têm demonstrado que os subtipos luminais tendem a aumentar de incidência com a idade, enquanto que o subtipo TN tende a diminuir (27)(28). Concordante com estes dados foi a associação observada entre o subtipo Luminal A e idades mais avançadas. Algumas teorias têm sido desenvolvidas para justificar este facto, e sugerem que, por se tratarem de tumores mais indolentes, os tumores ER positivos necessitam de mais tempo para crescerem e se manifestarem, razão pela qual só são diagnosticados mais tardiamente(29).

Relativamente ao índice de massa corporal da população em estudo observou-se que o subtipo TN se associava a menores valores de IMC. Este dado foi introduzido na análise porque têm surgido resultados díspares em relação ao impacto da obesidade nos diferentes subtipos tumorais. Alguns investigadores concluem não encontrar qualquer diferença na incidência dos subtipos em função do IMC (30). Por outro lado estudos desenvolvidos com grandes populações têm verificado que existe uma associação entre tumores TN e um IMC superior a 30 kg/m² nas mulheres pré-menopausicas, e uma redução de tumores Luminais A neste mesmo grupo (31)(32).

Surgem por isso algumas questões em relação a este resultado paradoxal e qual o seu significado. Em 2006, T. Picerno e colaboradores estudaram a influência da obesidade e da raça nos tumores triplo-negativos. Concluíram que o IMC de mulheres

Caucasianas é significativamente menor que o de mulheres Afro-Americanas(33). Concluíram também que quando comparado com tumores ER positivos (em mulheres caucasianas), os tumores TN têm significativo menor IMC o que é concordante com os resultados identificados no presente estudo (que retrata uma população maioritariamente caucasiana)(33). Porém são necessários mais estudos de forma a confirmar estes resultados e identificar um possível significado clínico.

Observou-se uma maior proporção de tumores multicêntricos no subtipo HER2-type que nos restantes grupos tumorais, em concordância com outros dados publicados, que associam maior frequência desta multiceutralidade em subgrupos com sobreexpressão de HER2(34,35). Admite-se que a multiceutralidade/multifocalidade seja uma característica desta biologia (expressão de HER2), que confere a este subgrupo maior agressividade loco-regional, e que contrasta com a biologia luminal. Esta última aparenta ter um crescimento mais unifocal e ao longo de um ducto único.

Parece haver também uma associação entre a sobreexpressão de HER2 e um maior envolvimento dos gânglios linfáticos locais, já que os subtipos Luminal B e HER2-type apresentaram maior número de gânglios linfáticos metastizados, quando comparados com os tumores Luminal A e TN. Esta hipótese é apoiada por estudos anteriores que definem a presença de HER2 como um fator preditor independente para a presença de metástases ganglionares(36).

Uma vez que a abordagem terapêutica é condicionada pelo estadio tumoral, a associação de tumores de maiores dimensões com os subtipos HER2-type e TN, assim como a maior percentagem de multiceutralidade nos tumores HER2-type, podem justificar a maior frequência de mastectomias nestes grupos quando comparados com os tumores Luminais,

Observou-se uma baixa proporção de tumores T4 (5 Luminais A, 1 Luminal B, nenhum HER2-type e 1 TN) na população estudada. Este resultado pode ser explicado por ter sido selecionada uma população com de tumores operáveis e porque a classificação T4 é clínica/imagiológica e pode haver défice de registo na recolha de dados retrospectiva.

Os subgrupos HER2-type e TN associaram-se a tumores mais indiferenciados (G3), maior tamanho tumoral e maior número de gânglios linfáticos metastizados na

apresentação. Isto parece traduzir uma maior agressividade biológica nestes subtipos e explicar o pior prognóstico observado nestes doentes.

Quando analisamos a sobrevivência global em função dos estadios clínicos tumorais, como forma de validação interna dos restantes resultados obtidos, observa-se, como espectável, uma relação inversa entre a sobrevivência global e o estadio tumoral.

A avaliação da sobrevivência global da população estudada sugere um pior prognóstico para os subtipos HER2-type e TN, mas esta diferença mostra-se apenas significativa quando avaliamos a sobrevivência específica de doença.

Estas diferenças prognósticas mantêm-se quando se ajustam as curvas de sobrevivência específica de cada subtipo tumoral para os diferentes estadios clínicos. Isto permite inferir que as características biológicas tumorais têm importância prognóstica e que devem ser incluídas na avaliação do doente para além do estadiamento anatómico.

Ao analisar as curvas de sobrevivência observa-se que esta diferença de prognóstico parece ser mais evidente nos primeiros anos após o diagnóstico.

A população em estudo reflete a abordagem terapêutica no período de 2002 a 2004, na qual não era feito tratamento dirigido para tumores com sobreexpressão de HER2, com o anticorpo monoclonal trastuzumab. O uso deste fármaco passou a ser uma abordagem terapêutica com importante papel neste grupo de tumores, melhorando o seu prognóstico(37). Este facto pode justificar a menor sobrevivência específica de doença observada neste grupo, e podendo por isso não corresponder ao verificado num período mais atual.

Limitações do estudo

O presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas.

Desde logo trata-se de um estudo retrospectivo. A base de dados foi construída através de informações de processos clínicos. Dada a falha no registo sistemático e a não revisão de todas as informações dos doentes, obteve-se uma considerável

percentagem de informações desconhecidas, o que pode ter condicionado erros de análise.

No período de estudo, as determinações de PR e Ki67 não eram feitas por rotina, o que condicionou não só a exclusão de alguns doentes como pode ter levado a erros na classificação por subtipos tumorais. Ainda assim a distribuição pelos 4 subtipos imunohistoquímicos foi globalmente semelhante ao encontrado por outros estudos, parecendo não ter interferido de forma significativa na divisão por subgrupos tumorais(24).

Em cerca de metade dos doentes não foi possível obter informações acerca do tratamento adjuvante. No entanto estas terapêuticas foram determinadas com o protocolo da instituição.

A dificuldade na identificação de doentes com estadios mais avançados, nomeadamente T4 limitou a extrapolação dos dados a tumores com estas características.

Futuro

Os resultados obtidos apoiam a hipótese de que os diferentes subtipos tumorais constituem entidades individuais, com características biológicas, clínicas e prognósticas próprias e díspares entre si, reforçando a ideia de que devem ser consideradas para a decisão terapêutica desde o momento do diagnóstico.

A recente inclusão de biomarcadores imunohistoquímicos tumorais na classificação TNM suporta esta conclusão.

Mais estudos são necessários de forma a identificar abordagens terapêuticas individualizadas, nomeadamente diferentes abordagens cirúrgicas e terapêuticas adjuvantes/neoadjuvantes para os diferentes tipos tumorais, que se adequem ao comportamento intrínseco de cada subtipo tumoral.

Conclusão

Os resultados permitem concluir que a caracterização imunohistoquímica define 4 subtipos tumorais com características clínicas próprias.

Os tumores Luminais associaram-se a idades mais avançadas, menor tamanho tumoral, mais baixo grau de diferenciação e menor número de gânglios positivos no diagnóstico.

Por outro lado, os subtipos HER2-type e TN associaram-se mais frequentemente a características de maior agressividade tumoral, como maior tamanho tumoral, maior grau histológico e maior número de gânglios positivos. Concordante com estes resultados, têm uma menor sobrevivência global e específica de doença.

Em conclusão, os subtipos imunohistoquímicos apresentam diferentes probabilidades de sobrevivência específica de doença, mesmo quando ajustados aos estádios clínicos. Estes resultados apoiam a hipótese de que os subtipos tumorais têm importância clínica e que existe benefício da sua introdução nos sistemas de estadiamento e decisão terapêutica.

Anexos

Tabela I – Distribuição das características por subtipos tumorais. (IMC – índice de massa corporal. *Para avaliação do tamanho tumoral e estadiamento T, foram excluídos os doentes submetidos a quimioterapia neo-adjuvante.)

Distribuição das características por subtipos tumorais

	Luminal A N= 612	Luminal B N= 95	HER2-type N= 46	TNBC N=86	p (ANOVA)
<u>Tipo histológico</u>					
Carcinoma ductal invasivo	544 (88,9%)	89 (93,7%)	41 (89,1%)	77 (89,5%)	
Carcinoma lobular invasivo	17 (2,8%)	0 (0,0%)	2 (4,3%)	0 (0,0%)	
Carcinoma metaplásico	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (8,1%)	
Carcinoma mucinoso	14 (2,3%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Outro	36 (5,9%)	4 (4,2%)	3 (6,5%)	2 (2,3%)	
desconhecido	1 (0,2%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<u>Idade (anos)</u>					
≤40	26 (4%)	7 (7%)	2 (4%)	8 (9%)	
40-65	303 (50%)	56 (59%)	16 (35%)	50 (58%)	
>65	283 (46%)	32 (34%)	28 (61%)	28 (33%)	
Anos, Mediana (variação interquartil)	64(53-72)	59 (50-68)	59 (52-65)	59 (50-67)	p<0,0041
<u>IMC</u>					
Mediana(Variação interquartil)	29 (26-32)	29 (25-31)	29 (24-33)	28 (25-30)	p<0,0001
<u>Tamanho (n=739)*</u>					
mm, Mediana(variação interquartil)	19 (12-35)	20 (14-25)	25(18-40)	25,5 (18-38,5)	p<0,0001
<u>Estadio (n=739)*</u>					
Desconhecido	7 (1,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (3%)	
T1	309 (57,8%)	45 (59,2%)	12 (30%)	20 (30,3%)	
T2	194 (36,3%)	29 (38,2%)	26 (65%)	42 (63,6%)	
T3	20 (3,7%)	1 (1,3%)	2 (5%)	1 (1,5%)	
T4	5 (0,9%)	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (1,5%)	
<u>Tumor múltiplo</u>					
Não	517 (84,5%)	70 (73,7%)	32 (69,6%)	71 (82,6%)	
Bilateral síncrono	16 (2,6%)	3 (3,2%)	1 (2,2%)	2 (2,3%)	
Bilateral sucessivo	23 (3,8%)	12 (12,6%)	6 (13,0%)	5 (5,8%)	
Multicêntrico	30 (4,9%)	4 (4,2%)	4 (8,7%)	3 (3,5%)	p 0,0081
Outro tumor	18 (2,9%)	5 (5,3%)	2 (4,3%)	3 (3,5%)	
Desconhecido	8 (1,3%)	1 (1,1%)	1 (2,2%)	2 (2,3%)	
<u>Gg positivos</u>					
Desconhecido	22 (3,6%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
0 gg	363 (59,3%)	50 (52,6%)	21 (45,7%)	45 (52,3%)	
1-3 gg	137 (22,4%)	24 (25,3%)	11 (23,9%)	23 (26,7%)	
4-9 gg	58 (9,5%)	12 (12,6%)	11 (23,9%)	13 (15,1%)	
>10 gg	32 (5,2%)	8 (8,4%)	3 (6,5%)	5 (5,8%)	p0,0207
<u>Invasão Vascular</u>					
Presente	120 (19,6%)	22 (23,2%)	8 (17,4%)	20 (23,3%)	
Ausente	355 (58,0%)	54 (56,8%)	25 (54,3%)	49 (57,0%)	
Desconhecido	137 (22,4%)	19 (20,0%)	13 (28,3%)	17 (19,8%)	p 0,8381
<u>Grau diferenciação</u>					
G1	129 (21,1%)	10 (10,5%)	3 (6,5%)	3 (3,5%)	
G2	271 (44,3%)	48 (50,5%)	16 (34,8%)	20 (23,3%)	
G3	37 (6,0%)	11 (11,6%)	12 (26,1%)	38 (44,2%)	
Desconhecido	171 (27,9%)	26 (27,4%)	15 (32,6%)	23 (26,7%)	p<0,0001
Inaplicável	4 (0,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (2,3%)	
<u>Cirurgia</u>					
Conservadora	351 (57,4%)	50 (52,6%)	17 (37,0%)	37 (43,0%)	
Mastectomia	260 (42,5%)	43 (45,3%)	29 (63,0%)	49 (57,0%)	
Outros	1 (0,2%)	2 (2,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Desconhecido	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	p 0,0054
<u>Falecimento</u>					
Sim	170 (27,8%)	24 (25,3%)	15 (32,6%)	24 (27,9%)	
Não	427 (68,9%)	64 (67,4%)	28 (60,9%)	59 (68,6%)	
Desconhecido	15 (2,5%)	7 (7,4%)	3 (6,5%)	3 (3,5%)	
<u>Falecimento por progressão</u>					
Sim	82 (13,4%)	18 (18,9%)	14 (30,4%)	17 (19,8%)	
Não	515 (84,2%)	70 (73,7%)	29 (63,0%)	66 (69,5%)	
Desconhecido	15 (2,5%)	7 (7,4%)	3 (6,5%)	3 (3,5%)	
<u>Recidiva loco-regional</u>					
Sim	31 (5,1%)	11 (11,6%)	8 (17,4%)	7 (8,1%)	
Não	445 (72,7%)	67 (70,5%)	30 (65,2%)	61 (70,9)	
Desconhecido	136 (22,2%)	17 (17,9%)	8 (17,4%)	18 (20,9%)	
<u>Metastização</u>					
Sim	95 (15,5%)	22 (23,1%)	15 (32,6%)	19 (22,1%)	
Não	499 (81,5%)	69 (72,6%)	27 (58,7%)	65 (75,6%)	
Desconhecido	18 (2,9%)	4 (4,2%)	4 (8,7%)	2 (2,3%)	

Referências Bibliográficas

1. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459–544.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
3. Polyak K. Review series introduction Heterogeneity in breast cancer. *JClinInvest*. 2011;121(10):2011–3.
4. Pourteimoor V, Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biol*. 2016;37(11):14479–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-5349-7>
5. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015;8(1):23–31.
6. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955–60.
7. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *Jama*. 2003;289(11):1421–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12636465>
8. Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, Rijn M Van De, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;533(May):747–52.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869–74. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11553815
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC58566/pdf/pq010869.pdf>

10. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015;24:S26–35.
11. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3):382. Available from: <http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i3/382.htm>
12. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23.
13. Inwald EC, Koller M, Klinkhammer-Schalke M, Zeman F, Hofstädter F, Gerstenhauer M, et al. 4-IHC classification of breast cancer subtypes in a large cohort of a clinical cancer registry: use in clinical routine for therapeutic decisions and its effect on survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;153(3):647–58.
14. Vasconcelos I, Hussainzada A, Berger S, Fietze E, Linke J, Siedentopf F, et al. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *Breast*. 2016;29:181–5.
15. Guarneri V, Conte P. Metastatic Breast Cancer: Therapeutic Options According to Molecular Subtypes and Prior Adjuvant Therapy. *Oncologist*. 2009;14(7):645–56. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2009-0078>
16. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:2725–32.
17. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA. Breast Cancer — Major

- Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *A Cancer Journals Clin.* 2017;67(0):290–303.
18. American Joint Committee on Cancer (AJCC); Breast. In: *AJCC Cancer Staging*, 8th Ed, Chicago, Illinois, 2017
 19. Houssami N, MacAskill P, Von Minckwitz G, Marinovich ML, Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2012;48(18):3342–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.023>
 20. Pan X-B, Chen R-J, Huang S-T, Jiang Y-M, Zhu X-D. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of breast conservation therapy followed by radiotherapy in four breast cancer subtypes. *Oncotarget.* 2017;8(34):57414–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28915682><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5593653>
 21. Pan X-B, Qu S, Jiang Y-M, Zhu X-D. Triple Negative Breast Cancer versus Non-Triple Negative Breast Cancer Treated with Breast Conservation Surgery Followed by Radiotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Breast Care.* 2015;10(6):413–6. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000441436>
 22. Millar EKA, Graham PH, O’Toole SA, McNeil CM, Browne L, Morey AL, et al. Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4701–8.
 23. Lannin DR, Wang S. Are Small Breast Cancers Good because They Are Small or Small because They Are Good? *N Engl J Med.* 2017;376(23):2286–91. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMs1613680>
 24. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5).

25. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(35):e4614. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0005792-201608300-00038>
26. Eberlein TJ. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Yearb Surg*. 2007;2007(21):304–5.
27. Jenkins EO, Deal AM, Anders CK, Prat A, Perou CM, Carey LA, et al. Age-Specific Changes in Intrinsic Breast Cancer Subtypes: A Focus on Older Women. *Oncologist*. 2014;19(10):1076–83. Available from: <http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2014-0184>
28. Kalantari-khandani B, Tavakkoli L, Moaazed V. Breast Cancer Subtypes (ER , PR and HER2), Age and Pathologic Characteristics at Diagnosis in Breast Cancer Patients in. 2017;2.
29. Balducci, L; Lyman, GH; Ershler, WB; Extermann, M. Breast Cancer in the older woman: an oncologic perspective, in: *Comprehensive Geriatric Oncology*. 2nd Editio. London, Taylor & Francis; 2004.
30. Petekkaya I, Sahin U, Gezgen G, Solak M, Yuce D, Dizdar O, et al. Association of breast cancer subtypes and body mass index. *Tumori*. 2013;99(2):129–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748802>
31. Sahin S, Erdem GU, Karatas F, Aytekin A, Sever AR, Ozisik Y, et al. The association between body mass index and immunohistochemical subtypes in breast cancer. *Breast*. 2017;32:227–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2016.09.019>
32. Kimura K, Tanaka S, Iwamoto M, Fujioka H, Takahashi Y, Satou N, et al. Association between body mass index and breast cancer intrinsic subtypes in Japanese women. *Exp Ther Med*. 2012;4(3):391–6.
33. Picerno T, Damewood A, Sims-Mourtada J. Obesity and race as risk factors in triple-negative breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2016):189–90.

34. Cheng SH-C, Yu B-L, Horng C-F, Tsai SY, Chen C-M, Chu N-M, et al. Long-term survival and stage I breast cancer subtypes. *J Cancer Res Pract* [Internet]. 2016;3(1):1–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2311300615000063>
35. Ha R, Jin B, Mango V, Friedlander L, Miloshev V, Malak S, et al. Breast cancer molecular subtype as a predictor of the utility of preoperative MRI. *Am J Roentgenol*. 2015;204(6):1354–60.
36. Ahmed ARH. HER2 expression is a strong independent predictor of nodal metastasis in breast cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* [Internet]. 2016;28(4):219–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2016.09.002>
37. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10075):1195–205. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32616-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32616-2)