



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

**Associação entre a deficiência de vitamina D e o
perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em
mulheres na pós-menopausa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas

Co-Orientadora: Profa. Dra. Heloisa De Luca Vespoli

Botucatu

2017

BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

**Associação entre a deficiência de vitamina D e
o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama
em mulheres na pós-menopausa**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu para obtenção do
Título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

**Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas
Co-Orientadora: Profa. Dra. Heloisa De Luca Vespoli**

**Botucatu
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida Filho, Benedito de Sousa.

Associação entre a deficiência de vitamina D e o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa / Benedito de Sousa Almeida Filho. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientador: Heloisa de Luca Vespoli

Capes: 40101150

1. Vitamina D. 2. Deficiência de vitamina D. 3. Mamas - Câncer. 4. Câncer - Prognóstico. 5. Pós-menopausa. 6. Menopausa.

Palavras-chave: Câncer de mama; Menopausa; Prognóstico; Vitamina D.

Dedicatória

Dedico esta obra...

Aos meu pais, Benedito e Iracema, e à minha irmã, Mone Ellen, pelos valiosos ensinamentos, incentivo e dedicação durante toda minha vida

À professora livre docente Eliana Aguiar Petri Nahás, não só pela grande oportunidade e confiança de trabalhar sob a sua orientação na realização desta obra, mas pelo verdadeiro privilégio de aprendizado, incentivo e exemplo de pesquisadora

Ao professor doutor Gilberto Uemura (*in memoriam*), palavras não são suficientes para descrever minha admiração e a imensa saudade que sinto da sua companhia e ensinamentos. Tenho certeza que para sempre estará ao meu lado, guiando meus passos e abençoando os meus caminhos.

Agradecimentos

A Deus, que sempre me fortalece, tornando-me capaz de crescer e aprimorar meus conhecimentos como médicos e ser humano

A todos os professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, que durante meus anos de residência tanto contribuíram para minha formação médica e pessoal e motivaram a vontade de ensinar.

À professora dra Heloisa Vespoli, pela atenção, ensinamentos e coorientação na confecção desta obra

Aos Doutores Eduardo Pessoa e Carla Pessoa, ilustres médicos e amigos, com os quais tive a honra de aprender a arte de Mastologia

Aos colegas médicos Leonardo Oliveira e Gildo Gardinalli, grandes companheiros de residência, pelo apoio e ajuda na realização da coleta de dados

A todas as queridas pacientes que permitiram a realização deste trabalho e que me fazem acreditar na arte de ser médico

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Auxílio à Pesquisa- Processo nº 2014/19832-3

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	8
Resumo	9
Abstract	11
1. Introdução	14
2. Objetivo	34
3. Métodos	35
4. Publicação	
4.1. Artigo Original	41
<i>“Pretreatment vitamin D deficiency is associated with poor prognostic features for breast cancer in postmenopausal women”.</i>	
5. Conclusões	71
6. Referências	72
7. Anexos	
7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	93
7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D- 1,25-diidroxivitamina D

25(OH)D- 25 hidrovitamina D

ACS - *American Cancer Society*

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

ASCO - *American Society of Clinical Oncology*

CAP - *College of American Pathologists*

CONCORD- *Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study*

EUA - Estados Unidos da América

FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*

FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu

HER2- receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2,

IGF-1 - Fator de Crescimento Insulina-Like-1

IMC – Índice de Massa Corpórea

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IOF- *International Osteoporosis Foundation*

IQ - Imunohistoquímica

Ki67- Atividade Proliferativa Epitelial

MDM2- *Mouse double minute 2 homolog*

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NCEP/ATP III - *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III*

OMS- Organização Mundial da Saúde (OMS)

OR - *Odds Ratio*

PTH- Paratormônio

RE – Receptor de Estrogênio

RP- Receptor de Progesterona

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG - Triglicerídeos

TH - Terapia Hormonal

UNESP- Universidade Estadual Paulista

VD- Vitamina D

VDBP - Proteína de ligação à Vitamina D

VDR – Receptor de Vitamina D

WHI - *Women's Health Initiative*

WHO - *World Health Organization*

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre a deficiência de vitamina D (VD) e o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

Métodos: Realizou-se estudo clínico de corte transversal com 192 mulheres, idade entre 45-80 anos, atendidas em Hospital Universitário. Foram incluídas mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama, em amenorréia >12 meses e idade ≥ 45 anos, sem uso de medicações ou condições clínicas que interfiram nos valores da VD. Por meio de entrevista foram coletados dados clínicos e antropométricos. Foi solicitada dosagem sérica de 25 hidrovitamina D [25(OH)D], 20-30 dias após o diagnóstico do câncer de mama. Foi considerada deficiência de VD valores séricos de 25(OH)D < 30ng/mL. Foram coletados dados sobre o câncer de mama (histopatológico, grau, estágio do tumor, linfonodos) e o status hormonal (receptor de progesterona, RP; receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2, HER2) e a atividade proliferativa epitelial (Ki67). Para análise estatística foram empregados o teste t-student, a Distribuição Gama (variáveis assimétricas), o teste do Qui-quadrado e a regressão logística (odds ratio-OR).

Resultados: O valor médio de 25(OH)D foi de 25,8 ng/mL (12,0 a 59,2 ng/mL). Valores suficientes de VD foram detectados em 65 pacientes (33,8%) e deficientes em 127 (66,2%). Estas apresentaram maior proporção de tumores de alto grau e estágio 3, maior comprometimento linfonodal, menor proporção de tumores RE e RP positivos e maior Ki-67 ($p < 0.05$). As pacientes com VD suficiente apresentaram maior ocorrência de tumores luminal A e luminal B (80,0%) quando comparadas aquelas com hipovitaminose D (65,2%) ($p < 0.05$). Todos os casos de tumores triplos negativo foram detectados em mulheres com deficiência de VD. A análise multivariada, ajustada para

idade, tempo de menopausa e índice de massa corpórea, mostrou que pacientes com deficiência de VD apresentaram maior risco para ocorrência de tumores RE negativo (OR 4.18, CI 95% 1.17-15.87, $p=0.034$) e Ki-67 positivo (OR 2.78, CI 95% 1.34-66.65, $p=0.005$) e com comprometimento linfonodal axilar (OR 2.26, CI 95% 1.10-5-16, $p=0.043$).

Conclusão: Em mulheres na pós-menopausa com câncer de mama observou-se associação entre a deficiência de VD e tumores com perfil imuno-histoquímico de pior prognóstico. A deficiência de vitamina D mostrou-se como fator de risco para tumores RE negativos, com axila positiva e maior taxa de proliferação celular.

Abstract

Objective: To evaluate the association between vitamin D (VD) deficiency and the breast cancer immunohistochemical profile in postmenopausal women.

Methods: An analytical cross sectional study was conducted with 192 women, aged 45-75 years, attended at University Hospital. Women with recent diagnosis of breast cancer, in amenorrhea > 12 months and age ≥ 45 years, without medication use or clinical conditions that interfere with vitamin D values were included. Clinical and anthropometric data were collected. Serum level of 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] was measured in all patients, 20 to 30 days after breast cancer diagnosis, and values of 25(OH)D <30ng / mL were considered as VD deficiency. Data on breast cancer (histopathology, grade, tumor stage, lymph nodes), hormone status (estrogen receptor, ER, progesterone receptor, PR, human epidermal growth factor receptor-2, HER2) and epithelial proliferative activity (Ki67) were collected. For statistical analysis, the t-student test, the Gamma Distribution (asymmetric variables), the chi-square test and the logistic regression (OR-odds ratio) were used.

Results: The median 25(OH)D level was 25.8 ng/ml (range 12.0 to 59.2 ng/ml). Sufficient vitamin D levels were detected in 65 patients (33.8%), while deficient levels in 127 cases (66.2%). Participants with deficient 25(OH)D levels had a higher proportion of tumors with a high grade and stage 3, more positive lymph node, a lower proportion of ER, PR positives tumors and higher Ki-67 ($p < 0.05$). Patients with normal vitamin D had higher frequency of luminal A and luminal B (80%) when compared to patients with vitamin D deficiency (65,2%) ($p < 0.05$). Further, all cases of triple negative were detected in vitamin D deficient women. Multivariate analysis, after adjusting for

age, time since menopause and BMI, showed that a deficient level of vitamin D was an independent prognostic indicator of positive axilar lymph node (OR 2.26, CI 95% 1.10-5-16, $p=0.043$), negative estrogen receptor (OR 4.18, CI 95% 1.17-15.87, $p=0.034$), and positive Ki-67 (OR 2.78, CI 95% 1.34-66.65, $p=0.005$).

Conclusions: In postmenopausal women with breast cancer, there was an association between VD deficiency and tumors with worse immunohistochemical profile. Vitamin D deficiency was shown to be a risk factor for ER negative tumors, with positive axilla and higher rate of cell proliferation.

1. Introdução

1.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2015, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres. É a principal causa mundial de morte por câncer em mulheres, com cerca de 520 mil mortes estimadas por ano.¹ O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima para o biênio 2016-2017, que sejam diagnosticados 57.960 casos novos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama corresponde a 28,1% dos casos de câncer em mulheres.²

Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos), antecedentes familiares, uso de anticoncepcionais orais e de terapia hormonal estão estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama.¹ Contudo, a idade é o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente próximo aos 50 anos, e posteriormente, ocorrem de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é atribuída ao início da menopausa. De fato, cerca de 70% dos casos ocorrem em mulheres acima dos 50 anos.²

A prevenção primária dessa neoplasia não é possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia.

Até o momento, a mamografia, para mulheres com idade entre 40 e 69 anos, é recomendada como método efetivo de rastreamento para detecção precoce constituindo o método ideal para identificação de lesões subclínicas.^{1, 3} O prognóstico das pacientes com câncer de mama é diretamente relacionado ao estágio da doença no momento do diagnóstico. A sobrevida em cinco anos de pacientes com estágio I é de 98% e estágio IV de 16%.¹ O diagnóstico precoce do câncer de mama é fundamental para que ocorra uma redução da mortalidade pela doença. No Brasil, o rastreamento mamográfico para mulheres de 50 a 69 anos é a estratégia recomendada para controle do câncer de mama.²

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente pelo diagnóstico em estágios avançados.² Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos da doença é de 61%, sendo que nos países em desenvolvimento é de 57% e nos países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 78%. De acordo com dados de 2016, do *American Cancer Society* (ACS), a taxa de sobrevida em 5, 10 e 15 anos para o câncer de mama são 89%, 83%, e 78%, respectivamente.¹ Entre 2003 a 2012, o rastreamento mamográfico populacional nos Estados Unidos proporcionou uma redução na taxa de mortalidade de câncer de mama de 1,9% por ano em mulheres brancas e de 1,4% ao ano em mulheres negras,¹ sendo que a taxa de mortalidade por câncer de mama em geral diminuiu 36% de 1989-2012, devido a melhorias na detecção precoce e tratamentos mais eficazes para a doença.⁴ Em relação ao câncer de mama na América do Sul e Central, o estudo CONCORD-2 (*Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study*) encontrou aumento nas taxas de sobrevida câncer-específica

entre 1995-1999 e 2005-2009, principalmente no Brasil, de 78% para 87%, respectivamente.⁵ Em relação à sobrevida global em 10 anos no Brasil, apenas dois estudos avaliaram informações coletadas em registros de base populacional, ambos evidenciando sobrevida global de 41,5% entre 1998 e 2000 e de 57,8% entre 1995 e 2003.⁶ Estes dados, mesmo escassos, diferem consideravelmente em relação a países desenvolvidos possivelmente em decorrência da ausência de um programa eficaz de rastreamento populacional e por uma cobertura mamográfica inadequada no Brasil.

1.2. Fatores Prognósticos do Câncer de Mama

O câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de tumores com vários subtipos morfológicos, resultando em diferentes comportamentos biológicos, de apresentação e de prognóstico. Classicamente, pode-se inferir o prognóstico do câncer de mama por fatores e biomarcadores que fornecem informações sobre o potencial biológico e clínico.⁷ Os fatores clinicopatológicos como idade, status menopausal, tamanho do tumor, comprometimento axilar, histologia, grau e estágio do tumor são úteis na estimativa do prognóstico. Sua aplicação baseia-se nas recomendações de consensos multidisciplinares como do *College of American Pathologists* (CAP) e do *American Society of Clinical Oncology* (ASCO).⁸⁻¹² Considerando a idade, as pacientes com câncer de mama com idades inferior a 40 anos têm um prognóstico pior que aquelas na peri e pós-menopausa com idade superior a 50 anos.¹³ O estado dos linfonodos axilares é fator prognóstico importante na ausência de metástases à distância e está fortemente correlacionado com a evolução da doença. O prognóstico torna-se pior à medida que aumenta o número de linfonodos positivos.¹⁴⁻²⁰ Após o estado axilar, o tamanho do tumor é importante fator prognóstico relacionado à

sobrevida global. O risco de recorrência da doença aumenta proporcionalmente à medida que o tamanho do tumor aumenta.^{21,22}

Os carcinomas de mama invasivos podem ser classificados com base em suas características morfológicas, como tipo histológico ou grau de diferenciação. Ambos são importantes marcadores prognósticos. Atualmente, recomenda-se empregar o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizado em 2012, que reconhece 20 diferentes tipos histológicos.^{23,24} O grau do tumor é um importante componente da avaliação patológica. Atualmente, a graduação histológica de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis conhecida como o Sistema de Classificação de *Nottingham*²⁵ é o sistema de gradação amplamente aceito nos EUA, na Europa e em outras partes do mundo.^{26,27} Este sistema de classificação baseia-se na avaliação semiquantitativa das características morfológicas do tumor, incluindo a formação dos túbulos, o pleomorfismo e a contagem mitótica. Cada parâmetro é avaliado e atribuído um valor de 1 (favorável) a 3 (desfavorável), e as pontuações de todas as três categorias são somadas. Uma pontuação combinada de 3-5 pontos é designada como grau 1 (baixo grau), de 6 ou 7 pontos grau 2 (grau intermediário) e de 8 ou 9 pontos grau 3 (alto grau).²⁵

Para o estadiamento do câncer de mama emprega-se a 7ª edição do sistema TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) de 2010, que considera o tamanho e extensão do tumor local (T), comprometimento de linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M).²⁸ Após a atribuição dessas categorias, o câncer de mama pode ser agrupado em cinco estágios (0-IV). O uso rotineiro do estadiamento permite a identificação efetiva das opções de tratamento e fornece informações prognósticas de base, podendo ser organizado em grupos prognósticos. Mais recentemente, a *National*

Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology dividiu o estadiamento do câncer de mama em três categorias: câncer de mama invasivo localizado (estágio I, II e T3 N1 M0, considerado câncer de mama localmente avançado operável), câncer de mama invasivo localmente avançado inoperável (estágio III, Exceto T3 N1 M0) e doença metastática (estágio IV).²⁹

Entretanto, tumores que apresentam as mesmas características patológicas clássicas podem ter comportamentos distintos expressos pela sua biologia.³⁰ Atualmente, o padrão biológico do tumor é considerado ferramenta importante não só para o prognóstico, mas também para decidir que modalidade de tratamento é o melhor para cada paciente. Entre as alterações moleculares associadas ao câncer da mama, o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (RP), o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e a taxa de proliferação tumoral (Ki67) são os principais biomarcadores utilizados. A avaliação desses biomarcadores tornou-se um fator essencial na avaliação de cada câncer de mama diagnosticado. Os ensaios de imunohistoquímica (IQ) tornaram-se o método padrão para essa avaliação e visam demonstrar a presença e localização de proteínas em secções de tecido.³¹ Os ensaios de IQ são acessíveis a pequenos tumores e podem ser realizados em tecido fixado em formol, embebido em parafina, incluindo tecidos de arquivo.

O receptor de estrogênio (RE) e em menor grau, o receptor de progesterona (RP) apresentam papel central como biomarcadores no câncer de mama. Estudos mostram uma relação entre o estado hormonal do tumor e a evolução da doença.³²⁻³⁴ A expressão de RE indica tumor indolente e de crescimento lento com menor taxa de recorrência. Os tumores RE positivo são frequentemente encontrados em pacientes

mais velhas^{35,36} e bem diferenciados histologicamente.³⁷ Assim como, com mais frequência apresentam metástase para osso, tecido mole, e trato genital, enquanto nos tumores RE negativo, as metástases ocorrem para vísceras e cérebro.^{38,39} A expressão do RP é fortemente dependente da presença de RE. Tumores expressando RPmas não o RE são incomuns e representam 1% de todos os casos de câncer de mama.³³

O gene HER2, localizado no cromossomo 17 que codifica a proteína p185, está envolvido em várias vias regulatórias, incluindo mobilidade celular, invasão, apoptose e proliferação celular, com diversos efeitos na biologia do câncer de mama. A amplificação deste gene e a expressão de sua proteína estão presentes em 15 a 30% dos cânceres de mama e estão associados com alto grau histológico, RE negativo, taxa de proliferação elevada e evolução clínica agressiva.⁴⁰⁻⁴⁵ A paciente com tumor HER2-positivo tem um pior prognóstico que aquela com tumor HER2-negativo. A importância do HER2 na prática clínica também foi enfatizada pelo desenvolvimento de terapias alvo contra esse receptor.

A taxa proliferativa de tumores é uma das características do câncer e reflete um desequilíbrio na proliferação e morte celular. A avaliação imuno-histoquímica de marcadores relacionados à proliferação tem sido utilizada na prática clínica. Ki-67, uma proteína não histônica presente em todas as fases do ciclo de divisão celular,⁴⁶ é o marcador mais comumente utilizado.^{47,48} O índice de marcação Ki-67 que representa a porcentagem de células tumorais que são positivas para a coloração nuclear é considerado fator prognóstico independente para o câncer de mama.⁴⁹ Um índice Ki-67 elevado no diagnóstico está geralmente associado com desfavorável história

natural da doença e pior prognóstico,⁴⁸ mas pontos de corte para taxas de proliferação elevadas são difíceis de determinar.

Mais recentemente, este conceito biológico associado com avanços na análise molecular e sequenciamento genético descreveram uma diversidade de tumores de mama, empregando uma combinação de análises de microarranjo e sequenciamento de DNA, o que proporcionou um refinamento na tomada de decisão no câncer de mama.⁵⁰⁻⁵² Em 2000, Perou *et al.* foram os primeiros a examinar o padrão molecular dos cânceres de mama, e demonstraram que a assinatura molecular de um câncer é determinada pela expressão de um conjunto de genes e que a expressão genética intrínseca pode prever o desfecho clínico da doença.⁵³ Em 2011, no *12th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*, a classificação dos subtipos de câncer da mama realizada através da IQ e da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi adotada para as deliberações sobre estratégias terapêuticas.⁵¹ Nessa conferência foi sustentado o uso do RE, do RP, do HER-2 e do Ki-67 para a classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. Dessa forma, os subtipos clínico-patológicos foram assim classificados: 1- luminal A, RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo e Ki-67 baixo (<14%); 2- luminal B HER-2 negativo, RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo e Ki-67 alto (≥14%); 3- luminal B HER-2 positivo, RE e/ou RP positivos e HER-2 positivo; 3- HER-2 superexpresso (não luminal), RE e RP negativos e HER-2 positivo; 4- triplo-negativo, ausência de expressão de RE, RP e HER-2.⁵¹ A partir de 2011, essa classificação teve grande importância na indicação do tratamento sistêmico do câncer de mama.

Na *13th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*, em 2013, a classificação em subtipos clínico-patológicos foi modificada, considerando-se a avaliação semiquantitativa da expressão dos RP na evolução clínica e a resposta ao

tratamento. Prat *et al.* avaliaram o valor prognóstico da proporção de células que expressavam os genes e a proteína RP nos tumores classificados como luminais A. A fraca positividade dos RP (<20%) pela IQ passou a ser considerada um marcador para luminal B.⁵⁴ Assim, os tumores luminais A passaram a ser definidos como sendo: RE positivo, RP positivo com expressão >20%, HER-2 negativo, Ki-67 <14%. Entre os luminais B HER-2 negativos foram incluídos os tumores RE positivos com RP negativo ou RP expresso em menos de 20% dos núcleos corados, assim como os tumores RE positivos com RP positivo e Ki-67 >14%. Portanto, apenas os tumores de melhor prognóstico foram considerados luminais A, reduzindo proporcionalmente os cânceres classificados nessa categoria.⁵⁵

A avaliação genômica é o padrão ouro para a classificação dos tumores nesses subtipos, mas ela é complexa e tem alto custo, o que dificulta seu uso na prática clínica. No entanto, existe alta concordância entre seus resultados e aqueles fornecidos pela IQ. Isso faz com que esse seja o exame mais utilizado para a classificação molecular, que por sua vez direcionará as terapias alvo.⁵⁵ A importância atual dos subtipos moleculares não pode ser subestimada, pois apresenta diferenças significativas em termos de incidência, fatores de risco, predição de alvos terapêuticos e exibem evolução clínica e de prognóstico únicos.⁵⁶ O subtipo luminal A é o mais frequentemente diagnosticado em 51% dos casos, seguido por Luminal B em 29%, triplo negativo em 17% e não luminal HER2 em 12,5%.⁵⁷ Luminal A está associado a baixo grau histológico e evolução clínica relativamente indolente com melhor prognóstico em comparação aos outros subtipos. Luminal B tem valores mais baixos de expressão de genes relacionados com receptores hormonais e maior expressão de genes relacionados com a proliferação. Demonstrem maior grau histológico e menores

níveis de expressão de receptores RE e RP. Cerca de 30% dos tumores luminais B também super expressam HER2 e estão associados a evolução clínica mais agressiva com pior prognóstico que os cânceres luminal A.⁵⁸⁻⁶⁰ Os tumores luminais A e B diferem na expressão de genes relacionados com a proliferação e muito provavelmente representam dois pólos no espectro do câncer RE-positivo.⁶¹ O índice de proliferação de KI-67 é útil separando luminal B de tumores luminal A. O câncer relacionado com HER2 positivo apresenta elevado índice proliferativo. Estes se associam à menor faixa etária, maior grau histológico, evolução clínica mais agressiva, e são mais propensos a apresentar linfonodos positivos e de mau prognóstico.⁵⁶ O subtipo basal também está associado com um mau prognóstico. Apresentam características histológicas típicas, como padrão de rápido crescimento, presença de áreas de necrose e infiltrado linfocítico denso. Os tumores basais são geralmente triplo-negativos (RE, RP e HER2 negativos).⁶²

1.3. Vitamina D

A vitamina D (VD) é uma vitamina lipossolúvel, essencial para manutenção do esqueleto e para absorção de cálcio. Se proveniente da síntese em animais, é denominada de colecalciferol (vitamina D₃). É adquirida pela dieta pela ingestão de alimentos ricos em óleo de peixe, fígado e ovos. Entretanto, a maior fonte decorre da ativação na pele (derme e epiderme). A partir da exposição aos raios UVB ocorre a ativação na pele (derme e epiderme), do composto 7-deidrocolesterol que se transforma em vitamina D₃, sendo armazenada e liberada pelas células de gordura.⁶³ Essa forma, cuja ativação não é metabólica, necessita das funções hepáticas e renais preservadas. É transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma

hidroxilação no carbono 25, pelo citocromo P450 R21, tornando-se 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol, forma inativa da VD. Para se tornar ativa, a 25(OH)D necessita ainda de uma hidroxilação na posição 1, pelo citocromo P450 27B1, nos túbulos proximais dos rins, sob a ação da enzima 1 α -hidroxilase, transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)2D] ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos biológicos.⁶⁴⁻⁶⁶ A 1,25(OH)2D, produzida no rim, é secretada na circulação sanguínea, ligada à proteína de ligação à vitamina D (VDBP) e, em seguida, transportada para órgãos-alvo, onde induz respostas genômicas e não-genômicas através da interação com o receptor de vitamina D (VDR). Muitas células e tecidos expressam o citocromo P450 27B1 assim como VDR, o que implica que a conversão local de 25(OH)D para 1,25(OH)2D, a forma ativa, possa ocorrer em vários tecidos.⁶⁵

O nome 'vitamina D' é um equívoco histórico. A forma ativa, o calcitriol, pode ser considerada um hormônio, pois é sintetizado em humanos, e submetido a regulação autócrina e interage com receptor nuclear. A VD tem importante e reconhecido papel na mineralização óssea, na concentração de cálcio/fósforo e na regulação da paratireoide.⁶³ A forma ativa da VD regula a transcrição de número expressivo de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea. A VD também modula a transcrição de células do ciclo protéico que diminuem a proliferação celular e aumentam sua diferenciação (precursores de osteoclastos, enterócitos e queratinócitos). Essa propriedade pode explicar a ação da VD na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele.⁶³

Atualmente, a dosagem de 25(OH)D é adequada para se avaliar e monitorizar o status nutricional de VD no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais.^{65,66} Em diretriz clínica da *Task Force*

Norte-Americana, a insuficiência de VD foi definida como valores entre 21–29 ng/ml (52,5–72,5 nmol/l) e a deficiência de VD como valores inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l).⁶⁵ Número crescente de estudos sugere que são necessários valores acima de 30ng/ml para garantir melhor disponibilidade de VD.⁶⁶⁻⁶⁸ Caracterizam-se como hipovitaminose D concentrações plasmáticas de 25(OH)D abaixo do limiar de 30ng/ml, ou seja, do limiar considerado suficiente para manutenção da secreção normal de paratormônio (PTH) pelas paratireoides.⁶⁹ Na insuficiência de VD evidencia-se elevação do PTH circulantes, traduzindo um hiperparatireoidismo secundário, com redução da fração ativa de 1,25(OH)2D, que aumenta a reabsorção óssea.^{66,70} A suplementação diária de VD é capaz de reverter esse quadro de hiperparatireoidismo e impedir a perda óssea em mulheres com idade superior a 50 anos.⁷¹ A deficiência da VD pode ser confirmada pela aferição dos níveis séricos de 25(OH)D. Por outro lado, as concentrações de 1,25(OH)2D estão usualmente dentro dos valores normais de referência ou mesmo aumentada em pacientes deficientes/ insuficientes, razão pela qual não são utilizadas como referência na prática clínica diária.^{66,70}

Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em todo mundo.⁷² Mesmo moradores de regiões próximas a linha do equador, com alta incidência de sol, apresentam valores inadequados de VD. Estudo epidemiológico em 18 países de latitudes variadas, avaliando a prevalência de concentrações plasmáticas de 25(OH)D em mulheres na pós-menopausa, observou valores baixos em quase todo o planeta, sendo que em média 64% das participantes apresentavam valores inadequados.⁷³ Imaginava-se que o Brasil, por ser um país tropical e ensolarado, não apresentasse população exposta à deficiência de VD. No entanto, pesquisas brasileiras têm revelado números alarmantes.⁷⁴⁻⁷⁶ O estado de hipovitaminose D é comumente

encontrado em mulheres na pós-menopausa. Entre as prováveis causas descrevem-se: baixa exposição solar e capacidade reduzida de produção de VD; função renal diminuída; menor absorção de VD pelo trato gastrointestinal; e uso de múltiplas drogas que podem interferir absorção e metabolização da VD. Outros fatores também influenciam a capacidade de produção de VD pela pele: uso de filtro solar, cor da pele, roupa e idade.⁷⁷

Sabendo-se que as fontes dietéticas de VD são inadequadas, é interessante que mulheres na pós-menopausa recebam suplementação para garantir a saúde óssea.⁷⁰ Em 2010, a *International Osteoporosis Foundation*(IOF) publicou posicionamento sobre a VD, com base em dados observacionais, recomendando manutenção de valores séricos de 25(OH)D de 30ng/ml para pessoas idosas e afirmando que o consumo de VD de até 2000UI/dia pode ser necessário para atingir valor recomendável em alguns pacientes.⁶⁷ Em contraste, *Institute of Medicine* baseado em evidências a partir de estudos observacionais e randomizados sugere que nível sérico de 20 ng/ml protegeria 97,5% da população contra efeitos adversos na massa óssea, tais como fraturas e quedas (Rosen et al, 2012). Contudo permanece incerta a dose apropriada de suplementação para atingir os valores desejados, embora se recomende dose de 600UI/dia para mulheres na pós-menopausa e doses superiores a 800UI/dia para aquelas com idade superior a 70 anos.⁷⁸ A suplementação diária de 1000UI de VD (dentro de um período mínimo de seis meses) aumenta os valores séricos em torno de 10ng/ml, dose esta sugerida para pacientes com idade inferior a 65 anos. Já com idade superior deveriam receber dose diária de 2000UI.⁷⁹ Em geral, para cada 100UI de VD suplementada há aumento de 1 ng/ml a nível sérico de 25(OH)D e quanto menor os valores séricos basais, melhor a resposta a suplementação. A suplementação destina-se

a elevar valores séricos de 25(OH)D acima de 30ng/ml de modo a aproveitar o máximo os benefícios da VD.⁸⁰

A relevante função desempenhada pela VD sobre a massa óssea está bem definida, contudo efeitos extra-ósseos da VD sobre os marcadores cardiometabólicos e imuno-inflamatórios estão sob investigação atual. A forma ativa da VD regula a transcrição de número expressivo de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea e está envolvida em processos biológicos, incluindo o metabolismo ósseo, a modulação da resposta imune, e a regulação da proliferação e da diferenciação celular.⁸¹ A VD também modula a transcrição de células do ciclo protéico que diminuem a proliferação celular e aumentam sua diferenciação (precursores de osteoclastos, enterócitos e queratinócitos). Essa propriedade pode explicar a ação da VD na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele.⁸²

1.4. Vitamina D e o Câncer de mama

A VD parece desempenhar papel no desenvolvimento do câncer, atuando através da ligação ao VDR, que é expresso no tecido mamário.⁸³ O VDR foi identificado pela primeira vez em linhagem de células do câncer de mama em 1979.⁸⁴ A ação do metabólito ativo da VD na mama é mediada pelo seu receptor. A ativação de VDR pela 1,25(OH)2D3 resulta em heterodimerização com o receptor de retinóide X e ligação a elementos de resposta cognatos de VD em genes alvos que participam na diferenciação celular, crescimento celular, apoptose, inflamação e modulação imune.⁸⁵⁻⁸⁷ O ligante VD-VDR exibe atividade antiproliferativa em muitos tipos de tumor, assim como os membros da família p53 ativada, através da indução do

bloqueio do ciclo celular, da senescência, da diferenciação e de apoptose.⁸⁸ Evidências suportam ligação cruzada entre as vias da VD e da sinalização p53. Todos os três membros da família - p53-p53, p63, p73 - participam da ativação do gene VDR,^{88,89} enquanto VDR regula vários genes que também são alvos das proteínas da família p53, incluindo p21, Bax, Bcl-2 e MDM2.^{88,91} Alguns estudos têm demonstrado redução na expressão do VDR em células de câncer de mama em comparação a células normais da mama, devido a polimorfismos do gene do VDR.⁹²⁻⁹⁴ No câncer de mama a expressão do VDR varia de 58% a 80%, com relatos de pacientes portadoras de tumores VDR positivos apresentarem maior sobrevida livre de doença.⁸³

Estudos experimentais têm indicado que a VD pode reduzir o risco de câncer por inibir a proliferação celular, induzir a diferenciação e a apoptose, e inibir a angiogênese na mama normal e no câncer.⁹⁵⁻⁹⁸ A VD parece exercer efeito antiproliferativo em linhagens de câncer de mama, mediado pela regulação da expressão de moléculas que controlam a progressão do ciclo celular.^{99,100} As células cancerosas sofrem alterações fisiológicas, que diminuem a sua susceptibilidade à VD. As células malignas têm níveis intracelulares diminuídos de 1 α -hidroxilase (enzima ativadora codificada pelo CYP27B1) em comparação com as células normais, o que diminui a produção intracelular de VD. Além disso, há uma maior degradação da VD nas células tumorais, causando resistência aos efeitos antitumorais da vitamina D.¹⁰¹

Estudos experimentais com camundongos *knockout* VDR, observaram elevada taxa de incidência de lesões mamárias pré-neoplásicas induzido por carcinógenos.^{102,103} Estes estudos demonstraram a importância da deficiência de VDR na sensibilização da glândula mamaria para transformação em resposta a um agente carcinogênico. Estudos imunohistoquímicos confirmaram que o VDR está expresso em

amostras de tecidos normais da mama¹⁰⁴ e também em amostras de câncer de mama.^{105,106} Lopes *et al* estudaram a expressão do VDR por imunohistoquímica em uma coorte de mama normal, lesões mamárias benignas, carcinomas *in situ* e carcinoma invasivo de mama. Os resultados obtidos mostram que o VDR foi expresso nos vários tecidos mamários, porém em quantidades diferentes, sendo mais frequente em lesões benignas (93,5%) com os seus níveis de expressão diminuindo em tumores invasivos (56,2%). Os autores concluem que há desregulação da sinalização da VD e de suas vias metabólicas no câncer de mama, que poderia favorecer a progressão do tumor. Assim, durante a transformação maligna da mama, células tumorais perderiam a capacidade de sintetizar a forma ativa da VD e de responder aos efeitos da VD mediado pelo VDR.⁹²

Em 2014, LaPorta & Welsh caracterizaram as ações moleculares do VDR em modelo de câncer de mama triplo negativo. Linhagem de células tumorais estrogênio independente, estabelecidas a partir de ratos do tipo selvagem e *knockout* VDR foram utilizados para demonstrar que o VDR é necessário para mediar a ação anticancerígena da 1,25(OH)2D3, *in vitro* e para identificar novos alvos deste receptor. Semelhantemente a tumores da mama triplos negativos, as linhagens de células empregadas falharam em expressar os receptores de estrogênio, progestagênio e HER-2. Os autores demonstraram que a 1,25(OH)2D3 exerce efeito anti-proliferativo (inibição do crescimento celular) no tumor triplo negativo apenas nas células que expressam VDR.¹⁰⁷ Recente estudo, avaliando a expressão de VDR em tecido tumoral da mama em 1.114 pacientes, observou em 58% dos tumores de mama expressão de VDR de moderada a forte. A expressão de VDR foi inversamente relacionada com

características agressivas do tumor, incluindo grande tamanho do tumor, negatividade de receptor hormonal e subtipo triplo negativo.¹⁰⁶

Vários estudos não controlados têm relatado elevada frequência de hipovitaminose D em pacientes com câncer de mama.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Crew *et al* identificaram que 74% das pacientes com câncer de mama apresentavam deficiência de VD (<20 ng/ml) e que apesar da prescrição de 400UI de VD/dia, poucas pacientes (<15%) atingiram valores desejáveis de VD (>30 ng/mL).¹⁰⁹ Em estudo retrospectivo com avaliação de 500 mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama, 69% eram deficientes para VD.¹¹⁰ Entretanto, os resultados de estudos epidemiológicos que examinaram a associação entre valores circulantes de 25(OH)D e o risco de câncer têm sido inconsistentes. Alguns estudos prospectivos não demonstraram associação¹¹¹⁻¹¹⁷, enquanto outros encontraram associação inversa significativa.¹¹⁸⁻¹²¹

Scarmo *et al* conduziram estudo caso-controle com duas coortes prospectivas, *New York University Women's Health Study*, que envolveu 14.274 mulheres saudáveis (34 a 65 anos idade) de uma clínica de mamografia da cidade de Nova York e *Northern Sweden Mammary Screening Cohort* com 28.800 participantes de um programa de rastreamento do câncer de mama na Suécia. Foram incluídos 1585 casos novos de câncer de mama para 2940 controles. Não houve associação entre os níveis circulantes de 25(OH)D e risco global do câncer de mama.⁸⁷ Por outro lado, no *Nurses' Health Study* foi demonstrado efeito protetor mais significativo da VD no risco de câncer de mama em mulheres acima dos 60 anos,¹¹⁸ enquanto o estudo de coorte francês E3N demonstrou efeito mais forte em mulheres abaixo dos 53 anos de idade.⁹³ Os investigadores sugeriram que a VD pode atuar inibindo o fator de crescimento *insulino-like* (IGF-1), que tem ação proliferativa e diminui com a idade; assim seria

esperado um efeito anti-carcinogênico mais forte da VD em mulheres na pré-menopausa.⁹³ Entretanto, alguns estudos que encontraram associação entre valores reduzidos de 25(OH)D com a maior incidência do câncer de mama,^{122,123} obtiveram as dosagens de VD em algum intervalo após o diagnóstico de câncer de mama, com potenciais alterações pelo tratamento do câncer. Por exemplo, mulheres com menor atividade física têm menores valores de 25(OH)D, e reconhecidamente a atividade física é reduzida após o diagnóstico de câncer de mama.¹²⁴

Kawase *et al* realizaram pesquisa sobre a associação entre ingestão de VD e cálcio e o risco de câncer de mama em mulheres japonesas na pré e pós-menopausa. Foram incluídos 1.803 casos e 3606 controles pareados pela idade e status menopausal. Na análise estratificada, uma associação inversa significativa foi observada somente entre mulheres na pré-menopausa.¹²⁵ Por outro lado, mulheres participantes do estudo *Women's Health Initiative* (WHI) foram randomizadas a receber 1000mg de cálcio associado a 400 UI de VD ao dia ou placebo, durante sete anos, sendo que valores de 25(OH)D foram avaliados em estudo caso-controle com 1.067 casos e 1.067 controles. Nenhum efeito da suplementação sobre o risco de câncer de mama foi observado.¹²⁶ Uma metanálise examinou os efeitos da suplementação de VD sobre o risco de câncer de mama, sendo incluídos 11 estudos. Foi observada relação inversa significativa entre a ingestão de VD e o risco de câncer de mama, com risco relativo (RR) de 0,91 (IC 95% = 0,85-0,97). Estes resultados indicam forte evidência de que a VD têm efeito quimiopreventivo contra o câncer de mama.¹²⁷ Com base nessas descobertas, alguns autores têm sugerido o monitoramento de rotina dos valores de 25(OH)D e a suplementação para os casos de hipovitaminose D.^{109,128} Contudo, as evidências atuais são insuficientes para

recomendar a suplementação de VD na prevenção do câncer de mama, e que mais pesquisas clínicas são necessárias.¹²⁹⁻¹³¹ O relatório do *Institute of Medicine* norte americano concluiu que as provas são inconsistentes e inconclusivas quanto à causalidade, e insuficientes e limitadas, não conclusivas.¹³²

A concentração de VD poderia ser considerada um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama.^{133,134} Um estudo observou que mulheres com valores deficientes de VD apresentaram maior risco de recorrência e morte quando comparadas as mulheres com valores adequados.¹³⁵ Estudo de revisão sistemática avaliou o papel da VD sobre o prognóstico em pacientes com câncer. Entre janeiro de 2009 e setembro de 2013, seis estudos investigaram as associações dos níveis de 25(OH)D com a sobrevida global em pacientes com câncer de mama.¹³⁶ As concentrações de 25-OHD circulantes elevadas foram associadas com significante melhora na sobrevida em dois estudos,^{121,137} com tendência a melhor sobrevida em outros dois^{135,138} e nenhuma associação nos últimos dois.^{139,140} Esta revisão destaca a necessidade de mais estudos avaliando o papel da VD no prognóstico entre pacientes com câncer.¹³⁶ Outra meta-análise foi realizada a partir de cinco estudos que avaliaram a relação entre a VD e a mortalidade pelo câncer de mama. Valores plasmáticos elevados de 25(OH)D estiveram associados com menores taxas de mortalidade após o diagnóstico de câncer de mama. Pacientes no quartil mais alto de 25(OH)D tiveram aproximadamente metade da taxa de mortalidade por câncer de mama quando comparadas aquelas no menor quartil. Os autores sugerem que valores de 25(OH)D deveriam ser restaurados ao seu valor normal (30-80 ng/ml) em todas as pacientes com câncer de mama. Entretanto mais estudos clínicos devem ser iniciados para confirmar esta associação.¹⁴¹

Alguns estudos não observaram associação entre a VD com a presença de receptor estrogênio positivo ou negativo no câncer de mama.^{111,142}. Entretanto, Kawase *et al* investigaram o efeito da ingestão de VD e cálcio sobre status do receptor tumoral de 713 casos de câncer de mama, especificamente receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). Tumor RE e RP positivo e HER-2 negativo associou-se com a ingestão de VD entre mulheres na pré-menopausa.¹⁴³ Kim *et al* investigaram a associação entre os valores séricos de VD e o prognóstico do câncer de mama de acordo com subtipos de câncer pela imunoistoquímica em 310 mulheres. Em 54,8% os valores de VD foram deficientes (< 30ng/ml). A concentração de 25(OH)D foi inversamente associada com o prognóstico de pacientes com câncer RE positivo e HER-2 negativo, mas não com os subtipos HER-2 positivo ou triplo negativo.¹³³ Estudo transversal avaliou os níveis de VD e as características clínico-patológicas de 200 casos de câncer de mama em mulheres talilandesas (pré-menopausa, n=105 e pós-menopausa, n=95). O nível médio de VD foi de 23,0±6,6 ng/ml, sendo que em apenas em 7% valores foram superiores a ≥ 32 ng/ mL. Valores insuficientes de VD foram encontrados na maioria dos casos em estágio avançado, com axila positiva e em tumores grandes.¹⁰¹

Recente estudo Sueco de base populacional investigou a associação potencial entre os níveis séricos de 25OHD3 no pré-diagnóstico e o risco de diferentes subtipos de câncer de mama. Utilizando dados do *Malmö Diet and Cancer Study*, que recrutou 17.035 mulheres entre 1991 a 1996, um total de 764 cânceres de mama com amostras de 25(OH)D3 coletadas antes do diagnóstico foram analisados. Em comparação a pacientes com valores de 25(OH)D no primeiro tercil (≤ 30 ng/mL), aquelas no segundo tercil (entre 30 a 40ng/mL) apresentaram menor risco de tumores RE e RP negativos e

com alta expressão de Ki67. Por outro lado, aquelas no terceiro tercil ($\geq 40\text{ng/mL}$) apresentaram risco semelhante ao primeiro tercil.¹⁴⁴ O *Pathways Study* é um estudo de coorte prospectivo de sobreviventes de câncer de mama estabelecido em 2006, no *Kaiser Permanente Northern California*. Mulheres com um diagnóstico de câncer de mama são seguidas em 12, 24, 48, 72 e 96 meses após a entrevista inicial. Um estudo de caso-coorte (n=1666 casos) foi utilizado para determinar a associação entre a dosagem de 25(OH)D no diagnóstico do câncer com o prognóstico. As concentrações séricas de 25OHD foram mais baixas em mulheres com tumores em estágio avançado e em mulheres na pré-menopausa com tumores triplo-negativos. Comparado com o tercil mais baixo de 25(OH)D, mulheres no tercil mais elevado tiveram a sobrevivência global superior, contudo essa associação foi mais forte entre mulheres na pré-menopausa. Os autores concluem que os níveis séricos de 25(OH)D foram independentemente associados às características prognósticas do câncer de mama, sendo mais proeminente entre as mulheres na pré-menopausa.¹³⁴ Por outro lado, estudo avaliando a correlação entre valores de VD e as características do tumor em 1800 mulheres com câncer de mama, observou que quando se considerou o estado da menopausa, valores de 25(OH)D elevados apresentaram correlação com a taxa de sobrevida e menores tumores em pacientes na pós-menopausa. Enquanto nenhuma associação foi demonstrada em pacientes na pré-menopausa. Concluem que níveis elevados de VD no diagnóstico do câncer de mama correlacionam-se com menor tamanho do tumor e melhor taxa de sobrevida, especialmente em pacientes pós-menopausa.¹³⁷

2. Objetivo

Analisar a associação entre a deficiência de vitamina D e o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

3. Métodos

Desenho do estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de estudo clínico de corte transversal. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Centro de Avaliação em Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP, nos anos de 2015 e 2016. O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB e que foi embasado no estudo de Kermani *et al.*¹⁴⁵, que encontraram diferença no marcador imunoistoquímico HER2+ entre mulheres com e sem deficiência de VD (12 e 2 casos, respectivamente). Considerando a diferença entre os valores e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%) e do tipo II (20%) atribuídos ao estudo, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 153 mulheres com câncer de mama. Foram incluídas mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama, com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos. E critérios de exclusão foram: uso de doses farmacológicas de VD, etilista ou drogaditas, carcinoma de mama in situ, história prévia de outros cânceres, falência renal (creatinina >1.4 mg/dL) e doenças hepáticas. Todas as voluntárias participantes do estudo foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos e confidencialidade dos dados, sem quaisquer prejuízos para as mesmas. Foram solicitadas a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I), de acordo com exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB- UNESP em 30 de novembro de 2014 (Anexo II).

Metodologia

Inicialmente, no momento do diagnóstico foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, idade da primeira gestação, amamentação, tabagismo atual, uso prévio de terapia hormonal, histórico de doenças crônicas, antecedente familiar de câncer de mama e uso de medicamentos. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura e índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$). Para mensuração do peso, foi utilizada balança antropométrica eletrônica microdigital tipo plataforma (Filizola®, Brasil), com capacidade de 150 kg com precisão 0,1 Kg e 0,5 cm (peso e estatura), com a paciente descalça e com o mínimo de roupa. Para medir a estatura, a paciente permaneceu com os braços ao longo do corpo ereto, mantendo os olhos fixos em plano horizontal paralelo ao chão, medida por haste vertical com graduação de 0,5 cm, acoplada à balança. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* (WHO) de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que 18,5 kg/m² como baixo peso, de 18,5 a 24,9 kg/m² normal, de 25 a 29,9 kg/m² sobrepeso, de 30 a 34,9 kg/m² obesidade grau I, de 35 a 39,9 kg/m² obesidade grau II e maior ou igual a 40 kg/m² obesidade grau III.¹⁴⁶

Análise da vitamina D

A avaliação sérica de VD foi realizada imediatamente após o diagnóstico do câncer de mama antes do tratamento proposto, aproximadamente 20 a 30 dias pós-diagnóstico. Para a dosagem sérica de 25(OH)D foi empregado o método da

quimiluminescência automatizada por micropartículas (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMLA) com *Architect 25-OH Vitamin D assay Kit*, pelo analisador Architect® i2000 (Abbott®, Santa Clara, California, USA). A sensibilidade analítica é de 1,9 ng/mL e o coeficiente de variação intra e inter-ensaio é < 10%, segundo descrição do Kit. O intervalo de referência é de 0.0-160.0 ng/mL, segundo o método. Foram considerados suficientes valores ≥ 30 ng/mL e deficiência < 30ng/mL.⁶⁶ Todos os exames foram processados pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir dos relatórios dos prontuários das pacientes, foram obtidos: o diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau, estágio do tumor, status de receptor hormonal (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP; receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2, HER2) e a atividade proliferativa epitelial (Ki67). O envolvimento linfonodal foi avaliado após a cirurgia ou pela avaliação do linfonodo sentinela. Os tumores foram classificados de acordo com a classificação da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, dividindo o estadiamento do câncer de mama em três categorias: 1- câncer de mama invasivo localizado (estágio I, II e T3 N1 M0, considerado câncer de mama localmente avançado operável); 2- câncer de mama invasivo localmente avançado inoperável (estágio III, Exceto T3 N1 M0); 3-doença metastática (estágio IV).¹⁴⁷ O diâmetro do tumor foi obtido a partir dos laudos histopatológicos e, graduados histologicamente em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), de acordo

com o método proposto por Elston & Ellis¹⁴⁸, que utiliza como critérios os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico.

A definição do perfil imuno-histoquímico dos tumores foi realizada a partir dos resultados de laudos emitidos pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu de reconhecida qualidade técnica, baseando-se na avaliação dos RE e RP, de HER2 e índice de proliferação celular Ki67. Os cânceres de mama foram categorizados em quatro subtipos moleculares com base em perfis de imuno-histoquímica em: 1- Luminal A: RE positivo, RP positivo com expressão >20%, HER-2 negativo; 2- Luminal B: RE positivo, RP positivo com expressão < 20% ou negativo, HER-2 positivo; 3- Não-luminal HER-2: RE e RP negativos e HER-2 positivo; 4- Triplo-negativo: RE, RP e HER-2 negativos.¹⁰

O perfil de RE, RP, HER e Ki67 foram determinados pela técnica de imunohistoquímica (IQ) utilizando blocos de tecido, segundo recomendação dos Kits empregados (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). Os ensaios de IQ visam demonstrar a presença e localização de proteínas em secções de tecido, por meio de análise semi-quantitativa quanto a positividade ou negatividade do marcador. A coloração para IQ é realizada em secções finas de tecido fixado em formalina que estão sujeitas a vários métodos de recuperação de antígenos. Isto é seguido por incubação do tecido com um anticorpo primário dirigido contra a proteína/antígeno alvo. Uma vez que os anticorpos são altamente específicos, o anticorpo irá ligar-se apenas à proteína de interesse na secção de tecido. A interação anticorpo-antígeno é então visualizada utilizando detecção cromogênica, em que uma enzima conjugada ao anticorpo cliva um substrato para produzir um precipitado colorido no local da

proteína, denominada detecção fluorescente, sendo visualizado pela microscopia de fluorescência.¹⁴⁹

Após avaliação imuno-histoquímica, os tumores foram agrupados em nenhum, baixa, média ou alta expressão de RE, RP e Ki67, utilizando intervalos de 0-1%, 2-10%, 11-50% e 51-100% de núcleos positivos. Para os receptores de estrogênio e progesterona foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais.¹⁵⁰ Para o Ki67, como não existe consenso na literatura em relação à positividade, foi considerado positivo se mais de 14% das células tumorais estivessem marcadas.¹⁵¹ Para análise do HER2 foi utilizado critérios da ASCO¹⁵², sendo 0 sem marcação de membrana, 1+ marcação parcial de membrana, 2+ marcação completa de membrana, fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais e 3+ marcação completa e intensa de membrana em mais de 10% das células tumorais. A amplificação do gene HER2 foi testada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) quando a imunohistoquímica resultou em escore 2+.¹⁵³ Todo estudo anatomopatológico e de imunohistoquímica foram realizados pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. O grau histológico, o status do receptor hormonal e os subtipos moleculares foram usados como características independentes no prognóstico do câncer de mama.

Análise Estatística

A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados segundo grupo de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama de acordo com valores séricos de Vit D (normal ou deficiente). Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e

porcentagem para variáveis qualitativas. Foram analisadas as seguintes variáveis: 1- clínicas (idade, paridade, idade da primeira gestação, tempo de amamentação, idade e tempo de menopausa, história de uso de TRH, de hipertensão, diabetes, tabagismo e IMC); 2- Dosagem sérica de 25(OH)D; 3- dados anatomopatológicos e de imunohistoquímica do câncer de mama (tipo e grau histopatológico, tamanho do tumor, estágio do tumor, subtipo molecular, linfonodo axilar, RE, RP, Her2 e Ki-67). Para comparação entre os grupos em relação às características quantitativas foi empregado o Teste *t-student* e a distribuição Gama (variáveis assimétricas). Na associação entre a frequência das características categóricas foi empregado o Teste do Qui-quadrado.

Foi realizada análise multivariada por regressão logística binária, considerando-se intervalo de confiança (IC) de 95%, com cálculo da respectiva odds ratio (OR), para examinar a associação entre os valores séricos de Vit D (variável dependente ou resposta) e os fatores prognósticos para o câncer de mama (variáveis independentes ou explanatórias), sendo ajustada para idade, tempo de menopausa e IMC (variáveis confundidoras). Foram testadas todas as variáveis analisadas através do ajuste do modelo de regressão logística múltipla utilizando procedimento “*stepwise*” para as variáveis que apresentaram diferença significativa. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System* (SAS), versão 9.2, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu que deu o atendimento metodológico e conduziu os procedimentos estatísticos.

4. Publicação

4.1. Artigo Original

**Pretreatment vitamin D deficiency is associated
with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women**

Almeida-Filho B, Vespoli H, Nahas-Neto J, Nahas EAP

Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Sao Paulo State
University - UNESP, Sao Paulo, Brazil.

Abstract

Objective: To evaluate the association between pretreatment vitamin D (VD) deficiency with breast cancer prognostic features in postmenopausal women.

Methods: An analytical cross sectional study was conducted with 192 women, aged 45-75 years, attended at University Hospital. Women with recent diagnosis of breast cancer, in amenorrhea > 12 months and age $\geq$ 45 years, without medication use or clinical conditions that interfere with vitamin D values were included. Clinical and anthropometric data were collected. Serum level of 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] was measured in all patients 20 to 30 days after breast cancer diagnosis, and values of 25(OH)D <30ng/mL were considered as VD deficiency. Data on breast cancer (histopathological type, grade, tumor stage, lymph node status), hormone status (estrogen receptor, ER, progesterone receptor, PR), human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) and epithelial proliferative activity (Ki-67) were collected. For statistical analysis, the t-student test, the Gamma Distribution (asymmetric variables), the chi-square test and the logistic regression (OR-odds ratio) were used.

Results: The median 25(OH)D level was 25.8 ng/ml (range 12.0 to 59.2 ng/ml). Sufficient vitamin D levels were detected in 65 patients (33.8%), while deficient levels in 127 cases (66.2%). Participants with deficient 25(OH)D levels had a higher proportion of tumors with a high grade and locally advanced and metastatic disease, more positive lymph node, a lower proportion of ER, PR positives tumors and higher Ki-67($p<0.05$). Patients with normal vitamin D had a higher frequency of luminal A and luminal B (80%) when compared to patients with vitamin D deficiency (65.2%) ($p<0.05$). Further, all cases of triple negative were detected in vitamin D deficient women. Multivariate analysis, after adjusting for age, time since menopause and BMI,

showed that a deficient level of vitamin D was an independent prognostic indicator of positive axillary lymph node status (OR 2.26, CI 95% 1.10-5.16, $p=0.043$), negative estrogen receptor (OR 4.18, CI 95% 1.17-15.87, $p=0.034$), and high Ki-67 (OR 2.78, CI 95% 1.34-66.65, $p=0.005$).

Conclusions: In postmenopausal women with breast cancer, there was an association between VD deficiency and tumors with worse prognostic features. Vitamin D deficiency was shown to be a risk factor for ER negative tumors, with positive axilla and a higher rate of cell proliferation.

Key words: Postmenopausal Women; Vitamin D; Breast Cancer; Immunohistochemical Profile

Introduction

Breast cancer is the type of cancer that mostly affects women in the world, both in developing and developed countries. It is also the leading cause of death by cancer in women worldwide, with an estimated 520,000 deaths annually.¹ In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) estimates 57,960 new cases of breast cancer to be diagnosed for the biennium 2016-2017 that, with an estimated risk of 56.20 cases per 100,000 women.² The prognosis of breast cancer patients is directly related to the stage of the disease at the time of diagnosis and may be inferred by factors and biomarkers that can provide information on the biological potential and most likely clinical course irrespective of treatment.³ For that reason, breast cancer is currently acknowledged as a heterogeneous disease, comprising a wide spectrum of morphologically different subtypes and resulting in different biological behaviors, presentations, and prognoses.^{4,5}

Standard clinicopathological factors such as patient age, menopausal status, tumor size, lymph node status, tumor histology and grade, tumor stage continue to be useful in estimating prognosis.⁶ Assessment of biological and molecular pattern has also been considered as an important tool not only for prognosis, but also in deciding which treatment modality is the best for an individual patient.⁴⁻⁶ Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) and Ki-67, an index of tumor proliferative rate, are currently detected by immunohistochemistry (IHC) technique and used to estimate prognosis and to categorize breast cancer into intrinsic molecular subtypes that exhibit similar

morphological and prognostic features (luminal A, luminal B, HER2-overexpressing, and triple negative cancers).⁵

In addition, a number of other breast cancer-related etiological and prognostic factors have been identified as its molecular pathogenesis is still not clear. It has been reported recently that vitamin D and its receptor (VDR) could play an important role in breast cancer pathogenesis.⁷⁻⁹ Vitamin D acts by binding to the vitamin D receptor (VDR), which is expressed in mammary tissue. The VDR controls the expression of genes regulating cell proliferation, differentiation, and apoptosis.^{10,11} Evidence from several trials supports that low levels of 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] are associated with an increased risk of breast cancer.¹²⁻¹⁹ However, some prospective studies have not shown any association.²⁰⁻²⁶ Circulating 25(OH)D is considered the best marker of vitamin D status because it reflects vitamin D obtained from both diet/supplements and sun exposure and has a longer half-life than 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)2D].^{27,28}

Researchers have demonstrated that vitamin D, as activated 1,25-(OH)2D, influences events at the cellular level that are potentially important not only in the pathogenesis of breast cancer, but also in its prognosis and survival.^{8,29-31} In fact, studies have been focusing in addressing this possible relation of vitamin D levels and breast cancer with a poorer prognosis.³² An understanding of the prognostic significance of vitamin D in patients with breast cancer may identify a high-risk patient subgroup. Therefore, in our study, we aimed at analyzing the association between vitamin D deficiency and the prognostic features of breast cancer and at evaluating the relationship between vitamin D deficiency and the current molecular subtypes of breast cancer in postmenopausal women.

Methods

Study design and sample selection

This is a clinical, analytical, cross-sectional, and comparative study. The population group comprised 192 postmenopausal women newly diagnosed with breast cancer, aged 45 to 75 years, who attended the Breast Disease Assessment Center of the University Hospital in Southeastern Brazil during 2015-2016. Women with the following characteristics were included: histological diagnosis of breast cancer, last menstruation dating at least 12 months prior to presentation, and aging 45 years or older. Exclusion criteria were: use of pharmacological doses of VD ($>100\text{IU/day}$); in situ breast carcinoma; personal history of other cancers; renal failure (creatinine $> 1.4\text{ mg/dL}$); liver diseases; abusive alcohol consumption and grade III obesity. This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP).

Methodology

All participants underwent individual interviews in which the following data were collected: age, menopausal age, time since menopause, parity, age of first gestation, duration of breastfeeding, current smoking, prior use of hormone therapy, history of chronic diseases, family history of breast cancer and use of medications. Smokers were defined as patients who reported smoking, regardless of the number of cigarettes smoked. Anthropometric data included weight, height, and body mass index

(BMI; weight / height²). BMI were classified according to the system used by the World Health Organization in 2002: less than 24.9 kg/m² as normal, from 25 to 29.9 kg/m² as overweight, from 30 to 34.9 kg/m² as grade I obesity, from 35 to 39.9 kg/m² as grade II obesity, and 40 kg/m² or greater as grade III obesity.³³

Vitamin D assessment

Serum VD assessment was collected immediately after diagnosis of breast cancer prior to any proposed treatment, approximately 20 to 30 days post-diagnosis. For the serum 25(OH)D dosage, the Architect 25-OH Vitamin D assay Kit was used by the Architect® i2000 analyzer (Abbott®, Santa Clara, California, USA), using the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). The detection limit was 1.9 ng/mL and the intra- and inter-assay coefficient of variation is <10%, as described in the assay Kit. Values ≥ 30ng/mL were considered sufficient and deficiency <30ng/mL.²⁷ All laboratory tests were processed by the Clinical Analysis Laboratory of Botucatu Medical School.

Tumor characteristics

The breast cancer tumors were classified according to established prognostic characteristics: tumor size, type and histological staging, grade, axillary lymph node status, hormone receptor status and epithelial proliferative activity. The tumor diameter was obtained from histopathological reports and histologically graded as grade 1 (well differentiated), grade 2 (moderately differentiated), and grade 3 (undifferentiated) according to the method proposed by Elston and Ellis, which uses architectural aspects, nuclear differentiation levels, and mitotic index as criteria.³⁴ The

axillary lymph node status was classified as positive lymph node involvement if there was at least one positive lymph node according to the histopathological examination. Tumors were categorized according to 7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM system³⁵, grouped into stages (I-IV) and classified according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) classification, which further divides breast cancer staging in three categories based on management options: 1- localized invasive breast cancer (stage I, II and T3 N1 M0, the latter considered to be an operable locally advanced breast cancer), 2- inoperable locally advanced invasive breast cancer (stage III, except T3 N1 M0), and 3- metastatic disease (stage IV).³⁵

The hormone receptor status and epithelial proliferative activity were assessed by standard methods, using immunohistochemistry for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and cell proliferation index (Ki-67) status. Breast cancer was then categorized into four molecular subtypes based on surrogate immunohistochemical profiles: luminal A (ER+ and / or PR+, HER2-, Ki-67<14%); luminal B (ER+ and / or PR+, HER2-/+, Ki-67≥14%), non-luminal HER2 (ER-, PR- and HER2+), and triple negative (ER-, PR- and HER2-).⁵ Immunohistochemistry (IHC) with antibodies for ER, PR, HER2, Ki-67 was performed according to the streptavidin–biotin–peroxidase complex methods (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). ER and PR were considered positive if >1% of cells stained positive on IHC.³⁶ Ki-67 was considered high if > 14% of the tumor cells were labeled.⁵ HER2 was considered positive if the fluorescence in situ hybridization (FISH) test, systematically performed in all IHC 2+ tumors, showed HER2 genomic amplification or, in the absence of FISH, if IHC was 3+.^{37,38} All the histopathological and immunohistochemical analyses were performed by the Department of Pathology of

Botucatu Medical School. Histologic grade, ER status and molecular subtypes defined by ER, PR, HER2 and Ki-67 were used as independent prognostic characteristics for breast cancer.

Statistical analysis

The sample size estimation was based on the study by Kermani et al.³⁹ who found a difference in the HER2 + between women with and without VD deficiency (12 and 2 cases, respectively). Considering the difference between the values and correcting the estimate for type I (5%) and type II (20%) errors attributed to the study, the estimated sample size was at least 153 women with breast cancer.

From the data, tables were constructed based on VD serum values (normal $\geq 30\text{ng/mL}$ and deficient $<30\text{ng/mL}$). For data analysis, means (SDs) were calculated for quantitative variables, and percentages were calculated for qualitative variables. For comparison between the groups in relation to quantitative characteristics, Student's t test and gamma distribution (asymmetric) were used. Chi-Square test was used to assess the association between the frequencies of categorical characteristics. Multivariate analysis was performed by binary logistic regression, considering a 95% confidence interval (CI), with a respective odds ratio (OR), to examine the association between serum VD (dependent variable or response) and the prognostic characteristics for breast cancer (independent or explanatory variables), adjusted for age, time since menopause and BMI (confounding variables). A level of significance of 5% or the corresponding *P* value was adopted in all tests. The analyses were performed using the Statistical AnalysisSystem 9.2 program (SAS).

Results

One hundred and ninety two postmenopausal women with a mean age at diagnosis of 61.3 ± 9.6 years were enrolled in the study. Serum samples were drawn from 20 to 30 days after diagnosis, and the median 25(OH)D level was 25.8 ng/ml (range 12.0 to 59.2 ng/ml). Patients were classified based on serum 25 (OH) D concentration into those with normal or sufficient (≥ 30 ng/ml) or deficient (< 30 ng/ml) levels. Sufficient vitamin D levels were detected in 65 patients (33.8%), while deficient levels in 127 cases (66.2%). Clinical characteristics according to serum of 25-hydroxy vitamin D level are shown in Table 1. No differences in age, time of menopause, parity, BMI, smoking, hormone replacement therapy use and history of hypertension or diabetes were observed.

The associations of vitamin D levels with tumor characteristics are shown in Table 2. When compared vitamin D with clinicopathological parameters, we found that low vitamin D level (< 30 ng/ml) was significantly mainly detected in cases with poor prognosis. Participants with deficient 25(OH)D levels had a higher proportion of tumors with a high grade, locally advanced and metastatic disease, more positive lymph node involvement, a lower proportion of ER, PR positive tumors and higher Ki-67 indices. There was a significant association between vitamin D concentration and intrinsic subtypes. Patients with normal vitamin D had a higher frequency of luminal A (47.7%) and luminal B (32.2%) tumors when compared to patients with vitamin D deficiency. Further, all cases of triple negative were detected in vitamin D deficient women. There were no significant associations between vitamin D concentration and tumor size, histology of breast cancer and HER2 status (Table 2).

Multivariate analysis, after adjusting for age, time since menopause and BMI, showed that a deficient level of vitamin D was an independent prognostic indicator of positive axillary lymph node status (OR 2.26, CI 95% 1.10-5.16, $p=0.043$), negative estrogen receptor (OR 4.18, CI 95% 1.17-15.87, $p=0.034$), and high Ki-67 (OR 2.78, CI 95% 1.34-66.65, $p=0.005$) (Table 3). Other clinicopathological variables did not show significance.

Table 1. Comparison of clinical characteristics based on serum of 25-hydroxy vitamin D level (normal $\geq 30\text{ng/mL}$ and deficient $< 30\text{ng/mL}$).

Variables	Normal (n=65)	Deficient (n=127)	<i>P value</i>
Age (years), mean $\pm$ SD	60.7 $\pm$ 9.6	61.6 $\pm$ 10.2	0.565 ^a
Age of menarche (years), mean $\pm$ SD	13.1 $\pm$ 1.6	12.8 $\pm$ 1.5	0.260 ^a
Age at menopause (years), mean $\pm$ SD	48.4 $\pm$ 3.8	48.6 $\pm$ 3.4	0.759 ^a
Time of menopause (years), mean $\pm$ SD	12.3 $\pm$ 10.3	13.0 $\pm$ 10.4	0.754 ^b
Parity (no. of children), mean $\pm$ SD	2.9 $\pm$ 2.2	2.8 $\pm$ 1.9	0.616 ^b
First pregnancy age (years), mean $\pm$ SD	22.3 $\pm$ 4.9	22.7 $\pm$ 5.2	0.642 ^a
Breast-feeding (months), mean $\pm$ SD	29.1 $\pm$ 34.4	30.7 $\pm$ 38.4	0.579 ^b
25 (OH) D (ng/mL), mean $\pm$ SD	22.7 $\pm$ 4.4	35.0 $\pm$ 6.1	<.0001^a
BMI (kg/m ²), n (%)			0.973 ^c
≤ 24.9	8 (12.3)	16 (12.6)	
25 – 29.9	20 (30.8)	37 (29.1)	
≥ 30	37 (56.9)	74 (58.3)	
Family history of BC, n (%)			0.393 ^c
Yes	10 (15.4)	26 (20.5)	
No	55 (84.6)	101 (79.5)	
Smoking, n (%)			0.945 ^c
Yes	11 (16.9)	21 (16.5)	
No	54 (83.1)	106 (83.5)	
HRT use, n (%)			0.158 ^c
Yes	10 (15.4)	11 (8.7)	
No	55 (84.6)	116 (91.3)	

Hypertension, n (%)			0.239 ^c
Yes	30 (46.2)	70 (55.2)	
No	35 (53.8)	57 (44.8)	
Diabetes, n (%)			0.139 ^c
Yes	9 (13.9)	29 (22.8)	
No	56 (86.1)	98 (77.2)	

25(OH)D, 25-hydroxy vitamin D; BMI, body mass index; BC, breast cancer; HRT, hormone replacement therapy

*Significantly difference if $P < 0.05$ (Student t -test^a, Gamma distribution^b or Chi-Square Test^c).

Table 2. Comparison of clinicopathological variables based on serum of 25-hydroxy vitamin D level (normal $\geq 30\text{ng/mL}$ and deficient $< 30\text{ng/mL}$).

Variables	Normal (n=65)	Deficient (n=127)	<i>P value</i> ^a
Tumor size (cm), n (%)			0.841
≤ 2	19 (29.2)	38 (29.9)	
2-5	40 (61.6)	74 (58.3)	
≥ 5	6 (9.2)	15 (11.8)	
Histology of BC, n (%)			0.824
Ductal	62 (95.4)	122 (96.1)	
Lobular	3 (4.6)	5 (3.9)	
Grade, n (%)			0.013
Low	9 (13.8)	7 (5.6)	
Intermediate	38 (58.5)	60 (47.2)	
High	18 (27.7)	60 (47.2)	
Tumor NCCN staging, n (%)			0.048
Localized disease	50(76.9)	78 (61.4)	
Inoperable locally advanced disease	12 (18.5)	30 (23.6)	
Metastatic disease	3 (4.6)	19 (14.9)	
LN status, n (%)			0.0012
negative	39 (60.0)	45 (35.4)	
positive	26 (40.0)	82 (65.6)	
Estrogen Receptor, n (%)			0.004
Positive	61 (93.8)	98(77.2)	
Negative	4 (6.2)	29 (22.8)	

Progesterone Receptor, n (%)			0.036
Positive	52 (80.0)	83 (65.4)	
Negative	13 (20.0)	44 (34.6)	
HER2, n (%)			0.959
Positive	13 (20.0)	25 (19.7)	
Negative	52 (80.0)	102 (80.3)	
Ki-67, n (%)			0.0003
<14%	32 (49.2)	30 (23.6)	
≥ 14%	33 (50.8)	97 (76.4)	
Intrinsic subtype, n (%)			<.0001
Luminal A	31 (47.7)	24 (18.8)	
Luminal B	21 (32.3)	59 (46.5)	
non-luminal HER2	13 (20.0)	25 (19.7)	
Triple negative	0 (0.0)	19 (15.0)	

BC, breast cancer; LN, lymph node

^aSignificantly different if $P < 0.05$ (Chi-Square Test).

Table 3. Multivariate-adjusted stratified analyses of clinicopathological variables according to deficient serum of 25-hydroxy vitamin D levels.

Variables	Odds ratio (OR) ^a	CI 95%	P-value ^b
Estrogen receptor -	4.18	1.17-15.87	0.034
Ki-67≥14%	2.78	1.34-66.65	0.005
Lymph node positive	2.26	1.10-5.16	0.043

Note: Only statistically significant results are presented. Other variables did not show significance.

^aOdds Ratio (OR) adjusted for age, time of menopause and body mass index

^bSignificantly different if $p < 0.05$ (Logistic regression)

Discussion

In this study, we evaluated the long-standing interest in studying the relationship and potential impact of vitamin D level in patient with newly diagnosed breast cancer. Partly because numerous trials have been investigating the association between circulating vitamin D levels and breast cancer risk, but few have been designed to assess a possible relation of vitamin D with the prognostic features in breast cancer or with regard to the recent different molecular subtypes.^{12, 40-44}

Consistent with previous trials, which report 50-74% vitamin D deficiency in newly diagnosed breast cancer patients,^{16-19,31,45} our study demonstrated that 66.2% of patients with breast cancer had a deficient level of vitamin D. This fact may have more impact when analyzed by clinicopathological parameters in our study, considering that compared to the patients with normal level of vitamin D, those with a deficient level of vitamin D at diagnosis had a greater risk of breast cancer with tumor grade 3, higher rate of positive lymph node status, locally advanced and metastatic disease and ultimately a worse prognosis. This is in accordance with literature data showing that locally advanced breast cancer patients have more severe vitamin D deficiency than those with early stage disease.^{40,44} Thanasitthichai et al.⁴³ conducted a cross-sectional analysis of vitamin D levels and clinicopathological characteristics in 200 cases of breast cancer. Low vitamin D level (<32 ng/mL) was significantly found in majority of cases with advanced stage of the disease, positive node involvement and large tumors.⁴³ In view of the increasing number of cancer survivors and the high prevalence of vitamin D deficiency among patients with cancer, an evaluation of the role of circulating 25-OHD in prognosis among patients with cancer is essential.⁴⁶

It suggests that lower serum vitamin D levels might have some contribution in the progression from early-stage to advanced disease as a result of altered gene transcription, supporting the hypothesis that vitamin D deficient has a role in the pathogenesis and progression of breast cancer.^{7,29} Some studies have demonstrated a reduction in vitamin receptor (VDR) expression in breast cancer cells compared to normal breast cells, by VDR gene polymorphisms.⁴⁷⁻⁴⁹ During malignant transformation of the breast, tumor cells lose the ability to synthesize the active form of vitamin D and to respond to the effects of vitamin D mediated by VDR.⁴⁷ In breast cancer, the expression of VDR varies from 58% to 80%, with reports of patients with VDR positive tumors showing a higher disease-free survival rate.⁹

Prospective trials have sustained this conception. Goodwin et al.³¹, measuring all-cause mortality rates in breast cancer patients, found that women who had vitamin D deficiency when they were diagnosed with breast cancer were 94% more likely to have their cancer metastasized and 73% more likely to die within 10 years. The authors also found that only 24% of the women in the study had adequate levels of vitamin D at the time of the diagnosis.³¹ Likewise, in a current large prospective cohort study with more than 4500 women diagnosed with breast cancer followed up for 96 months, Yao et al.⁴⁴ showed that serum 25OHD concentrations at diagnosis were lower in women with advanced-stage tumors and levels were inversely associated with hazards of disease progression and death.⁴⁴ Hatse et al.⁵⁰ correlated serum 25(OH)D levels with tumor characteristics and clinical disease outcome in 1800 early breast cancer patients. Lower 25(OH)D serum levels significantly correlated with larger tumor size at diagnosis but not with lymph node invasion, receptor status, or tumor grade. High serum 25(OH)D (>30 ng/mL) at diagnosis significantly correlated with improved overall

survival and disease-specific survival. However, when considering menopausal status, serum 25OHD had a strong impact on breast cancer-specific outcome in postmenopausal patients, whereas no association could be demonstrated in premenopausal patients.⁵⁰

In our study, a lesser proportion of estrogen and progesterone receptors positives tumors and higher Ki-67 was observed in patient with deficient vitamin D levels and, interestingly, all patients with biologically aggressive triple-negative tumor phenotype were vitamin D deficient. In regard to prognostic biomarkers and their relation with vitamin D level, similar results have been observed.^{51,52} Estrogen receptor (ER) and, to a lesser extent progesterone receptor (PR) have long been accepted as playing a central role in the pathobiology and treatment of breast cancer by predicting an indolent and slowly growing tumor with longer time to disease recurrence.^{53,54} Robien et al.⁵¹ showed a strong relation between postmenopausal women with low vitamin D intake and a higher risk of negative estrogen and progesterone receptor breast cancers.⁵¹ Shirazi et al.⁵² investigated the potential association between pre-diagnostic serum 25(OH)D levels and the risk of different subtypes of breast cancer. The study was based on The Malmo Diet and Cancer Study recruiting 17,035 women from 1991 to 1996. A total of 764 incident breast cancers with matched controls were analyzed for 25(OH)D in samples collected at baseline, before diagnosis. As compared to the first tertile of 25OHD₃, the second tertile had a significantly lower risk of ER and PR negative tumors and with a high expression of Ki-67. However, the third tertile had a similar risk as the first one.⁵²

The relationship of vitamin D with breast cancer risk may be subtype-specific, with emerging evidence of stronger effects of vitamin D for more aggressive breast

cancer.⁵⁵ An aggressive subtype of breast cancer is the triple negative breast cancer, which lacks expression of ER and PR, without amplification of HER2 and expresses a high proliferation rate.⁵ In our study, all cases of triple negative were detected in vitamin D deficient women. In the current literature, some studies have shown that while vitamin D deficiency is common in all breast cancer patient populations, it is particularly prevalent in those with these triple negative tumors.⁵⁶ Rainville et al.⁵⁷, in a case series, observed that 87% of triple negative patients had the lowest average and median baseline vitamin D level and had the highest percentage with vitamin D deficiency.⁵⁷ Park et al.⁵⁸, in a large case–control study, compared serum 25(OH)D between breast cancer patients (n= 3634) and general population (n = 17,133). The adjusted odds ratio (OR) for breast cancer comparing women with deficient level of serum 25(OH)D to women with sufficient level of serum 25(OH)D was 1.27 (1.15–1.39). The inverse association remained significant in both positive and negative hormone receptor (HR) status of the tumor. However, this association was more pronounced in HR-negative breast cancer, particularly with triple-negative breast cancer patients (1.45, 95 % CI 1.15–1.82). This association did not significantly vary by menopausal status (pre-menopause vs. post-menopause).⁵⁸ Since studies have demonstrated a high prevalence of vitamin D deficiency in women with triple-negative breast cancer, correction of vitamin D deficiency in these women represents a reasonable, but yet untested, strategy to delay recurrence and extend survival.⁵⁶

In our study, the serum vitamin D assessment was collected immediately after diagnosis of breast cancer prior to the proposed treatment, approximately 20 to 30 days post-diagnosis. However, some studies that found an association between reduced values of 25(OH)D with the highest incidence of breast cancer performed the

dosages of vitamin D at some interval after the diagnosis of breast cancer,¹³⁻¹⁵ with potential changes for cancer treatment. For example, women with lower physical activity have lower values of 25(OH)D, and it is recognized that physical activity is reduced after the diagnosis of breast cancer.⁵⁹ Vrieling et al.¹⁷, in a prospective cohort study, assessed the effect of post-diagnostic serum 25(OH)D on overall survival and distant disease-free survival in 1,295 incident postmenopausal breast cancer patients (50-74 years), with median follow-up was 5.8 years. Lower concentrations of 25(OH)D were linearly associated with a higher risk of death and significantly higher risk of distant recurrence. Compared with the highest tertile, patients within the lowest tertile of 25(OH)D had a HR for overall survival of 1.55 (95%CI, 1.00 to 2.39) and a HR for distant disease-free survival of 2.09 (95%CI, 1.29 to 3.41). In addition, the association with overall survival was found to be significant only for 25(OH)D levels of blood samples collected before start of chemotherapy but not for those of samples taken after start of chemotherapy.¹⁷ A meta-analysis, which correlated serum 25(OH)D with breast cancer risk, confirmed an inverse correlation in case-control studies sampling 25(OH)D immediately after breast cancer diagnosis, but not in prospective studies when 25(OH)D measurement was done years before diagnosis.⁶⁰

Due to the nature of our data, our results do not allow for definite causal conclusions, i.e., whether low 25(OH)D levels cause worse prognostic features in breast cancer. As breast cancer is a disease that develops over several years, a major assumption for a causal relationship between 25OHD levels and breast cancer is that 25OHD levels, in the individual subject, are at a steady level for a longer time period. Thus, a limitation of our study is that only a single measurement of vitamin D at diagnosis was used, which may not necessarily represent vitamin D levels at the time of

cancer initiation. However, in a study, the correlation coefficient for measurement of 25OHD concentrations in serum samples collected in 1994 and 2008 ranged from 0.42 to 0.52, and was 0.80 when measured 12 months apart,⁶¹ suggesting reasonable stability of endogenous vitamin D status. However, more studies are needed on whether a single measurement of a plasma 25OHD level is a sensitive indicator of a person's long-term vitamin D status.

Conclusion

In postmenopausal women with breast cancer, there was an association between VD deficiency and tumors with worse prognostic features. Vitamin D deficiency was shown to be a risk factor for estrogen receptor negative tumors, positive axillary lymph node status and a higher rate of cell proliferation.

References

1. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2015.
2. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José A. Lencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015
3. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R545–R262.
4. Bertos NR, Park M. Breast cancer: one term, many entities? *J Clin Invest* 2011;121:3789–3796
5. 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. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes– dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736–47.
 7. Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 49-59.
 8. Khan KA, Akram J, Fazal M. Hormonal actions of vitamin D and its role beyond just being a vitamin: A review article. *Int J Med Sci* 2011;3:65-72.
 9. Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chen Z, Shang X, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE* 2013;8(3): e57967
 10. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ: Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 2003;133:2425S-2433S.
 11. Narvaez CJ, Matthews D, LaPorta E, Simmons KM, Beaudin S, Welsh JO. The impact of vitamin D in breast cancer: genomics, pathways, metabolism. *Front Physiol* 2014;5(213)1-8.
 12. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE: Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1991-1997.
 13. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston KW: Plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer* 2005;41:1164-1196.

14. Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J: Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer: results of a large case–control study. *Carcinogenesis* 2008, 29:93-99.
15. Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL. High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009, 27:2151-2156.
16. Rejnmark L, Tietze A, Vestergaard P, Buhl L, Lehbrink M, Heickendorff L, Mosekilde L. Reduced prediagnostic 25-hydroxyvitamin D levels in women with breast cancer: a nested
17. Vrieling A, Hein R, Abbas S, et al. Serum 25- hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R74.
18. Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupré T, Mesrine S, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F. Serum 25(OH) Vitamin D and Risk of Breast Cancer: A Nested Case-Control Study from the French E3N Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 19(9); 2341–50.
19. Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røksahm TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control* 2012;23:363–70.
20. McCullough ML, Stevens VL, Patel R, Jacobs EJ, Bain EB, Horst RL, Gapstur SM, Thun MJ, Calle EE. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and postmenopausal breast cancer risk: a nested case control study in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *Breast Cancer Res* 2009, 11:R64.

21. Almquist M, Bondeson AG, Bondeson L, Malm J, Manjer J. Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk-a prospective nested case-control study. *Int J Cancer* 2010, 127:2159-2168.
22. Eliassen AH, Spiegelman D, Hollis BW, Horst RL, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study II. *Breast Cancer Res* 2011;13:R50.
23. Amir E, Cecchini RS, Ganz PA, Costantino JP, Beddows S, Hood N, Goodwin PJ. 25-Hydroxy vitamin-D, obesity, and associated variables as predictors of breast cancer risk and tamoxifen benefit in NSABP-P1. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:1077-1088.
24. Kuhn T, Kaaks R, Becker S, Eomois PP, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and the risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition: a nested case-control study. *Int J Cancer* 2013; 133(7):1689–700
25. Scarmo S, Afanasyeva Y, Lenner P, Koenig KL, Horst RL, Clendenen TV, et al. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Res* 2013; 15(1):R15.
26. Wang J, Eliassen AH, Spiegelman D, Willett WC, Hankinson SE. Plasma free 25-hydroxyvitamin D, vitamin D binding protein, and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study II. *Cancer Causes Control* 2014; 25:819–27.
27. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, et al. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16:713–716.
28. Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical chemistry*. 2010;56(5):729-31.

29. Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59:1334-1336.
30. Neuhouser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambis A, Ulrich CM, McTiernan A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner K, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr* 2008;88:133-139.
31. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic Effects of 25-Hydroxyvitamin D Levels in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(23):3757–63.
32. Mohr SB, Gorham ED, Kim J, Hofflich H, Garland CF. Meta-analysis of Vitamin D Sufficiency for Improving Survival of Patients with Breast Cancer. *Anticancer Res* 2014; 34: 1163-1166.
33. NCEP - Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
34. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 1993;46:189-90.
35. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, Elias AD, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goetz M, Goldstein LJ, Hudis CA, Isakoff SJ, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Moran M, Patel SA, Pierce LJ, Reed EC, Salerno KE, Schwartzberg LS, Smith KL, Smith ML, Soliman H, Somlo G, Telli M, Ward JH, Shead DA, Kumar R. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2015;13:1475–1485

36. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Jun;134(6):907-22.
37. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418–23.
38. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology.; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):241-56.
39. Kermani IA, Kojidi HT, Gharamaleki JV, Sanaat Z, Ziaei JE, Esfahani A, et al. Association of serum level of 25 hydroxy-vitamin D with prognostic factors for breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2011;12(6):1381-4.
40. Yao S, Sucheston LE, Millen AE, Johnson CS, Trump DL, Nesline MK, et al. Pretreatment serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and breast cancer

- prognostic characteristics: a case-control and a case-series study. *PLoS One* 2011;6:e17251.
41. Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, Insalaco MR, Skinner KA. The association between breast cancer prognostic indicators and serum 25-OH vitamin D levels. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2590e9.
 42. Habib JG, Espirito JL, Harrell RK, Turnwald B, O'Shaughnessy J, Epstein EH, et al. Vitamin D levels, triple-negative histology, and geography in breast cancer: a retrospective analysis of a large database of oncology practices in the United States. *J Clin Oncol* 2014;32.
 43. Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16 (12):4881-3.
 44. Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, Roh JM, Cheng TD, Hong C, McCann SE, Tang L, Davis W, Liu S, Quesenberry CP, Lee MM, Ambrosone CB, Kushi LH. Association of serum level of Vitamin D at diagnosis with breast cancer survival. A case-cohort analysis in the Pathways Study. *JAMA Oncol* 2017; in press.
 45. Iqbal R, Khan AH. Possible causes of vitamin D deficiency in Pakistani population residing in Pakistan. *J Pak Med Assoc* 2010;60:1-2.
 46. Toriola AT, Nguyen N, Scheitler-Ring K, Colditz GA. Circulating 25-hydroxyvitamin D Levels and Prognosis among Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(6): 917–33.
 47. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D. Alterations in Vitamin D signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and

- CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 2012; 10:483.
48. Engel LS, Orlow I, Sima CS, Satagopan JM, Mujumdar UJ, et al. Vitamin D receptor gene haplotypes and polymorphisms and risk of breast cancer: A nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(10):1856–67.
 49. Abd-Elsalam EA, Ismaeil NA, Abd-Alsalam HS. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women. *Tumor Biol* 2015;36:6425–31.
 50. Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, Smeets A, Brouwers B, Vandorpe T, Brouckaert O, Peuteman G, Laenen A, Verlinden L, Kriebitzsch C, Dieudonné AS, Paridaens R, Neven P, Christiaens MR, Bouillon R, Wildiers H. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis* 2012;33(7):1319–26.
 51. Robien K, Cutler GJ, Lazovich D. Vitamin D intake and breast cancer risk in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Causes Control* 2007;18:775-82.
 52. Shirazi L, Almquist M, Borgquist S, Malm J, Manjer J. Serum vitamin D (25OHD3) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case-control study. *Breast* 2016;28:184-190.
 53. Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:550–6.
 54. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;76:27–36.

55. Yao S, Ambrosone CB. Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;136:337e41.
56. LaPorta E, Welsh JE. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144:65–73.
57. Rainville, C., Khan , Y., and Tisman, G. (2009). Triple negative breast cancer patients presenting with low serum vitamin D levels: a case series. *Cases J.* 2:8390. doi: 10.4076/1757-1626-2-8390
58. Park S, Lee DH, Jeon JY, Ryu J, Kim S, Kim JY, Park HS, Kim SI, Park BW. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and increased risk of breast cancer among Korean women: a case–control study. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Jul;152(1):147-54.
59. Chlebowski RT. Vitamin D and breast cancer: interpreting current Evidence. *Breast Cancer Research* 2011;13:217.
60. Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H. Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk. *Eur J Cancer* 2010;46(12):2196-205.
61. Pendas-Franco N, Gonzalez-Sancho JM, Suarez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, et al. Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. *Differentiation* 2007 75: 193–207.

5. Conclusões

No presente estudo, foi observada associação entre a deficiência de vitamina D e perfil imuno-histoquímico de pior prognóstico. Em relação às mulheres com valores adequados de vitamina D, aquelas com deficiência tiveram maior risco de câncer de mama de pior prognóstico, caracterizado por estágios mais avançados e alto grau histológico. A deficiência de vitamina D mostrou-se como fator de risco para tumores receptores estrogênicos negativos, com axila positiva e maior taxa de proliferação celular.

6. Referências

1. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2015.
2. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José A lencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015
3. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, Burke W, Costanza ME, Evans WP 3rd, et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. CA Cancer J Clin 2003;53(3):141-69.
4. Miller K, Ben-Aharon I, Haines L. Seasons of survival: redefining the paradigm for cancer survivorship for 2012. J Oncol Navig Surviv 2012;2(5):12–5.
5. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A, Marcos-Gragera R, Stiller C, Azevedo e Silva G, Chen WQ, Ogunbiyi OJ, Rachet B, Soeberg MJ, You H, Matsuda T, Bielska-Lasota M, Storm H, Tucker TC, Coleman MP; CONCORDWorking Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). Lancet 2015;385(9972):977-1010.
6. Nunes RD. Estudo de sobrevida das mulheres com câncer de mama na cidade de Goiânia, entre 1995 e 2003. Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás; 2011.
7. DeVita VT , Lawrence TS, Rosenberg SA, et al(2008). DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 1606-54.

8. Mittendorf EA, Ballman KV, McCall LM, Yi M, Sahin AA, Bedrosian I, et al. Evaluation of the stage I B designation of the American Joint Committee on Cancer staging system in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2014;32:1–10.
9. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;124(7):966–78.
10. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.
11. Habib JG, Espirito JL, Harrell RK, Turnwald B, O'Shaughnessy J, Epstein EH, et al. Vitamin D levels, triple-negative histology, and geography in breast cancer: a retrospective analysis of a large database of oncology practices in the United States. *J Clin Oncol* 2014;32.
12. National Institutes of Health NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA*. 1991;265:391–5.
13. Kroman N, Jensen M, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *BMJ*. 2000;320(7233):474-8
14. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63:181–7.
15. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer*. 1980;45(12):2917–24.

16. Whitworth P, McMasters KM, Tafra L, Edwards MJ. State-of-the-art lymph node staging for breast cancer in the year 2000. *Am J Surg.* 2000;180(4):262–7.
17. Tavassoli F, Eusebi V, editors. Tumors of the mammary gland, AFIP atlas of tumor pathology, vol. 4. Maryland: ARP Press; 2009.
18. In Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.
19. Badve S. Sentinel lymph node biopsy. In: Dabbs DJ, editor. Breast pathology. 1st ed. Elsevier/Saunders: Philadelphia; 2012. p. 93–116.
20. Hoda SA. Invasive ductal carcinoma: assessment of prognosis with morphologic and biologic markers. In: Rosen's breast pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2014. p. 413–68.
21. In Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.
22. Blamey RW, Hornmark-Stenstam B, Ball G, Blichert-Toft M, Cataliotti L, Fourquet A, et al. ONCOPOOL: a European database for 16,944 cases of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46:56–71.
23. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, editors. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2012.
24. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II, Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1992;20:479–89.
25. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 1993;46:189–90.

26. Tavassoli FA, Devilee P: World Health Organization classification of tumours. In Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003:19-23.
27. Pathology Reporting of Breast Disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. Sheffield; NHS Cancer Screening Programmes and The Royal College of Pathologists; January 2005.
28. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol* (2010) 17:1471–1474
29. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, Elias AD, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goetz M, Goldstein LJ, Hudis CA, Isakoff SJ, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Moran M, Patel SA, Pierce LJ, Reed EC, Salerno KE, Schwartzberg LS, Smith KL, Smith ML, Soliman H, Somlo G, Telli M, Ward JH, Shad DA, Kumar R. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016 Mar;14(3):324-54.
30. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
31. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, Colpaert CG, van Dam P, Dirix LY, et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. *Br J Cancer*. 2006;94:1643–9.

32. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351 2817–2826.
33. Viale G, Regan MM, Maiorano E, Mastropasqua MG, Dell’Orto P, Rasmussen BB, Raffoul J, Neven P, Orosz Z, Braye S et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; 25 3846–3852.
34. Dowsett M, Allred C, Knox J, Quinn E, Salter J, Wale C, Cuzick J, Houghton J, Williams N, Mallon E et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *J Clin Oncol* 2008; 26 1059–1065.
35. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;76:27–36.
36. Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:550–6.
37. 113. Fisher ER, Osborne CK, McGuire WL, Redmond C, Knight 3rd WA, Fisher B, et al. Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. *Breast Cancer Res Treat.* 1981;1:37–41.
38. Hess KR, Puztai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;78:105–18.

39. Koenders PG, Beex LV, Langens R, KloppenborgPW, Smals AG, Benraad TJ. Steroid hormone receptoractivity of primary human breast cancer and patternof first metastasis. The Breast Cancer StudyGroup. Breast Cancer Res Treat. 1991;18:27–32.
40. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, HagertyKL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society ofClinical Oncology/College of American Pathologistsguideline recommendations for human epidermalgrowth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25:1–28.
41. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M,McShane LM, Allison KH, et al. Recommendationsfor Human Epidermal Growth Factor Receptor 2Testing in Breast Cancer: American Society ofClinical Oncology/College of American PathologistsClinical Practice Guideline Update. J Clin Oncol.2013;31(31):3997–4013.
42. Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D,Edgerton S, Cowan D, et al. HER2 and response topaclitaxel in node-positive breast cancer. N Engl JMed. 2007;357:1496–506.
43. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET,Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response toadjuvant therapy in women with node-positive earlybreast cancer. N Engl J Med. 1994;330:1260–6.
44. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B,Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumabafter adjuvant chemotherapy in HER2-positivebreast cancer. N Engl J Med. 2005;353:1659–72.

45. Dent S, Oyan B, Honig A, Mano M, Howell S. HER2-targeted therapy in breast cancer: a systematic review of neoadjuvant trials. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(6):622–31.
46. Gerdes J, Schlueter CLL, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 238:867-73.
47. Polley MY, Leung SC, Gao D, Mastropasqua MG, Zabaglo LA, Bartlett JM, et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol.* 2015;38:1–9.
48. 102. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687–717.
49. Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 1997;74:433–437.
50. Bertos NR, Park M. Breast cancer: one term, many entities? *J Clin Invest* 2011;121:3789–3796.
51. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736–1747.

52. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360:790–800.
53. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular Portraits of Human Breast. *Nature* 2000;406 (6797):747-752
54. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(2):203-9.
55. 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. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
56. Caan BJ, Sweeney C, Habel LA, Kwan ML, Kroenke CH, Weltzien EK, Quesenberry CP Jr, Castillo A, Factor RE, Kushi LH, Bernard PS. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: prognostication of short- and long-term outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23(5):725-34.
57. Prat, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* , Volume 24 , S26 - S35.
58. Allred CD. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. *Oncologist*. 2008;13:1134–6.

59. Blamey RW. Guidelines on endocrine therapy of breast cancer EUSOMA. Eur J Cancer. 2002;38:615–34.
60. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. J Clin Oncol. 1999;17:1474–81.
61. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. J Clin Oncol. 2005;23:7721–35.
62. Jiang ZF, Cristofanilli M, Shao ZM, Tong ZS, Song EW, Wang XJ, et al. Circulating tumor cells predict progression-free and overall survival in Chinese patients with metastatic breast cancer, HER2-positive or triple-negative (CBCSG004): a multicenter, double-blind, prospective trial. Ann Oncol. 2013;24:2766–72.
63. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. The New England journal of medicine. 2011;364(3):248-54.
64. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am J Clin Nutr 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
65. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med 2007;357:266–81.
66. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, et al. Estimates of optimal vitamin D status. Osteoporos Int 2005;16:713–716.
67. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. Osteoporosis international 2010;21(7):1151-4.

68. Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD, Cole DE, et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal* 2010;182(12):E610-8.
69. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
70. Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical chemistry*. 2010;56(5):729-31.
71. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370(9588):657-66.
72. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *The British journal of nutrition*. 2014;111(1):23-45.
73. Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *Journal of internal medicine*. 2006;260(3):245-54.
74. Russo LA, Gregorio LH, Lacativa PG, Marinheiro LP. [Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53(9):1079-87.

75. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhaes MC, Sasaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clinical nutrition*. 2010;29(6):784-8.
76. Maeda SS, Saraiva GL, Kunii IS, Hayashi LF, Cendoroglo MS, Ramos LR, et al. Factors affecting vitamin D status in different populations in the city of Sao Paulo, Brazil: the Sao Paulo vitamin D Evaluation Study (SPADES). *BMC Endocrine Disorders*. 2013;13(1):14.
77. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
78. Rosen CJ, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(4):1146-52.
79. Mason RS. Vitamin D: a hormone for all seasons. *Climacteric* 2011;14(2):197-203.
80. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, et. al. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84:18–28.
81. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338(2):143-56.
82. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy reports* 2014;3:495.
83. Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chen Z, Shang X, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE* 2013;8(3): e57967

84. Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Moseley JM: 1,25-dihydroxyvitamin-D receptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979;2(8156-8157):1335-1336.
85. Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ: Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 2003;133:2425S-2433S.
86. Colston KW. Vitamin D and breast cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(4):587–99.
87. Scarmo S, Afanasyeva Y, Lenner P, Koenig KL, Horst RL, Clendenen TV, et al. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Res* 2013; 15(1):R15.
88. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5):342–57
89. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, et al. Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res* 2006; 66(9):4574–83.
90. Kommagani R, Payal V, Kadakia MP. Differential regulation of vitamin D receptor (VDR) by the p53 Family: p73-dependent induction of VDR upon DNA damage. *J Biol Chem* 2007; 282(41):29847–54.
91. Chen H, Reed G, Guardia J, Lakhan S, Couture O, Hays E, et al. Vitamin D directly regulates Mdm2 gene expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(1):370–4.
92. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D. Alterations in Vitamin D signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 2012; 10:483.

93. Engel LS, Orlow I, Sima CS, Satagopan JM, Mujumdar UJ, et al. Vitamin D receptor gene haplotypes and polymorphisms and risk of breast cancer: A nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(10):1856–67.
94. Abd-Elsalam EA, Ismaeil **NA**, Abd-Alsalam HS. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women. *Tumor Biol* 2015;36:6425–31.
95. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 2000; 87: 214–20
96. Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:1721S-1724S.
97. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012;441(1):61–76.
98. Wang J, Slominski A, Tuckey RC, Janjetovic Z, Kulkarni A, Chen J, Postlethwaite AE, Miller D, Li W. 20-hydroxyvitamin D inhibits proliferation of cancer cells with high efficacy while being non-toxic. *Anticancer Res* 2012;32(3):739-46.
99. Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 2007;3(4):225-30.
100. Costa JL, Eijk PP, van de Wiel MA, Berge D, Schmitt F, Narvaez CJ, Welsh J, Ylstra B. Anti-proliferative action of vitamin D in MCF7 is still active after siRNA-VDR knock-down. *BMC Genomics* 2009;10:499.
101. Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16 (12), 4881-4883

102. Zinser GM, McEleney K, Welsh J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2003;200(1-2):67-80.
103. Zinser GM, Welsh JE. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed post-lactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Mol Endocrinol* 2004;18:2208–2223.
104. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC: Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(3):607-613.
105. Freake HC, Abeyasekera G, Iwasaki J, Marcocci C, MacIntyre I, McClelland RA, Skilton RA, Easton DF, Coombes RC: Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res* 1984;44(4):1677-1681.
106. Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W, Zirpoli G, McCann SE, Khoury T, Morrison CD, Edge SB, Ambrosone CB, Yao S. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin Cancer Res* 2017;23(1):97-103.
107. LaPorta E, Welsh J. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144:65–73.
108. Neuhouser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambbs A, Ulrich CM, McTiernan A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner K, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr* 2008;88:133-139.

109. Crew KD, Shane E, Cremers S, McMahon DJ, Irani D, Hershman DL. High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009, 27:2151-2156.
110. Napoli N, Vattikuti S, Ma C, Rastelli A, Rayani A, Donepudi R, Asadfard M, Yarramaneni J, Ellis M, Armamento-Villareal R: High prevalence of low vitamin D and musculoskeletal complaints in women with breast cancer. *Breast J* 2010;16:609-616.
111. McCullough ML, Stevens VL, Patel R, Jacobs EJ, Bain EB, Horst RL, Gapstur SM, Thun MJ, Calle EE: Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and postmenopausal breast cancer risk: a nested case control study in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *Breast Cancer Res* 2009, 11:R64.
112. Almquist M, Bondeson AG, Bondeson L, Malm J, Manjer J: Serum levels of vitamin D, PTH and calcium and breast cancer risk-a prospective nested case-control study. *Int J Cancer* 2010, 127:2159-2168.
113. Eliassen AH, Spiegelman D, Hollis BW, Horst RL, Willett WC, Hankinson SE: Plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study II. *Breast Cancer Res* 2011;13:R50.
114. Amir E, Cecchini RS, Ganz PA, Costantino JP, Beddows S, Hood N, Goodwin PJ: 25-Hydroxy vitamin-D, obesity, and associated variables as predictors of breast cancer risk and tamoxifen benefit in NSABP-P1. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:1077-1088.
115. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2014; 110(11):2772–84.

116. Visvanathan K, Mondul A, Zeleniuch-Jacquotte A, Mukhtar TK, Smith-Warner SA, Ziegler RG. Circulating vitamin D concentrations and breast cancer risk: A pooled analysis of 17 cohorts. *Cancer Research* 2015; 75(9 Supplement):P3-07-1.
117. Kuhn T, Kaaks R, Becker S, Eomois PP, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and the risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition: a nested case-control study. *Int J Cancer* 2013; 133(7):1689–700
118. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE: Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1991-1997.
119. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1160-7. Rejnmark L, Tietze A, Vestergaard P, Buhl L, Lehbrink M, Heickendorff L, Mosekilde L: Reduced prediagnostic 25-hydroxyvitamin D levels in women with breast cancer: a nested
120. Vrieling A, Hein R, Abbas S, et al. Serum 25- hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R74.
121. Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røksahm TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control* 2012;23:363–70.

122. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston KW: Plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer* 2005;41:1164-1196.
123. Abbas S, Linseisen J, Slinger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J: Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer: results of a large case–control study. *Carcinogenesis* 2008, 29:93-99.
124. Chlebowski RT. Vitamin D and breast cancer: interpreting current Evidence. *Breast Cancer Research* 2011;13:217.
125. Kawase T, Matsuo M, Suzuki T, Hirose K, Hosono S, Watanabe M, et al. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci* 2010; 101: 1234–1240
126. Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, et al.; for the Women’s Health Initiative Investigators. Calcium Plus Vitamin D Supplementation and the Risk of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;100: 1581-1591.
127. Chen P, Hu P, Xie D, Oin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121(2):469-77
128. Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59:1334-1336.
129. IARC- International Agency for Research on Cancer: Vitamin D and cancer. In *IARC Working Group Reports. Volume 5*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008:143-148.

130. IOM- Institute of Medicine; Food and Nutrition Board: In Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Edited by: Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB. Washington, DC: Institute of Medicine; Food and Nutrition Board; 2010.
131. Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA: Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2011, 155:827-838.
132. Ross CA, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96:53-58.
133. Kim HJ, Lee YM, Ko BS, Lee JW, Yu JH, Son BH, et al. Vitamin D Deficiency is Correlated with Poor Outcomes in Patients with Luminal-type Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2011;18:1830–1836.
134. Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, Roh JM, Cheng TD, Hong C, McCann SE, Tang L, Davis W, Liu S, Quesenberry CP, Lee MM, Ambrosone CB, Kushi LH. Association of serum level of Vitamin D at diagnosis with breast cancer survival. A case-cohort analysis in the Pathways Study. *JAMA Oncol* 2017; in press.
135. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic Effects of 25-Hydroxyvitamin D Levels in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(23):3757–63.
136. Toriola AT, Nguyen N, Scheitler-Ring K, Colditz GA. Circulating 25-hydroxyvitamin D Levels and Prognosis among Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(6): 917–33.

137. Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, Smeets A, Brouwers B, Vandorpe T, Brouckaert O, Peuteman G, Laenen A, Verlinden L, Kriebitzsch C, Dieudonné AS, Paridaens R, Neven P, Christiaens MR, Bouillon R, Wildiers H. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis* 2012;33(7):1319–26.
138. Vrieling A, Hein R, Abbas S, et al. Serum 25- hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R74.
139. Jacobs ET, Thomson CA, Flatt SW, Al-Delaimy WK, Hibler EA, Jones LA, et al. Vitamin D and breast cancer recurrence in the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) Study. *Am J Clin Nutr* 2011;93:
140. Villasenor A, Ballard-Barbash R, Ambis A, Bernstein L, Baumgartner K, Baumgartner R, et al. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Cancer Causes Control* 2013; 24:759–67.
141. Mohr SB, Gorham ED, Kim J, Hofflich H, Garland CF. Meta-analysis of Vitamin D Sufficiency for Improving Survival of Patients with Breast Cancer. *Anticancer Res* 2014; 34: 1163-1166.
142. Agborsangaya CB, Surcel HM, Toriola AT, Pukkala E, Parkkila S, Tuohimaa P, Lukanova A, Lehtinen M. Serum 25-hydroxyvitamin D at pregnancy and risk of breast cancer in a prospective study. *Eur J Cancer* 2010; 46:467-470.
143. Kawase T, Matsuo M, Suzuki T, Hirose K, Hosono S, Watanabe M, et al. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk

- according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci* 2010; 101: 1234–1240
144. Shirazi L, Almquist M, Borgquist S, Malm J, Manjer J. Serum vitamin D (25OHD3) levels and the risk of different subtypes of breast cancer: A nested case-control study. *Breast* 2016;28:184-190
 145. Kermani IA, Kojidi HT, Gharamaleki JV, Sanaat Z, Ziaei JE, Esfahani A, et al. Association of serum level of 25 hydroxy-vitamin D with prognostic factors for breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2011;12(6):1381-4.
 146. NCEP - Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285(19):2486-97.
 147. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, Elias AD, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goetz M, Goldstein LJ, Hudis CA, Isakoff SJ, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Moran M, Patel SA, Pierce LJ, Reed EC, Salerno KE, Schwartzberg LS, Smith KL, Smith ML, Soliman H, Somlo G, Telli M, Ward JH, Shead DA, Kumar R. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016 Mar;14(3):324-54.
 148. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 1993;46:189-90.
 149. Wells CA, Heryet A, Brochier J, Gatter KC, Mason DY. The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer. *Br J Cancer*. 1984;50:193–7.

150. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Jun;134(6):907-22.
151. 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. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.
152. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology.; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):241-56.
153. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 2003;199:418–23.

7. Anexos

7.1. Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Você esta sendo convidada a participar do estudo “Associação entre a deficiência de vitamina D e o perfil imunoistoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa” que será realizado sob a responsabilidade do Dr. Bendito de Almeida Filho.

Este estudo deseja conhecer se existe associação entre os valores de vitamina D no sangue e o câncer de mama. Como a senhora está em acompanhamento no Serviço de Mastologia, do Hospital das Clínicas de Botucatu, está sendo convidada a participar desta pesquisa. Sua participação será autorizar utilizar dados sobre a sua saúde e resultados de exames que estão no seu prontuário. Para seu conhecimento, seus dados serão confidenciais e apenas dados em conjunto serão divulgados nas publicações em revistas médicas, sem identificação da sua pessoa. Os pesquisadores responsáveis estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas e sua participação é voluntária e tem o direito de receber informações adicionais sobre o estudo se achar necessário. A senhora pode retirar-se deste estudo, sem perder seus cuidados médicos. Caso não se sinta satisfeita poderá entrar em contato com os médicos responsáveis pela pesquisa e com Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo telefone 14-38801608.

Eu.....tendo sido satisfatoriamente informada, concordo em participar deste estudo. Declaro ter lido e compreendido este consentimento, na qual me foram informados os dados importantes sobre este estudo. Foi me oferecida ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Estou ciente de que este consentimento será produzido em duas iguais, em que uma será entregue a mim e outra será arquivada pelos pesquisadores.

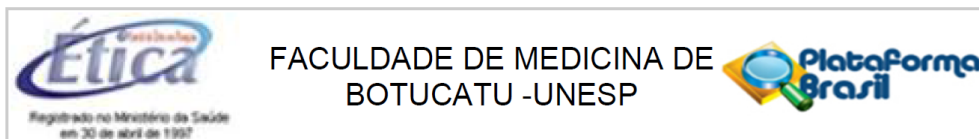
Botucatu, ____/____/____.

Assinatura da Participante

Assinatura do Pesquisador

Benedito de Almeida Filho- e-mail: almeidabeneditofilho@gmail.com Fone:38801377

7.2. Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre a deficiência de vitamina D e o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa

Pesquisador: BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 38506714.9.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 894.368

Data da Relatoria: 30/11/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado será desenvolvido na FMB-UNESP sob orientação da Profa Adjunta Eliana Petri A Nahas e executado pelo Médico Benedito Almeida Filho.

O estudo será desenvolvido através da análise de dados do prontuários médico de cada paciente, é um estudo retrospectivo de pacientes avaliadas no Centro de Avaliação em Mastologia, nos anos de 2012 e 2014. Serão coletados diversos dados do prontuários e associados com o diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau, estágio do tumor, status de receptor hormonal (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP; receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2, Her2), a atividade proliferativa epitelial (Ki67) e a expressão da proteína p-53. As dosagens de vitamina D também serão coletadas do prontuário.

O calculo amostral foi realizado no EAP (escritório de Apoio a Pesquisa) considerando estudos prévios. O "n" amostral relatado no projeto é de 153.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a associação entre a deficiência de vitamina D e o perfil imunoistoquímico do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 894.368

O estudo é retrospectivo e não expõe os sujeitos da pesquisa a riscos.

Benefício:

Conhecer o papel da vitamina D e sua associação com o diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau, estágio do tumor, status de receptor hormonal (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP; receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2, Her2), a atividade proliferativa epitelial (Ki67) e a expressão da proteína p-53.

O conhecimento poderá resultar em reposição de vitamina D em mulheres com hipovitaminose D.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo corretamente apresentado e a execução será com recurso próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as autorizações e o TCLE apresentados conforme recomendação deste Comitê.

Recomendações:

Nenhuma recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existe pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 01 de Dezembro de 2014, sem necessidade de envio à CONEP.

Solicitamos aos pesquisadores que apresentem ao CEP, o respectivo "Relatório Final de Atividades" ao final do estudo.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br