



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

MICHELLE SAKO OMODEI

**Suplementação de vitamina D em mulheres com
câncer de mama submetidas a quimioterapia
neoadjuvante: Ensaio clínico randomizado,
duplo-cego, placebo controlado**

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Titular Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Pessoa

Botucatu

2023

MICHELLE SAKO OMODEI

**Suplementação de vitamina D em mulheres com
câncer de mama submetidas a quimioterapia
neoadjuvante: Ensaio clínico randomizado, duplo-
cego, placebo controlado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para obtenção do Título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Titular Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho-Pessoa

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Omodei, Michelle Sako.

Suplementação de vitamina D em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante : ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo controlado / Michelle Sako Omodei. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahas
Coorientador: Eduardo Carvalho-Pessoa
Capes: 40101150

1. Mamas - Câncer. 2. Ensaio clínico. 3. Terapia Neoadjuvante. 4. Câncer - Tratamento. 5. Vitamina D.

Palavras-chave: Câncer de Mama; Ensaio clínico randomizado; Quimioterapia neoadjuvante; Resposta patológica completa; Vitamina D.

DEDICATÓRIAS

Dedico esta obra primeiramente à minha mãe e maior incentivadora, Eliane Sako, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por ser meu exemplo de persistência, foco e dedicação;

Ao meu padrasto, Edson de Jesus Miranda, que pelo seu exemplo de humildade, me trouxe muitas conquistas durante essa trajetória;

Ao meu esposo, Ricardo Batista Capelli, pela inspiração e admiração das nossas semelhanças acadêmicas, por ser fiel aos nossos princípios, pela compreensão, apoio e companheirismo.

À Medicina, meu profundo respeito e amor por esta profissão, que me escolheu para exercer da forma mais ética e íntegra possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Professora Titular Eliana Aguiar Petri Nahás, pela impecável orientação técnica e científica em todo o projeto, pela disponibilidade, pela educação e gentileza em todos os momentos, pelo acolhimento e aconselhamento, pela excelência e referência em profissionalismo;

Às queridas pacientes participantes do estudo, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho, minha eterna gratidão, respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço pela vida e pelas bênçãos infinitas que recebo todos os dias;

Aos meus familiares, Sako e Omodei, ao meu pai, João Carlos Omodei, e aos meus sogros, Paulo e Wania, por serem compreensivos com minha ausência e orgulhosos com minhas conquistas;

Ao meu co-orientador, Dr. Eduardo Carvalho Pessoa, pela referência, competência e grande educador na área de Mastologia;

Às professoras Dra. Heloisa De Luca Véspoli e a Dra. Carla Pessoa, minhas educadoras na área da Mastologia;

Ao Dr. Daniel Buttros, essencial para o desenvolvimento deste trabalho, meu profundo respeito e gratidão;

Ao meu grande amigo e referência de ser humano e profissional, Dr. Benedito Almeida Filho, pelo brilhantismo em todas as áreas e por ser tão presente, sempre contribuindo com meu aprendizado na área de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia desde a minha graduação;

Ao programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários pela disponibilidade em todas as necessidades.

À Solange Sako Cagliari, secretária da pós-graduação, pela eficiência, auxílio e disponibilidade em todos os serviços prestados, bem como pela educação e gentileza impecáveis durante todo o período;

À Professora Titular Maria Terezinha Serrão Peraçoli, à Dra Vanessa Rocha Ribeiro Vasques e à equipe do laboratório de Imunologia da Reprodução do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas - Setor de Imunologia, pela disponibilidade em colaborar na viabilização deste estudo;

À Professora Doutora Débora Cristina Damasceno, à Larissa Lopes da Cruz e à equipe do Laboratório de Pesquisa Experimento de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO), por agregar conhecimento, técnicas e discussões indispensáveis sobre o assunto;

À equipe de enfermagem do setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Botucatu e da Oncologia do Hospital Estadual Botucatu, em especial à técnica Marlene Cordeiro, pela eficiência, cuidados com as pacientes e auxílio direto e indireto;

Ao Professor Livre-Docente Leandro Gustavo de Oliveira, pela disponibilidade de equipamentos do laboratório responsável;

À aluna vinculada a este estudo, Jackeline Stieglitz Chemicoviaki, pela dedicação e organização;

Ao escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial a José Eduardo Corrente, pela assessoria estatística e análise dos resultados do estudo.

Às bibliotecárias da Biblioteca Central do Campus de Botucatu – UNESP pela elaboração da ficha catalográfica.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse trabalho e que principalmente contribuíram para a minha formação.

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro:

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

Auxílio à Pesquisa- Processo nº 2019/01351-8

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	14
1. Introdução	16
2. Objetivos	36
3. Métodos	37
4. Resultados	
4.1. Artigo Original	
Efeito da suplementação de vitamina D sobre a resposta patológica completa em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante: ensaio clínico randomizado.	45
5. Conclusões	82
6. Referências	83
7. Anexos	96
7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	96
7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB	98
7.3. Anexo III-<i>Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 1,25-diidroxivitamina D, calcitriol

25(OH)D - 25 hidroxivitamina D, calcidiol

AC - Doxorrubicina associado a ciclofosfamida

ACdd – Doxorrubicina associado a ciclofosfamida dose-densa

ACS – *American Cancer Society*

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ANOVA – Análise de variância

ASCO - *American Society of Clinical Oncology*

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CAM - Centro de Avaliação em Mastologia

CDK - Quinases ciclina-dependents

CMIA - *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*

CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials*

CSS – *Cancer specific survival*

CTNeoBC - *Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer*

DFS – *Disease-Free Survival*

EAP - Escritório de Apoio à Pesquisa

ELISA- *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

GLOBOCAN - *Global Cancer Statistics*

H - Herceptin

HER2 - Fator de crescimento epidérmico humano 2

HR – *Hazard ratio*

IC - Intervalo de confiança

IMC – Índice de massa corpórea

INCA – Instituto Nacional do Câncer

NCCN - *Clinical Practice Guidelines in Oncology*

OMS- Organização Mundial de Saúde

OS – *Overall survival*

PL – Placebo

PTH – paratormônio

QT – Quimioterapia

RE - Receptor de estrogênio

ReBEC - Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos

RP - Receptor de progesterona

RPC – Resposta Patológica Completa

RR – *Risk ratio*

SAS - *Statistical Analyses System*

T - Taxano

TC - Taxano associado a carboplatina

TNM - tamanho do tumor, status linfonodal, metástase

UI – Unidades

UNESP - Universidade Estadual Paulista

UVB - Ultravioleta B

VD – Vitamina D

VDR – Receptor de Vitamina D

Resumo

Objetivo: avaliar a taxa de resposta patológica completa (RPC) com a suplementação de vitamina D (VD) em mulheres com câncer de mama, submetidas à quimioterapia (QT) neoadjuvante.

Métodos: Foi conduzido ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado envolvendo 80 mulheres com idade ≥ 45 anos e diagnóstico recente histológico de câncer de mama, elegíveis para QT neoadjuvante. Foram excluídas mulheres com doença renal crônica (creatinina >1.4 mg/dL), doenças hepáticas, síndrome de má absorção, obesidade grau III (IMC ≥ 40 kg/m²), e usuárias de doses farmacológicas de VD. Estimou-se tamanho amostral de no mínimo 36 mulheres com câncer de mama por grupo (intervenção e placebo, n=72). As pacientes foram randomizadas em dois grupos: VD, com suplementação diária de 2000UI de colecalciferol (n=40) e PL, usuárias de placebo (n=40), durante período da QT neoadjuvante (6 meses). A medida de desfecho primário foi a RPC. Os valores séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] foram mensurados em dois momentos, no diagnóstico do câncer de mama e ao final da realização da QT neoadjuvante, empregando imunoensaio [25(OH) Vitamin D ELISA kit - ab213966] pela técnica de ELISA (*Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay*). A partir dos relatórios médicos foram coletados os dados clínicos, anatomopatológicos, imuno-histoquímicos e quimioterápicos. A análise estatística foi *per protocol*, empregando-se os Teste t-Student, Teste do Qui-Quadrado, Distribuição Gama, ANOVA e regressão logística (OR, odds ratio).

Resultados: Das 80 mulheres randomizadas, 75 pacientes completaram a QT neoadjuvante e realizaram a cirurgia. A média de idade das pacientes incluídas foi de 54.7 ± 8.6 anos para o grupo VD e de 56.3 ± 7.1 anos para o grupo PL ($p>0.05$). Os valores médios iniciais de

25(OH)D indicavam hipovitaminose D nos grupos VD e PL (19.6 ± 5.8 ng/mL e 21.0 ± 7.9 ng/mL, respectivamente ($p=0.331$). E no momento final da intervenção foi demonstrado aumento nos valores no grupo suplementado, com diferença significativa entre os grupos VD e PL ($28.0 \pm 8,7$ ng/mL vs 20.2 ± 6.1 ng/mL, respectivamente) ($p=0.032$). As mulheres suplementadas com VD apresentaram maior porcentagem de RPC quando comparada as mulheres do grupo PL (55.3% vs 32.4%, $p=0.046$). Na comparação entre as mulheres que apresentaram RPC no grupo VD ($n=21$) e no placebo ($n=12$) não foram observadas diferenças significativas na distribuição percentual entre os grupos na maioria das variáveis clínicas, anatomopatológicas e imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos ($p>0.05$). Foi observado no grupo VD menor ocorrência de tumores de alto grau histológico quando comparado grupo PL (52.4% vs 75.0%, respectivamente, $p=0.040$). No grupo VD foi encontrada maior porcentagem de mulheres com valores suficientes de VD [25(OH)D ≥ 30 ng/mL] quando comparadas a mulheres do grupo PL (61.9% vs 25.0%, respectivamente, $p=0.005$). Considerando como desfecho a RPC, quando realizado um modelo de regressão logística, ajustado para variáveis que interferem na RPC (anatomopatológicas, imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos), mulheres com valores de 25(OH)D ≥ 30 ng/mL apresentaram maior chance de obter RPC em relação às mulheres com deficiência de VD (OR 0.033 IC 95% 0.006-0.173, $p<0.001$).

Conclusões: No presente estudo, mulheres com câncer de mama submetidas a QT neoadjuvante e a suplementação de 2000UI de VD apresentaram maior chance de obter taxa de RPC quando comparada às mulheres do grupo placebo.

Abstract

Objective: to evaluate the pathological complete response (PCR) rate with vitamin D (VD) supplementation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy (CT).

Methods: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted involving 80 women aged ≥ 45 years with recent histological diagnosis of breast cancer, eligible for neoadjuvant CT. Women with chronic kidney disease (creatinine >1.4 mg/dL), liver diseases, malabsorption syndrome, grade III obesity ($BMI \geq 40$ kg/m²), and users of VD pharmacological doses were excluded. A sample size of at least 36 women with breast cancer per group (intervention and placebo, $n=72$) was estimated. Patients were randomized into two groups: VD, with daily supplementation of 2000UI of cholecalciferol ($n=40$) and PL, users of placebo ($n=40$), during the neoadjuvant CT period (6 months). The primary outcome measure was PCR. Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] values were measured, in two moments, at diagnosis of breast cancer, and at the end of the neoadjuvant CT, using immunoassay [25(OH) Vitamin D ELISA kit - ab213966] by the ELISA technique (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). From the medical reports, clinical, anatomopathological, immunohistochemical, and CT data were collected. Statistical analysis was per protocol, using Student's t-test, Chi-square test, Gamma distribution, ANOVA and logistic regression (OR, odds ratio).

Results: Of the 80 women randomized, 75 patients completed neoadjuvant CT and underwent surgery. The mean age of the included patients was 54.7 ± 8.6 years for the VD group and 56.3 ± 7.1 years for the PL group ($p>0.05$). Mean baseline 25(OH)D values indicated hypovitaminosis D in the VD and PL groups, 19.6 ± 5.8 ng/mL and 21.0 ± 7.9 ng/mL, respectively ($p=0.331$). And at the end of the intervention, an increase was

demonstrated in the supplemented group, with a significant difference between the VD and PL groups (28.0 ± 8.7 ng/mL vs 20.2 ± 6.1 ng/mL, respectively) ($p=0.032$). Women supplemented with VD had a higher percentage of PCR when compared to women in the PL group (55.3% vs 32.4%, $p=0.046$). Comparing the women who had PCR in the VD group ($n=21$) and in the PL group ($n=12$), no significant differences were observed in the percentage distribution between the groups in most clinical, anatomopathological, and immunohistochemical variables and CT treatments ($p>0.05$). A lower occurrence of high histological grade tumors was observed in the VD group when compared to the PL group (52.4% vs 75.0%, respectively, $p=0.040$). In the VD group, a higher percentage of women with sufficient VD values [$25(\text{OH})\text{D} \geq 30\text{ng/mL}$] was found when compared to women in the PL group (61.9% vs 25.0%, respectively, $p=0.005$). Considering PCR as an outcome, when a logistic regression model was performed, adjusted for variables that interfere with PCR (anatomopathological, immunohistochemical, and CT treatments), women with values of $25(\text{OH})\text{D} \geq 20\text{ng/mL}$ were more likely to reach PCR than those with women with VD deficiency (OR 0.10, 95% CI 0.02-0.61, $p=0.013$).

Conclusions: In the present study, women with breast cancer undergoing neoadjuvant CT and supplementation with 2000UI of VD were more likely to reach PCR rate when compared to women in the placebo group.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama e Resposta Patológica Completa

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (Smith et al, 2019). De acordo com as últimas estatísticas mundiais do *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), divulgadas em 2020, foram estimados 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama, o que representou 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres. Foi a quinta causa de mortalidade por câncer em mulheres, sendo responsável por uma em cada seis mortes por câncer e 685 mil óbitos pela doença, ocupando o primeiro lugar em incidência em 159 países e o primeiro em mortalidade em 110 países (Smith et al, 2019; Sung et al, 2021). Para 2040, a OMS (Organização Mundial de Saúde) prevê quase três milhões de novos casos, alcançando a estimativa de um milhão de óbitos (Smith et al, 2019). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 73.610 casos novos de câncer de mama para cada ano do triênio 2023-2025. Esse valor corresponde a um risco estimado aproximado de 70 casos novos a cada 100 mil mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama ocupa a primeira posição em todas as regiões brasileiras, correspondendo a 30,1% dos casos de câncer em mulheres (INCA, 2023). 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 (INCA, 2023).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, a taxa geral de mortalidade por câncer de mama tem diminuído desde 1989, quando a taxa de

mortalidade era de 33.2/100.000 e em 2015 de 20.3/100.000, demonstrando redução significativa de 39% (ACS, 2020). O declínio na mortalidade por câncer de mama é atribuído tanto a melhorias no tratamento quanto à detecção precoce. 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 (Tabar et al, 2011; Smith et al, 2019). A mamografia demonstrou ser capaz de promover redução na mortalidade. Importante estudo populacional sueco, avaliando 133 mil mulheres com idade entre 40 e 74 anos, com ou sem rastreamento mamográfico preconizado, observou que após 29 anos de acompanhamento houve redução de 30% no risco de morte por câncer de mama no grupo com rastreamento (Tabar et al, 2011). Os programas de rastreio são amplamente discutidos na literatura principalmente quanto à idade e periodicidade, apesar da mamografia anual a partir dos 40 anos demonstrar ser a estratégia mais eficaz (Moss et al, 2015; Smith et al, 2019; Sung et al, 2021).

Com o diagnóstico precoce do câncer de mama possibilitado pelo programa de rastreamento, são indicados tratamentos que permitem o aumento significativo da sobrevida das pacientes (Pan et al, 2017). Dentre as modalidades de tratamento do câncer de mama, a quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, é realizada com o objetivo de melhorar as condições de ressecção tumoral e os resultados prognósticos, diminuindo o risco de recorrência (Korde et al, 2021). O tratamento neoadjuvante, historicamente, era reservado para reduzir o tamanho e a extensão de tumores localmente avançados. Atualmente, de forma mais ampla, além de aumentar a probabilidade de controle do tumor e o potencial de cura, os ensaios neoadjuvantes permitem uma avaliação rápida da eficácia do medicamento e podem acelerar o desenvolvimento e a aprovação de tratamentos (Cortazar et al, 2014; Korde et al, 2021). Esta abordagem terapêutica permite uma avaliação *in vivo* da sensibilidade tumoral a quimioterapia empregando os dados de

resposta patológica completa. O tratamento sistêmico consiste em regimes quimioterápicos, podendo variar de acordo com a indicação personalizada realizada pelo oncologista, sendo possível incluir: doxorrubicina e ciclofosfamida (com ou sem dose-densa), taxanos (com ou sem dose-densa), terapia anti-HER (p.ex: trastuzumabe) e carboplatina (NCCN, 2023).

A partir de importante grupo de trabalho internacional conhecido como *Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer Ensaios* (CTNeoBC) com investigadores que realizaram ensaios com tratamentos neoadjuvantes com dados de longo prazo disponíveis, foi realizada grande análise para avaliar a associação entre resposta patológica completa (RPC), sobrevida livre de doença e sobrevida global (Cortazar et al, 2014). A partir de dados de 12 estudos internacionais identificados e 11.955 pacientes incluídas, foram comparadas as três definições de RPC mais comumente usadas para estabelecer sua associação com o resultado em longo prazo: ypT0 ypN0 (ausência de câncer invasivo e carcinoma *in situ* na mama e em linfonodos axilares), ypT0/is ypN0 (ausência de câncer invasivo na mama e linfonodos axilares, independentemente de carcinoma ductal *in situ*) e ypT0/is (ausência de câncer invasivo na mama, independentemente de carcinoma ductal *in situ* ou envolvimento nodal). A erradicação do tumor da mama e dos gânglios linfáticos (ypT0 ypN0 ou ypT0/is ypN0) foi associada positivamente à melhora da sobrevida livre de doença e da sobrevida global quando comparada a erradicação do tumor apenas da mama (ypT0/is). A associação entre a RPC e os resultados em longo prazo foi mais forte em pacientes com câncer de mama triplo negativo e naqueles com tumores HER2-positivos e receptores hormonais negativos que receberam trastuzumabe. A presença ou ausência de carcinoma ductal *in situ* não afetou o resultado em longo prazo (Cortazar et al, 2014).

1.2. 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). A maior fonte de VD decorre da ativação na pele (derme e epiderme) a partir da exposição aos raios UVB, em que o composto 7-deidrocolesterol que se transforma em vitamina D₃, sendo armazenada e liberada pelas células de gordura (Rosen, 2011). Essa forma, cuja ativação não é metabólica, necessita das funções hepáticas e renais preservadas. A vitamina D₃ é transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma hidroxilação no carbono 25, 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, 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 (Heaney et al, 2011). O calcitriol exerce suas ações biológicas principalmente através do receptor da vitamina D (VDR), um receptor nuclear, embora ações não genômicas também tenham sido descritas (Holick et al 2011; Saponaro F., 2020). VDRs e 1 α -hidroxilase são expressos em muitos tecidos, como células imunes (macrófagos, monócitos), cardiomiócitos, células musculares lisas vasculares e células β no pâncreas e tecidos do trato reprodutivo (Holick et al 2011; Anagnostis P., 2013).

A forma ativa pode ser considerada um hormônio, pois é sintetizado em humanos, e submetido à regulação autócrina e interage com receptor nuclear (Rosen, 2011). 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 (Dawson-Hughes et al, 2005; Holick, 2010). 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) (Holick et al, 2011). Número crescente de estudos sugere que são necessários

valores acima de 30ng/mL para garantir melhor disponibilidade de VD (Dawson-Hughes et al, 2010; Hanley et al, 2010; Holick, 2010). 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 (Holick et al, 2011). A deficiência da VD pode ser confirmada pela aferição dos níveis séricos de 25(OH)D.

Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em todo mundo (Hilger et al, 2014). 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 (Lips et al, 2006). Valladares et al, analisando 21.236 mulheres, considerando limite de 30 ng/mL (75 nmol/L), relataram taxas de prevalência para hipovitaminose D de 73,6%, 78,6%, 86,1%, 81,5% e 90,4% na Europa, América do Norte, África, Oriente Médio e Ásia, respectivamente (Valladares et al, 2019).

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 (Unger et al, 2010; Maeda et al, 2013). Recente estudo de corte transversal, realizado no Ambulatório de Climatério e Menopausa de FMB, com 466 mulheres na pós-menopausa, idade entre 45-75 anos, detectou valores suficientes de vitamina D em 148 mulheres (31,8%), insuficientes em 151 (32,62%) e deficientes em 164 (35,4%) (Schmitt et al, 2018). 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 (Holick, 2004).

Sabendo-se que as fontes dietéticas de vitamina D são inadequadas, é interessante que mulheres na pós-menopausa recebam suplementação para garantir a saúde óssea (Holick, 2010). Em 2010, a *International Osteoporosis Foundation* 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 (Dawson-Hughes et al, 2010). 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 (Rosen et al, 2012). 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 (Mason, 2011). 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. Quando os valores séricos de 25(OH)D estão muito abaixo do desejado (abaixo de 20 ng/mL), o esquema de ataque é necessário para repor os estoques corporais. O esquema mais utilizado atualmente é de 50.000UI/semana (ou 7.000 UI/dia) de VD por 6 a 8 semanas. Após esse período, a dose de manutenção deve ser instituída e varia de acordo com a faixa etária e com as condições

concomitantes. Para adultos, doses de manutenção variam entre 400 e 2.000 UI, a depender da exposição solar e da coloração da pele. Para idosos, as doses recomendadas variam de 1.000 a 2.000 UI/dia ou 7.000 a 14.000 UI/semana (Holick et al, 2011; Maeda et al, 2014). 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 (Bischoff-Ferrari et al, 2006).

1.3. Câncer de mama e Vitamina D

A vitamina D (VD) é um derivado do colesterol que atua via metabólito 1,25(OH)₂D₃ e pelo receptor de alta afinidade, atuando como regulador direto do epigenoma e transcrição de grande variedade de tecidos humanos e tipos de células, incluindo células tumorais malignas. O efeito proeminente da VD na proliferação, diferenciação e apoptose das células imunes também tem consequências nas células cancerígenas. As células tumorais malignas são controladas diretamente em seu crescimento através dos mesmos genes e vias das células imunes ou indiretamente por células imunes moduladas em seu microambiente (Carlberg et al, 2022). O efeito da VD na glândula mamária é mediado pelas ações do receptor de vitamina D (VDR) (Hossain et al, 2019). O VDR foi identificado pela primeira vez em linhagem de células do câncer de mama em 1979 (Eisman et al, 1979). Sabe-se hoje que a VD possui múltiplas ações antiproliferativas, pró-apoptóticas e pró-diferenciadoras em diferentes células malignas, mediadas por VDR (Hossain et al, 2019).

A relação entre a hipovitaminose D e o câncer de mama tem sido cada vez mais estudados justamente pelos efeitos anticancerígenos em microambientes tumorais. De fato, a VD parece desempenhar papel fundamental na via do ciclo celular, especialmente no câncer de mama, intervindo no ciclo celular por meio de quinases, como ciclinas, quinases dependentes de ciclina e moduladores fisiológicos de CDK (Verliden et al, 1998). Além disso, o VD tem um efeito antiproliferativo e um estresse antioxidativo, atividades

antinvasivas e antiangiogênicas. (Al-Azhiri et al, 2017). A VD também pode ter um efeito sinérgico na atividade antitumoral de alguns agentes antineoplásicos, como antraciclinas e taxanos (Hershberger et al, 2001).

A relevante função desempenhada pela VD sobre a massa óssea está bem definida, contudo efeitos extra ósseos da VD sobre o câncer de mama estão sob investigação atual. Vários estudos têm relatado elevada frequência de hipovitaminose D em pacientes com câncer de mama (Neuhouse et al, 2008; Crew et al, 2009; Napoli et al, 2010; Vashi et al, 2010; O'Brien et al, 2017; Machado et al, 2018; Voutsadakis, 2021). Estudo identificou 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) (Crew et al, 2009). Em estudo retrospectivo com avaliação de 500 mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama, 69% eram deficientes para VD (Vashi et al, 2010). Entretanto, alguns estudos que encontraram associação entre valores reduzidos de 25(OH)D com a maior incidência do câncer de mama 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 (Chlebowski, 2011).

Estudo de coorte americana com mais de 50.000 mulheres com idades entre 35 e 74 anos demonstrou associação entre níveis séricos mais baixos de 25(OH)D com maior incidência de câncer de mama na pós-menopausa durante um acompanhamento de cinco anos (O'Brien et al, 2017). Pesquisa realizada no Centro de Mastologia da FMB, avaliando 209 mulheres com câncer de mama comparado a 418 mulheres (controle), com idade entre 45-75 anos, observou que as pacientes com câncer de mama apresentaram maior ocorrência de valores de 25(OH)D insuficientes (20 a 29 ng/mL) e deficientes (<20 ng/mL)

quando comparadas as pacientes do grupo controle (55.6% vs 49.3%, $p=0.039$ e 26.2% vs 20.3%, respectivamente). As dosagens de 25(OH)D foram realizadas no momento do diagnóstico do câncer de mama (Machado et al 2018). Metanálise, com um total de 25 estudos, encontrou nível médio de 25(OH)D em pacientes com câncer de mama de 26,8 ng/mL e de 31,4 ng/mL em mulheres sem câncer de mama. Entre pacientes com câncer de mama, 45,3% apresentavam valores abaixo de 20 ng/mL, enquanto esse percentual foi de 33,7% nos controles. Da mesma forma, 67,4% das pacientes com câncer de mama tinham valores basais abaixo de 30 ng/mL, enquanto esse percentual foi de 33,1% em controles. Alta prevalência de hipovitaminose D é observada em pacientes com câncer de mama recém-diagnosticado e pode estar fisiopatologicamente ligada ao desenvolvimento ou progressão do câncer de mama (Voutsadakis et al, 2021).

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 associação (McCullough et al, 2009; Almquist et al, 2010; Eliassen et al, 2011; Amir et al, 2012; Scarmo et al, 2013), enquanto outros encontraram associação inversa significativa (Bertone-Johnson et al, 2005; Rejnmark et al, 2009; Engel et al, 2010). Em estudo caso-controle com duas coortes prospectivas, *the New York University Women's Health Study and the Northern Sweden Mammary Screening Cohort*, que envolveram 14.274 mulheres saudáveis (34 a 65 anos idade) de uma clínica de mamografia da cidade de Nova York e 28.800 participantes de um programa de rastreamento do câncer de mama na Suécia. Foram incluídos 1585 casos novos de câncer de mama e 2940 controles. Não houve associação entre os valores circulantes de 25(OH)D e risco global do câncer de mama (Scarmo et al, 2013). 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 (Bertone-Johnson et al, 2005), enquanto o estudo de

coorte francês E3N demonstrou efeito mais forte em mulheres abaixo dos 53 anos de idade (Engel et al, 2010). 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 (Engel et al, 2010).

Estudo, avaliando a ingestão de VD e cálcio e o risco de câncer de mama em mulheres japonesas na pré e pós-menopausa, incluiu 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 (Kawase et al, 2010). 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 (Chlebowski et al, 2007). 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 tem efeito quimiopreventivo contra o câncer de mama (Chen et al, 2010).

A concentração de VD poderia ser considerada um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama (Kim et al, 2011). Um estudo observou que mulheres com valores deficientes de VD apresentaram maior risco de recorrência e morte quando comparadas as mulheres com valores adequados (Goodwin et al, 2009). Alguns estudos não observaram associação entre a VD com a presença de receptor estrogênio positivo ou negativo no câncer de mama (McCullough et al, 2009; Agborsangaya et al, 2010). Entretanto, em estudo

que investigou o efeito da ingestão de VD e cálcio sobre status do receptor tumoral em 713 casos de câncer de mama, demonstrou que tumor receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) positivos e receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) negativo associou-se com a ingestão de VD entre mulheres na pré-menopausa (Kawase et al, 2010). Estudo analisando a associação entre os valores séricos de VD e o prognóstico do câncer de mama, de acordo com subtipos de câncer pela imunohistoquímica em 310 mulheres, observou que em 54,8% os valores de VD foram deficientes (<30ng/mL). A concentração de 25(OH)D foi inversamente associada ao prognóstico de pacientes com câncer RE positivo e HER-2 negativo, mas não com os subtipos HER-2 positivo ou triplo negativo (Kim et al, 2011).

Estudo realizado no Centro de Avaliação em Mastologia da FMB analisou a associação entre a deficiência de VD e o perfil imuno-histoquímico do câncer de mama em 192 mulheres na pós-menopausa. 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%). 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 tumores RE negativo (OR 4.18, CI 95% 1.17-15.87) e Ki-67 positivo (OR 2.78, CI 95% 1.34-66.65), e com comprometimento linfonodal axilar (OR 2.26, CI 95% 1.10-5-16). Concluindo que mulheres na pós-menopausa com câncer de mama com deficiência de VD apresentam maior risco para tumores com perfil imuno-histoquímico de pior prognóstico (Almeida-Filho et al, 2017). Em 2022, os mesmos autores, estudaram a associação entre os valores séricos de VD no momento do diagnóstico e a sobrevida em mulheres na pós-menopausa tratadas do câncer de mama. Foi observado que a deficiência de VD no momento do diagnóstico associou-se a menor sobrevida global, sobrevida livre

de doença e sobrevida específica do câncer em comparação às pacientes com valores suficientes de VD, independentemente dos fatores prognósticos do câncer de mama (idade, estágio e tamanho do tumor, status linfonodal, receptores hormonais e subtipos moleculares do câncer de mama) (Almeida-Filho et al, 2022).

Meta-análise realizada a partir de cinco estudos que avaliaram a relação entre a VD e a mortalidade pelo de câncer de mama, demonstrou que valores plasmáticos elevados de 25(OH)D estiveram associados com menores taxas de mortalidade após o diagnóstico. 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 (Mohr et al, 2014). Contudo, outras revisões concluíram que as evidências atuais são insuficientes para recomendar a suplementação de VD na prevenção do câncer de mama, e que mais pesquisas clínicas são necessárias (IARC, 2008; IOM, 2010; Chung et al, 2011). 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 (Ross et al, 2011).

Em estudo de revisão, que incluiu um total de 30 estudos prospectivos com 6092 pacientes com câncer de mama, avaliou a associação entre os níveis séricos de VD e o risco de câncer de mama ou mortalidade. Os resultados sugerem que valores circulantes mais elevados de 25(OH)D foram fracamente associados com menor risco de câncer de mama, mas fortemente associados com melhor sobrevida entre pacientes com câncer de mama (Kim et al, 2014). O potencial efeito benéfico no prognóstico do câncer de mama com a VD foi confirmado em metanálise que demonstrou que níveis circulantes de 25(OH)D elevados, medidos no diagnóstico, associaram-se com redução de 25% na mortalidade por câncer de mama (HR 0,75; IC 95% 0,56 a 0,95) (Vaughan-Shaw et al, 2017).

1.4. Câncer de Mama e Suplementação da Vitamina D

Estudo pré-clínico demonstrou a presença da enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) em células epiteliais mamárias normais e malignas. Esta enzima é responsável pela conversão do pró-hormônio circulante 25(OH)D3 na forma ativa 1,25(OH)2D (Kemmis et al, 2006). Esta observação indicaria a possibilidade de que a suplementação de VD possa ser usada no tratamento do câncer de mama. Pois, aumentar os valores sanguíneos de 25(OH)D através da suplementação de VD fornece níveis aumentados do substrato em tecidos alvo como a mama, para a produção local de calcitriol, que poderia então exercer ações autócrinas/parácrinas para inibir o crescimento do câncer de mama (Krishnan e tal, 2012). A VD altera os genes implicados no crescimento celular, afetando a proliferação, a apoptose, a diferenciação, a angiogênese, a invasão e a metástase (Feldman et al, 2014), exercendo efeitos anticancerígenos através de vários mecanismos: efeitos antiproliferativos, indução de apoptose, inibição de invasão e metástase, e inibição da angiogênese (Pandolfi et al, 2017). Em 2013, Poole et al. avaliaram o uso de suplementos pós-diagnóstico e o risco de morte ou recorrência no estudo *After Breast Cancer Pooling*, em quatro coortes com 12.019 mulheres tratadas de câncer de mama dos Estados Unidos e da China. O uso de suplementos (vitaminas A, B, C, D, E e multivitaminas) pós-tratamento foi avaliado de um a cinco anos após o diagnóstico. O uso de suplementos antioxidantes (multivitaminas, vitamina C ou E) não foi associado à recorrência, mas foi associado a um risco 16% menor de morte (IC 95%: 0,72–0,99). A suplementação de vitamina D, independentemente da dose ou dos níveis sanguíneos basais de 25 (OH)D, associou-se à redução do risco de recorrência entre os tumores RE positivos, mas não os tumores RE negativos (Poole et al, 2013). Huss et al. estudaram a expressão de VDR em 718 tumores de mama invasivos e a variação entre a expressão de VDR e os fatores prognósticos estabelecidos para o câncer de mama, bem como as associações entre a expressão de VDR

e a mortalidade por câncer de mama. Em comparação com o tecido mamário normal, as lesões de câncer de mama expressaram mais VDR. Nesse estudo a alta expressão de VDR em tumores de mama invasivos está associada a fatores prognósticos favoráveis e a baixo risco de morte por câncer de mama. Portanto, alta expressão de VDR é um fator prognóstico positivo (Huss et al, 2019).

Crew et al. avaliaram a prevalência de deficiência de VD em mulheres na pré-menopausa no início da quimioterapia adjuvante para câncer de mama. Foram incluídas 103 mulheres norte-americanas na pré-menopausa (mediana 43 anos) com estágios I a III de câncer de mama que receberam quimioterapia adjuvante e participaram de um estudo de intervenção de 1 ano com ácido zoledrônico associado a vitamina D3 (colecalfiferol) 400 UI e carbonato de cálcio 1.000 mg por dia. No início do estudo, 74% das mulheres eram deficientes em VD (mediana 17 ng/mL). Após um ano de suplementação apenas 15% das mulheres atingiram níveis séricos suficientes de 25(OH)D. Os autores concluem que a deficiência de VD é altamente prevalente em mulheres com câncer de mama. A dose de VD suplementada foi baixa para aumentar a 25(OH)D sérica acima de 30 ng/mL. A dosagem ideal para melhorar a sobrevivência ainda não foi determinada (Crew et al, 2009). Zeichner et al., em estudo retrospectivo, avaliaram todas as pacientes que receberam quimioterapia com trastuzumabe entre 2006 e 2012 na Universidade de Miami, EUA. Foram identificados dois grupos de pacientes para comparação, aquelas que receberam suplementação de VD (60% dose <10.000 unidades/semana) durante a quimioterapia neoadjuvante (n = 134, em média 54 anos) e aquelas que não receberam (n = 112, em média 49 anos). O uso de VD associou-se com maior intervalo livre de doença (HR 0.36; IC 95%, 0.15-0.88), enquanto maior tamanho tumoral associou-se com menor intervalo livre de doença (HR 3.52; IC 95% 1.06-11.66). A suplementação de VD em pacientes com câncer de mama HER2 não metastático está associada à melhora da sobrevida livre de doença. Os autores concluem

que esse estudo foi o primeiro a relatar melhora significativa na sobrevida livre de doença para pacientes que receberam suplementação de VD concomitantemente com quimioterapia com trastuzumabe para o câncer de mama HER2 não metastático (Zeichner et al., 2015).

A VD altera os genes implicados no crescimento celular, através da regulação positiva da E-caderina, estimulando assim a diferenciação celular e a apoptose (Augustin et al, 2017). A relação dose-resposta dos níveis séricos de 25(OH)D para benefício sobre o câncer de mama parece inversa e linear até 60 ng/ml (Augustin et al, 2017). Em análise de resultados de estudos populacionais, Garland et al. demonstraram que a ingestão de 2.000 UI/dia de VD3 levaria a redução de 25% na incidência de câncer de mama na América do Norte (Garland et al, 2009). Para ingestão diária, dose de 2.000 UI/dia de VD é o limite superior proposto pela *National Academy of Sciences* (NAS, 1997) e para o *Institute of Medicine* (Ross et al, 2011) é de 4.000UI/dia. Aproximadamente 220.149 novos casos de câncer de mama seriam evitados anualmente no mundo elevando as concentrações séricas de 25(OH)D para aproximadamente 40 a 60 ng/mL, que é, em geral, associada à ingestão oral de 2.000 UI de vitamina D3 por dia (Garland et al, 2009). Em 2014 foi realizada uma meta-análise com ensaios clínicos randomizados controlados com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de VD sobre a incidência total de câncer em geral e a mortalidade. Foram incluídos na análise quatro ensaios clínicos com 4333 casos combinados. A suplementação de VD com 2 a 7 anos de duração apresentou pequeno efeito na incidência total de câncer (dose de 400–1100 UI por dia), mas com redução significativa na mortalidade total por câncer (dose de 400-833 UI por dia) (Keum & Giovannuci, 2014).

Madden et al. identificaram 5417 mulheres entre 50 e 80 anos com histórico de câncer de mama invasivo no banco de dados do *National Cancer Registry Ireland*. A partir de dados de farmácias sobre a prescrição nacional foi encontrado que 2581 mulheres (49%)

iniciaram o uso de VD após o diagnóstico de câncer de mama e a grande maioria (98%) destas, em associação ao cálcio, e 2% suplementação isolada de VD. Foi observada redução de 20% na mortalidade específica por câncer de mama entre as usuárias de VD comparada a não usuárias (HR 0.80; IC95% 0.64–0.99) e a redução foi maior de 49% (HR 0.51; IC95% 0.34-0.74), se a suplementação VD foi iniciada logo após o diagnóstico do câncer de mama (até seis meses). Esses resultados indicam que o uso de VD pós-diagnóstico associou-se à redução na mortalidade específica por câncer de mama, sendo influenciado também pelo tempo de início da suplementação. A VD, portanto, tem potencial como agente não tóxico e barato para melhorar a sobrevivência em pacientes com câncer de mama, apoiando a necessidade de mais estudos clínicos randomizados antes que a suplementação de VD possa ser considerada terapia adjuvante de rotina (Madden et al, 2018).

1.5. Vitamina D e a Resposta Patológica Completa

A associação entre o valor sérico de 25(OH)D com a taxa de resposta patológica completa (RPC) do tumor, importante fator prognóstico no câncer de mama, após a quimioterapia neoadjuvante foi avaliada em alguns estudos observacionais. Enquanto alguns não observaram associação entre valores de VD e a taxa da RPC após quimioterapia neoadjuvante (Clark et al, 2014; Charehbili et al, 2016; Kim et al, 2018; Tokunaga et al, 2022), outros estudos demonstraram que em mulheres com câncer de mama recebendo quimioterapia neoadjuvante, o valor sérico de 25(OH)D esteve positivamente correlacionado com a porcentagem de RPC, especialmente em tumores HER2 e no triplo-negativo (Chiba et al, 2018; Viala et al, 2018). Essa correlação positiva poderia ser parcialmente explicada pelo potencial efeito anticancerígeno da VD (Chartron et al, 2021). Além disso, a VD parece influenciar a resposta aos agentes quimioterápicos. Resultados *in vitro* mostraram que a VD potencializa as atividades antitumorais de antraciclinas e

taxanos, dois compostos citotóxicos amplamente utilizados em quimioterapia neoadjuvante (Chaudhry et al, 2001; Hershberger et al, 2001).

Charehbili et al., em 2016, investigaram o valor preditivo dos níveis de VD sobre a RPC após quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama participantes do estudo NEOZOTAC fase III. Além disso, foi estudado o efeito da quimioterapia nos níveis de VD. Foram randomizadas 250 pacientes com câncer de mama inicial para quimioterapia neoadjuvante em grupo com ou sem ácido zoledrônico. As pacientes alocadas para o braço do estudo com ácido zoledrônico também receberam uma dose fixa de 400 UI de VD e 500 mg de cálcio por dia. A VD sérica foi medida no início e antes do último ciclo de quimioterapia. Os valores medianos de VD basal e pós-quimioterapia foram respectivamente 58,0 nmol/L (23,5ng/mL) e 51,0 nmol/L (20,5 ng/mL), com diminuição na média dos valores de VD ao final da quimioterapia. Entre as pacientes que receberam ácido zoledrônico, VD 400 UI e cálcio, não foi observada diminuição significativa nos níveis de VD. Por outro lado, as pacientes que realizaram apenas a quimioterapia, os níveis séricos de VD diminuíram em média para 16 nmol/L. Não houve associação significativa entre os níveis basais ou os finais de VD e a RPC. Os autores concluem que níveis séricos de VD durante a quimioterapia neoadjuvante devem ser monitorados e, em caso de diminuição, a correção pode ser benéfica para a saúde esquelética e possivelmente para o desfecho do câncer de mama (Charehbili et al., em 2016). Recente estudo realizado por Tokunaga et al. incluiu 250 pacientes com câncer de mama, estágio clínico I–III, submetidas a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia, com dosagens séricas de VD obtidas antes do tratamento sistêmico. O nível sérico de 25(OH)D não foi associado à RPC. Baixos níveis de VD foram significativamente associados a menor tempo para ocorrência de recidiva. Dessa forma, neste estudo, níveis baixos de VD foram significativamente associados a pior prognóstico

em mulheres japonesas com câncer de mama operável tratadas com quimioterapia neoadjuvante (Tokunaga et al, 2022).

Vários mecanismos diferentes podem ser responsáveis pelas reduções nos níveis de VD no câncer de mama, induzidas pela quimioterapia. Em nível molecular pode ser que as formas ativas de VD possam ser convertidas em metabólitos inativos pela regulação positiva da enzima CYP3A4 no fígado, um membro da superfamília de metabolizadores de drogas do citocromo P450, que pode ser regulada positivamente como um mecanismo de defesa contra a quimioterapia (Miyoshi et.al, 2002, Charehbili et. al, 2016). Outra possível explicação seria a orientação feita aos pacientes com câncer de mama para evitar a luz solar durante o tratamento, para a prevenção da foto sensibilidade induzida pela quimioterapia (Akay et.al, 2010). Além desses fatos, devemos considerar que pacientes com câncer de mama costumam apresentar efeitos colaterais gastrointestinais, como mucosite, colite, náusea e diarreia, que podem influenciar a ingestão e absorção nutricional de VD (Ho MY et. al, 2014; Naito Y, 2020).

Por outro lado, Chiba et al., avaliando 144 mulheres diagnosticadas com câncer de mama em estágio clínico I a III, com níveis de VD medidos no diagnóstico ou durante a quimioterapia neoadjuvante e submetidas a cirurgia, concluíram que valores reduzidos de VD foram associados à não obtenção da RPC. Nos resultados da análise multivariada, após o ajuste para os efeitos de coorte, estágio clínico e status do receptor, a deficiência de VD aumentou as chances de não atingir RPC em 2,68 vezes (IC de 95%, 1,12-6,41, $p=0,03$) (Chiba et al., 2018). Viala et al., em estudo retrospectivo, avaliaram em 327 mulheres, o impacto do valor da VD na RPC e na sobrevida após quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama. As pacientes tiveram nível sérico de 25(OH)D medido antes ou durante a quimioterapia neoadjuvante. A deficiência de VD foi definida como < 20 ng/mL. A RPC foi obtida em 32,7% ($n = 107$) das pacientes incluídas e a deficiência de VD foi associada à

chance de não obtenção de RPC em 73,5%. Foi observada reposta patológica completa em 33,6% das mulheres com deficiência de VD (<20ng/mL) e em 66,4% naquelas com valores adequados de VD (\geq 20ng/mL), com diferença significativa entre os grupos. A deficiência de VD associou-se à incapacidade de atingir RPC em pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante (Viala et al., 2018).

Ozmen et al., em estudo não randomizado, investigou o efeito da suplementação VD na RPC em pacientes com câncer de mama recebendo quimioterapia neoadjuvante. Foram incluídos 117 pacientes, com valores séricos de VD avaliados antes e após a quimioterapia, sendo que 64 (55%) receberam suplementação oral de 50.000 UI de Vitamina D3 (colecalfiferol) uma vez por semana durante a quimioterapia neoadjuvante. A taxa de RPC em todos os pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante foi de 20,5%, e a adição de VD ao tratamento sistêmico aumentou significativamente a taxa de RPC (28% vs. 11%, $p = 0.025$) (Ozmen et al, 2021).

Dessa forma, com base em dados anteriores que mostraram que baixos níveis de VD estão associados a não RPC e em contrapartida outros estudos concluíram que não houve associação significativa entre os níveis de VD e a RPC, reforça a premissa do monitoramento os níveis de VD em pacientes com câncer de mama recebendo quimioterapia. Mais estudos são necessários para avaliar se os níveis de VD estão ou não correlacionados com a RPC em pacientes com câncer de mama em vigência de quimioterapia neoadjuvante.

1.6. Justificativa e Hipótese

A VD parece desempenhar papel no desenvolvimento do câncer de mama, atuando através da ligação ao receptor nuclear de VD (VDR), e alterando os genes implicados no crescimento celular, afetando a proliferação, a apoptose, a diferenciação, a angiogênese, a

invasão e a metástase. Exercendo assim, efeitos anticancerígenos e antiangiogênicos através de vários mecanismos: efeitos antiproliferativos, indução de apoptose, inibição de invasão e metástase, e inibição da angiogênese, dando peso à evidência científica que associa a deficiência de VD à incidência, prognóstico e mortalidade pelo câncer de mama. A deficiência de VD é frequente em pacientes com câncer de mama, portanto aumentar os valores séricos de 25(OH)D através da suplementação de VD forneceria níveis aumentados do substrato em tecidos alvo como a mama, para a produção local de calcitriol, que poderia então exercer ações autócrinas/parácrinas para inibir o crescimento do câncer de mama.

A associação entre o valor sérico de 25(OH)D com a taxa de RPC do tumor, importante fator prognóstico no câncer de mama, após a quimioterapia neoadjuvante foi avaliada em estudos observacionais. Enquanto alguns não observaram associação entre valores de VD e a taxa da RPC após a quimioterapia neoadjuvante, outros estudos demonstraram que em mulheres com câncer de mama recebendo quimioterapia neoadjuvante, o valor sérico de 25(OH)D esteve positivamente correlacionado com a porcentagem de RPC. E apenas em um estudo não randomizado, a suplementação de VD resultou em melhor RPC. Portanto, a suplementação de VD teria potencial como agente não tóxico e barato para melhorar a RPC em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante, apoiando assim a necessidade de mais estudos clínicos randomizados para que suplementação de VD possa ser considerada terapia adjuvante no câncer de mama. A hipótese desse estudo é que mulheres com câncer de mama submetidas à suplementação de VD durante a realização da quimioterapia neoadjuvante têm maior porcentagem de RPC quando comparadas a não usuárias de VD.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Principal

Avaliar a taxa de resposta patológica completa com a suplementação de vitamina D em mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Analisar o efeito dos valores séricos de vitamina D sobre a resposta patológica completa em mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante suplementadas com vitamina D comparadas ao grupo placebo.

2.2.2. Estudar os fatores preditivos da resposta patológica completa em mulheres com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, para avaliar os efeitos da suplementação de VD. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Centro de Avaliação em Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP de outubro de 2019 a agosto de 2022. O cálculo do tamanho amostral dos estudos foi realizado pelo Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB. O cálculo amostral foi embasado no estudo de Viala et al (2018), que encontraram RPC em 33,6% das mulheres com deficiência de VD (<20ng/mL) e em 66.4% naquelas com valores adequado de VD (≥ 20 ng/mL). Considerando a diferença dos valores percentuais apresentados e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%), com poder de 80% e confiabilidade de 95%, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 36 mulheres com câncer de mama por grupo (intervenção x placebo). E considerando perda de seguimento ao redor de 10%, o tamanho amostral adotado foi de 40 mulheres por grupo.

Foram incluídas mulheres com idade ≥ 45 anos, diagnóstico recente histológico de câncer de mama, e elegíveis para quimioterapia neoadjuvante, baseado na classificação de Szymiczek et al. (2021) e no estadiamento anatômico TNM (AJCC 8th edition, 2017): 1- Luminal HER2 negativo (RE positivo e/ou RP positivo e HER2 negativo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIB (T2N1M0, T3N0M0); 2- Luminal HER2 positivo (RE positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIA (TON1M0, T1N1M0, T2N0M0); 3- HER2 puro (RE e RP negativos e HER2 positivo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIA (TON1M0, T1N1M0, T2N0M0); 4- Triplo-negativo (RE, RP e HER2 negativos) com estadiamento tumoral maior ou igual a IA (T1N0M0); ou 5- Indicação

personalizada realizada pelo oncologista. Em todos os grupos, consideramos a importância de salientar a indicação de quimioterapia neoadjuvante nos casos de favorecer uma possível cirurgia conservadora e/ou biópsia de linfonodo sentinela em mamas não operáveis e/ou axilas positivas.

Foram excluídas mulheres com doença renal crônica (creatinina >1.4 mg/dL), doenças hepáticas, síndrome de má absorção, obesidade grau III (IMC \geq 40kg/m²), usuárias de doses farmacológicas de VD (>100 UI/dia), etilistas ou drogaditas. Todas as voluntárias participantes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos e confidencialidade dos dados, sem quaisquer prejuízos para as mesmas. Foi solicitado 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, com a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP, número do parecer: 4.699.347, CAAE: 15747019.8.0000.5411 (Anexo II). Foi registrado e aprovado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC), com número RBR-10k4gqdg. Este ensaio clínico foi realizado de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) 2010 (Schulz et al, 2010) (Anexo III).

3.2. Dados Clínicos e Quimioterapia

Inicialmente, no dia da consulta foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade, paridade, tabagismo atual, amamentação, histórico pessoal de doenças crônicas (hipertensão arterial e diabetes) e histórico familiar de câncer de mama. 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= peso/altura²). 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* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: $\leq 24,9$ 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 (NCEP-ATP III, 2001).

A partir dos relatórios das consultas com a oncologia clínica foram obtidos dados referentes à quimioterapia neoadjuvante empregados nas pacientes. Foram realizados os seguintes esquemas de tratamentos quimioterápicos: 1) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T); 2) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T); 3) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T) + trastuzumabe (H); 4) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T) + trastuzumabe (H); 5) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T) + carboplatina (C); 6) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T) + carboplatina (C). A escolha personalizada do esquema quimioterápico, bem como do número de sessões, foi realizada pelo oncologista clínico.

3.3. Protocolo de suplementação

Todas as participantes receberam uma numeração (1-80) de acordo com a ordem de inclusão no estudo. Um processo de randomização computadorizado centralizado foi conduzido empregando software específico para o protocolo do estudo (*SAS for Windows, v. 9.2 using Procedure Plan*). As pacientes foram randomizadas, em sequência de

numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de vitamina D₃ (n=40) e PL, usuárias de placebo (n=40) (**Figura 1**). O investigador principal (Omodei M) e as pacientes não tinham conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações rotuladas nos frascos. Assim, 40 pacientes receberam 2000UI de VD₃ (colecalfiferol), 2 comprimidos via oral ao dia (cada comprimido de 1000UI), durante período da quimioterapia neoadjuvante (6 meses). As outras 40 pacientes receberam 2 comprimidos de placebo, via oral ao dia. Os invólucros foram idênticos, embalados e numerados para não identificação do grupo pelas participantes do estudo. Para o controle da suplementação, as pacientes foram orientadas a trazer os frascos a cada retorno para avaliar a medicação usada e determinar a aderência. O tempo de seguimento foi de seis meses com avaliações em dois momentos, inicial e final.

3.4. Análise de Vitamina D

A avaliação sérica de 25(OH)D foi mensurada em dois momentos, imediatamente após o diagnóstico do câncer de mama, antes do tratamento proposto, aproximadamente 20 dias pós-diagnóstico e após a realização da quimioterapia neoadjuvante, aos seis meses (para avaliar a biodisponibilidade e aderência ao tratamento). Das pacientes randomizadas foram obtidos 10 ml de sangue, no momento basal e aos seis meses, diretamente em tubo seco com gel separador de soro, que foram centrifugadas por 10 min (3.000 rpm). O soro obtido foi separado em amostras congeladas a -80°C até a leitura das dosagens de 25(OH)D. Para a dosagem sérica de 25(OH)D foi empregado um imunoensaio, *25(OH) Vitamin D ELISA kit* (ab213966) (Abcam®, Cambridge, UK), pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), obedecendo às recomendações do fabricante. A sensibilidade analítica é de 1.98 ng/mL e o coeficiente de variação intra ensaio é < 3% e inter ensaio é < 11%, segundo descrição do Kit. Foram considerados suficientes valores ≥

30ng/mL, insuficiência de 21 a 29ng/mL e deficiência < 20ng/mL (Holick et al., 2011). Todas as dosagens foram realizadas em único momento para minimizar variações interensaios, pelo Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia.

3.5. Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir dos relatórios dos prontuários das pacientes com câncer de mama foram obtidos: diagnóstico histopatológico, grau, estágio do tumor, e status de receptor hormonal. O envolvimento linfonodal foi avaliado após a cirurgia ou pela avaliação do linfonodo sentinela. Foram graduados histologicamente em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), de acordo com o método proposto por Elston & Ellis (1993) que utiliza como critérios os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico. O estadiamento patológico do tumor foi definido de acordo com a 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2017), sistema TNM (tamanho do tumor, *status* linfonodal, metástase), sendo: estágio I (T1N0M0), estágio IIA (T0N1M0, T1N1M0 e T2N0M0), estágio IIB (T2N1M0 e T3N0M0), estágio IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 e T3N2M0), estágio IIIB (T4N0M0, T4N1M0 e T4N2M0), estágio IIIC (qualquer TN3M0) e estágio IV (qualquer T qualquer N M1).

O perfil do receptor hormonal e a atividade proliferativa epitelial foram avaliados por métodos padrão, utilizando imunohistoquímica para receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (PR), e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). A imunohistoquímica com anticorpos para RE, RP e HER2 foi realizada de acordo com os métodos complexos de estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation®, Glostrup, Dinamarca). Após avaliação imunohistoquímica, os tumores foram agrupados em nenhuma, baixa, média ou alta expressão de RE e RP, utilizando intervalos de 0-1%, 2-10%, 11-50% e 51-100% de núcleos positivos. Para os RE e RP foram considerados positivos

quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais (Hammond et al, 2010). Para análise do HER2 foi utilizado critérios do ASCO, 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 (Wolff et al, 2014). A amplificação do gene HER2 foi testada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) quando a imunohistoquímica resultou em escore 2+ (Dowsett et al, 2003). Os cânceres de mama foram categorizados em quatro subtipos com base em perfis de imunohistoquímica em: 1-Luminal HER2 negativo: RE positivo e/ou RP positivo, HER2 negativo; 2- Luminal HER2 positivo: RE positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo; 3- HER2 puro: RE e RP negativos e HER2 positivo; 4- Triplo-negativo: RE, RP e HER2 negativos (Szymiczek et al, 2021).

Como marcador de resposta a quimioterapia, foi empregada a taxa de RPC avaliada no anatomopatológico pós-quimioterapia. A RPC na mama neste estudo foi definida de acordo com o *College of American Pathologists* (CAP) como ausência de câncer invasivo residual: ypT0 ypN0 (ausência de câncer invasivo e carcinoma *in situ* na mama e linfonodos axilares); ypT0/is ypN0 (ausência de câncer invasivo na mama e linfonodos axilares, independentemente de carcinoma ductal *in situ*) (CAP, 2023). O anatomopatológico e o perfil imunohistoquímico, de acordo com o que foi descrito anteriormente, foram realizados pelo Serviço de Patologia da FMB-Unesp.

3.6. Análise Estatística

O método de análise estatística utilizado foi *per protocol*. A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis

qualitativas. Foram analisadas variáveis: 1- clínicas (idade, menarca, paridade, tempo de amamentação, tabagismo e IMC); 2- Dosagem sérica 25(OH)D; 3-dados anatomopatológicos e de imunohistoquímica do câncer de mama (tipo e grau histopatológico, tamanho do tumor, estágio do tumor, linfonodo axilar, RE, RP, HER2, Ki-67, subtipos moleculares); 4- tratamentos quimioterápicos; 5-resposta patológica completa (sim ou não).

Para comparação entre os grupos (VD e PL) em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas), distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas) e o teste do Qui-quadrado ou o Exato de Fisher (variáveis qualitativas). Na associação entre os grupos quanto as características anatomopatológicas, da imuno-histoquímica, tratamentos quimioterápicos, RPC e valores de 25(OH)D, todas variáveis categorizadas, foram utilizados o teste do Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher (para valor esperado menor ou igual a cinco). Na comparação do IMC entre os momentos (basale 6 meses) e entre os grupos, utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. E na comparação dos valores de 25(OH)D (variável assimétrica) entre os momentos (basale 6 meses) foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

A medida de desfecho primário foi a RPC. 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 se valores de VD ($\geq 20\text{ng/mL}$) estavam associados à chance de atingir a RPC, ajustado para as variáveis que poderiam influenciar a RPC (tamanho do tumor, grau histológico, estágio, RE, RP, HER2, subtipos moleculares e tratamentos quimioterápicos). 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)* for windows, versão 9.4, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu que deu o atendimento metodológico e conduziu os procedimentos estatísticos.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo Original

Efeito da suplementação de vitamina D sobre a resposta patológica completa em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante: ensaio clínico randomizado.

Effect of vitamin D supplementation on pathological complete response in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy: a randomized clinical trial.

Omodei MS, Carvalho-Pessoa E, Nahas EAP

Resumo

Objetivo: avaliar a taxa de resposta patológica completa (RPC) com a suplementação de vitamina D (VD) em mulheres com câncer de mama, submetidas à quimioterapia (QT) neoadjuvante.

Métodos: Foi conduzido ensaio clínico randomizado envolvendo 80 mulheres com idade ≥ 45 anos e diagnóstico histológico de câncer de mama, elegíveis para QT neoadjuvante. As pacientes foram randomizadas em dois grupos: VD, com suplementação diária de 2000UI de colecalciferol (n=40) e PL, usuárias de placebo (n=40), durante período da QT neoadjuvante (6 meses). A medida de desfecho primário foi a RPC. Os valores séricos de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] foram mensurados em dois momentos, após diagnóstico do câncer de mama e ao final da QT, por imunoensaio, 25(OH) *Vitamin D* ELISA kit (ab213966). Foram coletados os dados clínicos, imuno-histoquímicos e quimioterápicos. A análise estatística foi *per protocol*, empregando-se Teste t-Student, Teste do Qui-Quadrado, Distribuição Gama, ANOVA e regressão logística (OR, odds ratio).

Resultados: Das 80 mulheres randomizadas, 75 completaram a QT e realizaram cirurgia. A média de idade foi de 54.7 ± 8.6 anos para VD e de 56.3 ± 7.1 anos para PL ($p > 0.05$). Os valores médios iniciais de 25(OH)D indicavam hipovitaminose D em ambos os grupos (VD 19.6 ± 5.8 ng/mL e 21.0 ± 7.9 ng/mL, $p = 0.331$). Aos 6 meses de intervenção foi demonstrado aumento nos valores de 25(OH)D no grupo VD, com diferença significativa para o grupo PL ($28.0 \pm 8,7$ ng/mL vs 20.2 ± 6.1 ng/mL, respectivamente, $p = 0.032$). As mulheres suplementadas com VD apresentaram maior ocorrência de RPC quando comparada as mulheres do grupo PL (55.3% vs 32.4%, $p = 0.046$). Na comparação entre as mulheres com RPC no grupo VD (n=21) e no placebo (n=12) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na maioria das variáveis anatomopatológicas, imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos ($p > 0.05$). Foi observado no grupo VD menor ocorrência de

tumores de alto grau histológico quando comparado grupo PL (52.4% vs 75.0%, respectivamente, $p=0.040$). Em modelo de regressão logística, ajustado para variáveis que interferem na RPC (anatomopatológicas, imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos), mulheres com valores de 25(OH)D ≥ 20 ng/mL apresentaram maior chance de obter RPC em relação às mulheres com deficiência de VD (OR 0.10 IC 95% 0.02-0.61, $p=0.013$).

Conclusões: Mulheres com câncer de mama submetidas a QT neoadjuvante e a suplementação de 2000UI de VD apresentaram maior chance de obter taxa de RPC quando comparada às mulheres do grupo placebo.

Palavras-chave: Câncer de mama; Vitamina D; Resposta Patológica Completa; Quimioterapia Neoadjuvante; Ensaio clínico randomizado.

Abstract

Objective: to evaluate the pathological complete response (PCR) rate with vitamin D (VD) supplementation in women with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy (CT).

Methods: A randomized clinical trial was conducted involving 80 women aged ≥ 45 years with histological diagnosis of breast cancer, eligible for neoadjuvant CT. Women were randomized into two groups: VD, with daily supplementation of 2000UI of cholecalciferol ($n=40$) and PL, users of placebo ($n=40$), during the CT period (6 months). The primary outcome measure was PCR. Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] values were measured at two moments, after diagnosis of breast cancer and at the end of CT, using immunoassay 25(OH) Vitamin D ELISA kit (ab213966). Clinical, anatomopathological, immunohistochemical, and CT data were collected. Statistical analysis was per protocol,

using Student's t-test, Chi-square test, Gamma distribution, ANOVA and logistic regression (OR, odds ratio).

Results: Of the 80 women randomized, 75 patients completed CT and underwent surgery. The mean age was 54.7 ± 8.6 years for the VD group and 56.3 ± 7.1 years for the PL group ($p > 0.05$). Mean baseline 25(OH)D values indicated hypovitaminosis D in both groups (VD, 19.6 ± 5.8 ng/mL and PL, 21.0 ± 7.9 ng/mL, $p = 0.331$). At 6 months of intervention, an increase in 25(OH)D values was demonstrated in the VD group, with a significant difference for the PL group (28.0 ± 8.7 ng/mL vs 20.2 ± 6.1 ng/mL, respectively, $p = 0.032$) Women supplemented with VD had a higher percentage of PCR when compared to women in the PL group (55.3% vs 32.4%, $p = 0.046$). Comparing the women who had PCR in the VD group ($n = 21$) and in the PL group ($n = 12$), no significant differences were observed in the percentage distribution between the groups in most anatomopathological and immunohistochemical variables and CT treatments ($p > 0.05$). A lower occurrence of high histological grade tumors was observed in the VD group when compared to the PL group (52.4% vs 75.9%, respectively, $p = 0.040$). In a logistic regression model, adjusted for variables that interfere with PCR (anatomopathological, immunohistochemical and CT treatments), women with 25(OH)D values ≥ 20 ng/mL were more likely to achieve PCR than women with VD deficiency (OR 0.10 95% CI 0.02-0.61, $p = 0.013$).

Conclusions: Women with breast cancer undergoing neoadjuvant CT and supplementation with 2000UI of VD were more likely to achieve a PCR rate when compared to women in the placebo group.

Keywords: Breast Cancer; Vitamin D; Pathological complete response; neoadjuvant chemotherapy; Randomized clinical trial.

Introdução

A vitamina D (VD) é um derivado do colesterol que atua via metabólito ativo, a 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)₂D], como regulador direto do epigenoma e transcrição de grande variedade de tecidos humanos e tipos de células, incluindo células tumorais malignas¹. A VD parece desempenhar papel no desenvolvimento do câncer de mama através da ligação ao receptor nuclear de VD (VDR), que é expresso no tecido mamário^{2,3}. O tecido mamário normal e o tumoral expressam a enzima 1-alfa-hidroxilase que hidroxila a 25-hidroxitamina D [25(OH)D], metabólito inativo circulante da VD, em 1,25(OH)₂D ou o calcitriol, forma biologicamente ativa e que interage com o VDR, modulando a expressão de genes envolvidos em vários aspectos da tumorigênese⁴. A VD altera os genes implicados no crescimento celular, afetando a proliferação, a apoptose, a diferenciação, a angiogênese, a invasão e a metástase⁵. Assim, pode exercer efeitos anticancerígenos e antiangiogênicos através de vários mecanismos como antiproliferação, indução de apoptose, inibição de invasão/metástase, e inibição da angiogênese^{6,7}, reforçando a evidência científica que associa a deficiência de VD à incidência e mortalidade pelo câncer de mama^{3,8,9}.

A deficiência de VD é frequente em pacientes com câncer de mama^{10,11} e algumas evidências sugerem que valores séricos reduzidos de 25(OH)D, aumentam o risco de desenvolvimento e progressão da doença, sendo considerada um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama^{2,12}. Aumentar os valores séricos de 25(OH)D pela suplementação de VD forneceria níveis aumentados do substrato em tecidos alvo como a mama, para a produção local de calcitriol, que poderia então exercer ações autócrinas/parácrinas para inibir o crescimento do câncer de mama¹³. Análise de resultados de estudos populacionais norte-americanos demonstrou que a ingestão de 2.000 UI/dia de VD levaria a redução de 25% na incidência de câncer de mama¹⁴.

Entre as modalidades de tratamento do câncer de mama, a quimioterapia neoadjuvante é realizada com o objetivo de melhorar as condições de ressecção tumoral e os resultados prognósticos, diminuindo o risco de recorrência¹⁵. O tratamento neoadjuvante aumenta a probabilidade de controle do tumor e o potencial de cura, e permite rápida avaliação da eficácia do tratamento^{15,16}. Esta abordagem terapêutica permite uma avaliação *in vivo* da sensibilidade tumoral a quimioterapia empregando os dados de resposta patológica completa (RPC) pelo anatomopatológico¹⁶. A associação entre o valor sérico de 25(OH)D com a taxa RPC do tumor, importante fator prognóstico no câncer de mama, após a quimioterapia neoadjuvante foi avaliada em estudos observacionais. Alguns não observaram associação entre os valores de VD e a taxa da RPC após quimioterapia neoadjuvante¹⁷⁻²⁰. Por outro lado, outros estudos demonstraram que em mulheres com câncer de mama recebendo quimioterapia neoadjuvante, o valor sérico de 25(OH)D esteve positivamente correlacionado com a porcentagem de RPC, especialmente em tumores HER2 e no triplo-negativo^{21,22}. E apenas um estudo clínico não randomizado, a suplementação de VD resultou em melhora da RPC²¹.

A suplementação de VD poderia ter potencial como agente não tóxico e barato para melhorar a RPC em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante, apoiando assim a necessidade de mais estudos clínicos randomizados para que suplementação de VD possa ser considerada no tratamento do câncer de mama²⁴. Apesar do potencial efeito benéfico de valores adequados de VD no prognóstico do câncer de mama²⁵, dados sobre a associação entre os níveis de VD e a RPC à quimioterapia neoadjuvante são escassos em pacientes com câncer de mama. Poucos estudos observacionais avaliaram o efeito dos valores séricos de VD na RPC e com resultados variáveis¹⁷⁻²², com apenas um estudo prospectivo com suplementação de VD²³, o que justifica o presente estudo. Nosso objetivo foi avaliar a taxa de resposta patológica

completa (RPC) com a suplementação de vitamina D (VD) em mulheres com câncer de mama, submetida à quimioterapia (QT) neoadjuvante.

Métodos

Desenho do estudo e Seleção da Amostra

Neste ensaio clínico randomizado foram incluídas mulheres atendidas em Serviço de Mastologia, de outubro de 2019 a agosto de 2022, com idade \geq 45 anos, diagnóstico recente histológico de câncer de mama, e elegíveis para QT neoadjuvante: 1- Luminal HER2 negativo (RE positivo e/ou RP positivo e HER2 negativo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIB (T2N1M0, T3N0M0); 2- Luminal HER2 positivo (RE positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIA (TON1M0, T1N1M0, T2N0M0); 3- HER2 puro (RE e RP negativos e HER2 positivo) com estadiamento tumoral maior ou igual a IIA (TON1M0, T1N1M0, T2N0M0); 4- Triplo-negativo (RE, RP e HER2 negativos) com estadiamento tumoral maior ou igual a IA (T1N0M0); ou 5- Indicação personalizada realizada pelo oncologista^{26,27}.

Foram excluídas mulheres com doença renal crônica (creatinina >1.4 mg/dL), doenças hepáticas, síndrome de má absorção, obesidade grau III (IMC \geq 40kg/m²), usuárias de VD (>100 UI/dia), etilistas ou drogaditas. Foi solicitado, a todas participantes, a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP. Foi registrado e aprovado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (ReBEC), com número RBR-10k4gqdg. Este ensaio clínico foi realizado de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) 2010*²⁸.

Dados Clínicos e Quimioterapia

Foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade, paridade, tabagismo atual, amamentação, histórico pessoal de doenças crônicas (hipertensão arterial e diabetes) e histórico familiar de câncer de mama. 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 ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$). Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: $\leq 24,9$ 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 III²⁹.

A partir dos relatórios das consultas com a oncologia clínica foram obtidos dados referentes à QT neoadjuvante empregados nas pacientes. Foram realizados os seguintes esquemas de tratamentos quimioterápicos: 1) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T); 2) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T); 3) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T) + trastuzumabe (H); 4) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T) + trastuzumabe (H); 5) doxorrubicina associada a ciclofosfamida (AC) + taxanos (T) + carboplatina (C); 6) doxorrubicina associada a ciclofosfamida dose-densa (ACdd) + taxanos (T) + carboplatina (C).

Protocolo de suplementação

Todas as participantes receberam uma numeração (1-80) de acordo com a ordem de inclusão no estudo. Um processo de randomização computadorizado centralizado foi conduzido empregando software específico para o protocolo do estudo (*SAS for Windows, v. 9.2 using Procedure Plan*). As pacientes foram randomizadas, em sequência de numeração pré-estabelecida, em dois grupos: VD, com suplementação de VD (n=40) e PL,

usuárias de placebo (n=40) (**Figura 1**). O investigador principal (Omodei M) e as pacientes não tinham conhecimento prévio dos referidos grupos e das diferentes numerações rotuladas nos frascos. Assim, 40 pacientes receberam 2000UI de colecalciferol, 2 comprimidos via oral ao dia (cada comprimido de 1000UI), durante período da QT neoadjuvante (6 meses). As outras 40 pacientes receberam 2 comprimidos de placebo, via oral ao dia. Os invólucros foram idênticos, embalados e numerados para não identificação do grupo pelas participantes do estudo. Para o controle da suplementação, as pacientes foram orientadas a trazer os frascos a cada retorno para avaliar a medicação usada e determinar a aderência. O tempo de seguimento foi de seis meses com avaliações em dois momentos, inicial e final.

Análise de Vitamina D

A avaliação sérica de 25(OH)D foi mensurada em dois momentos, imediatamente após o diagnóstico do câncer de mama, antes do tratamento proposto, aproximadamente 20 dias pós-diagnóstico e após a realização da QT neoadjuvante, aos seis meses (para avaliar a biodisponibilidade e aderência ao tratamento). Para a dosagem sérica de 25(OH)D foi empregado um imunoensaio, *25(OH) Vitamin D ELISA kit (ab213966)* (Abcam®, Cambridge, UK), pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), obedecendo às recomendações do fabricante. A sensibilidade analítica é de 1.98 ng/mL e o coeficiente de variação intra ensaio é < 3% e inter ensaio é < 11%, segundo descrição do Kit. Todas as dosagens foram realizadas em único momento para minimizar variações interensaios. Foram considerados suficientes valores $\geq 30\text{ng/mL}$, insuficiência de 21 a 29ng/mL e deficiência < 20ng/mL³⁰.

Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir dos relatórios das pacientes com câncer de mama foram obtidos: diagnóstico histopatológico, grau, estágio do tumor e o status de receptor hormonal. O envolvimento linfonodal foi avaliado após a cirurgia ou pela avaliação do linfonodo sentinela. Foram graduados histologicamente em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), de acordo com o método proposto por Elston & Ellis³¹ que utiliza como critérios os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico. O estadiamento patológico do tumor foi definido de acordo com a 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer*²⁶, sistema TNM (tamanho do tumor, *status* linfonodal, metástase), sendo: estágio I (T1N0M0), estágio IIA (T0N1M0, T1N1M0 e T2N0M0), estágio IIB (T2N1M0 e T3N0M0), estágio IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 e T3N2M0), estágio IIIB (T4N0M0, T4N1M0 e T4N2M0), estágio IIIC (qualquer TN3M0) e estágio IV (qualquer T qualquer N M1).

O perfil do receptor hormonal e a atividade proliferativa epitelial foram avaliados por métodos padrão, utilizando imunohistoquímica para receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (PR), e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Para os RE e RP foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais³². Para análise do HER2, se a imunohistoquímica resultou em escore 2+, foi testada amplificação do gene HER2 por hibridação *in situ* fluorescente (FISH)³⁴. Os cânceres de mama foram categorizados em quatro subtipos com base em perfis de imunohistoquímica em: 1-Luminal HER2 negativo: RE positivo e/ou RP positivo, HER2 negativo; 2- Luminal HER2 positivo: RE positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo; 3- HER2 puro: RE e RP negativos e HER2 positivo; 4- Triplo-negativo: RE, RP e HER2 negativos²⁷.

Como marcador da resposta a QT, foi empregada a taxa de RPC avaliada no anatomopatológico da peça cirúrgica pós-quimioterapia. A RPC na mama neste estudo foi

definida de acordo com o *College of American Pathologists* (CAP) como ausência de câncer invasivo residual: ypT0 ypN0 (ausência de câncer invasivo e carcinoma in situ na mama e linfonodos axilares); ypT0/is ypN0 (ausência de câncer invasivo na mama e linfonodos axilares, independentemente de carcinoma ductal in situ)³⁵.

Análise Estatística

O cálculo amostral foi embasado no estudo de Viala et al.²², que encontraram RPC em 33,6% das mulheres com deficiência de VD (<20ng/mL) e em 66,4% naquelas com valores adequados de VD (≥20ng/mL). Considerando a diferença dos valores percentuais apresentados e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%), com poder de 80% e confiabilidade de 95%, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 36 mulheres com câncer de mama por grupo (intervenção x placebo). E considerando perda de seguimento ao redor de 10%, o tamanho amostral adotado foi de 40 mulheres por grupo.

O método de análise estatística utilizado foi *per protocol*. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis qualitativas. Foram analisadas variáveis: 1- clínicas (idade, menarca, paridade, tempo de amamentação, tabagismo e IMC); 2- Dosagem sérica 25(OH)D; 3-dados anatomopatológicos e de imunohistoquímica do câncer de mama (tipo e grau histopatológico, tamanho do tumor, estágio do tumor, linfonodo axilar, RE, RP, HER2, Ki-67, subtipos moleculares); 4- tratamentos quimioterápicos; 5-resposta patológica completa (sim ou não).

Para comparação entre os grupos (VD e PL) em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas), distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas) e o teste do Qui-quadrado ou o Exato de Fisher (variáveis

qualitativas). Na associação entre os grupos quanto as características anatomopatológicas, da imuno-histoquímica, tratamentos quimioterápicos, RPC e valores de 25(OH)D, todas variáveis categorizadas, foram utilizados o teste do Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher (para valor esperado menor ou igual a cinco). Na comparação do IMC entre os momentos (basale 6 meses) e entre os grupos, utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. E na comparação dos valores de 25(OH)D (variável assimétrica) entre os momentos (basale 6 meses) foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald.

A medida de desfecho primário foi a RPC. 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 se valores de VD ($\geq 20\text{ng/mL}$) estava associado à chance de atingir a RPC, ajustado para as variáveis que poderiam influenciar a RPC (tamanho do tumor, grau histológico, estágio, RE, RP, HER2, subtipos moleculares e tratamentos quimioterápicos). 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) for windows, versão 9.4.

Resultados

Das 80 mulheres randomizadas, cinco abandonaram o estudo antes dos seis meses, sendo três participantes do grupo placebo com uma por recusa em realizar a cirurgia na mama e duas evoluíram com metástases e não foram submetidas a cirurgia, e duas no grupo suplementado que também evoluíram com metástases não realizando o

procedimento cirúrgico. Assim, 75 pacientes completaram a quimioterapia neoadjuvante e realizaram a cirurgia (**Figura 1**). Não foram relatados eventos adversos com a intervenção em ambos os grupos, suplementado e placebo. A taxa de adesão foi de 92% entre as participantes que completaram o estudo, sem diferença entre os grupos (VD ou PL).

A comparação das características clínicas iniciais entre as mulheres submetidas à suplementação de VD (n=40) ou placebo (n=40) está demonstrada na Tabela 1. Observa-se que os grupos foram homogêneos para todas as variáveis avaliadas ($p>0,05$). A média de idade das pacientes incluídas foi de 54.7 ± 8.6 anos para o grupo VD e de 56.3 ± 7.1 anos para o grupo PL ($p>0.05$). Em ambos os grupos, as pacientes foram classificadas, em média, como sobrepeso (IMC de 25 a $29,9 \text{ kg/m}^2$). Os valores médios de 25(OH)D indicavam hipovitaminose D nos grupos VD e PL, $19.6 \pm 5.8 \text{ ng/mL}$ e $21.0 \pm 7.9 \text{ ng/mL}$, respectivamente ($p=0.331$) (**Tabela 1**).

A Tabela 2 demonstra a comparação das características anatomopatológicas e imunohistoquímicas do câncer de mama, os tratamentos quimioterápicos e a resposta patológica completa (RPC) entre as mulheres na pós-menopausa com câncer de mama, submetidas à suplementação de vitamina D (n=40) ou placebo (n=40). Não foram observadas diferenças significativas anatomopatológicas e imunohistoquímicas na distribuição percentual dos casos entre os grupos ($p>0.05$). Em relação aos tratamentos quimioterápicos não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p>0.05$). Foi observada diferença significativa na taxa de RPC entre os grupos. As mulheres suplementadas com VD apresentaram maior porcentagem de RPC quando comparada as mulheres do grupo placebo (55.3% vs 32.4%, $p=0.046$) (**Tabela 2**). Na comparação dos valores de 25(OH)D foi observado diferença significativa entre os grupos VD e PL no momento final da intervenção, pós-QT ($28.0 \pm 8,7 \text{ ng/mL}$ vs $20.2 \pm 6.1 \text{ ng/mL}$, respectivamente) e entre o momento inicial e final no grupo suplementado ($p=0.032$). Na

avaliação do IMC não foram encontradas diferenças entre grupos e entre momentos ($p > 0.05$) (**Tabela 3**).

Conforme demonstrado na Tabela 4, entre as 75 mulheres que finalizaram a QT e que realizaram a cirurgia, a taxa de RPC foi de 44% (33/75). Foi observado que quanto maior o valor de 25(OH)D, maior a porcentagem de mulheres com RPC, demonstrando uma associação positiva. Entre as mulheres com RPC, 48,5% apresentavam valores suficientes de VD (valores de 25(OH)D \geq 30ng/mL) ao final de seis meses de suplementação, diferente significativamente daquelas no grupo PL (9.5%, $p < .001$). Foi demonstrado que pacientes com tumores HER2 positivos apresentaram significativamente maior taxa de RPC (30.2% vs. 19.0%, $p = 0.049$, respectivamente). Nas demais variáveis anatomopatológicas, imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos não foram encontradas diferenças na distribuição percentual entre as mulheres com e sem RPC ($p > 0.05$) (**Tabela 4**).

Na Tabela 5 foi apresentada a associação das variáveis clínicas e anatomopatológicas e imunohistoquímicas e dos tratamentos quimioterápicos entre as mulheres que apresentaram RPC suplementadas com VD ($n = 21$) e no placebo ($n = 12$). Não foram observadas diferenças significativas na distribuição percentual entre os grupos na maioria das variáveis clínicas, anatomopatológicas e imunohistoquímicas, e tratamentos quimioterápicos ($p > 0.05$). Foi observada diferença no grupo suplementado com menor ocorrência de tumores de alto grau histológico quando comparadas a mulheres do grupo placebo (52.4% vs 75.0%, respectivamente, $p = 0.040$). E também, no grupo suplementado foi encontrada maior porcentagem de mulheres com valores suficientes de VD (valores de 25(OH)D \geq 30ng/mL) quando comparadas a mulheres do grupo placebo (61.9% vs 25.0%, respectivamente, $p = 0.005$) (**Tabela 5**).

Considerando o desfecho como a RPC versus a resposta patológica parcial e usando um modelo de regressão logística ajustado para idade e IMC, mulheres com valores de

25(OH)D \geq 20ng/mL apresentaram maior chance de obter RPC em relação às mulheres com deficiência de VD (OR 0.15, IC 95% 0.05-0.44, $p=0.0006$). Quando realizado um modelo de regressão logística, ajustado para variáveis que interferem na RPC (anatomopatológicas, imunohistoquímicas e tratamentos quimioterápicos), manteve-se maior chance de obter RPC com valores de 25(OH)D \geq 20ng/mL (OR 0.10 IC 95% 0.02-0.61, $p=0.013$) (Dados não demonstrados).

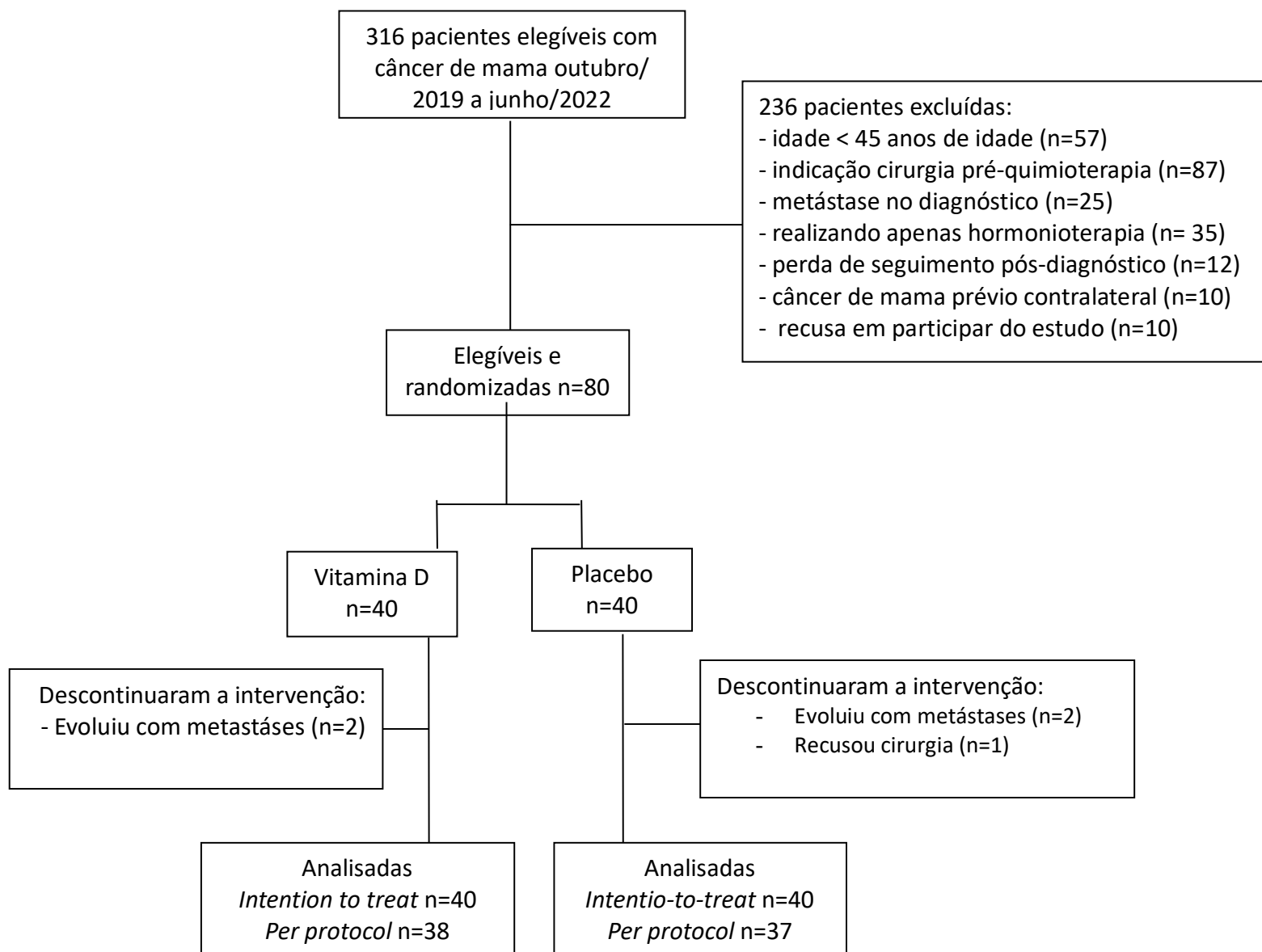


Figura 1- Fluxograma do estudo.

Tabela 1. Comparação das características iniciais entre as mulheres com câncer de mama submetidas à suplementação de vitamina D (n=40) ou placebo (n=40).

Variáveis	Vitamina D (n=40)	Placebo (n=40)	Valor de p*
Idade (anos)	54.7 ± 8.6	56.3 ± 7.1	0.435 ^a
Menarca (anos)	12.1 ± 1.6	12.6 ± 2.1	0.243 ^a
Idade primeira gestação (anos)	21.5 ± 5.5	22.3 ± 4.8	0.486 ^a
Paridade (número de filhos)	2.3 ± 1.5	2.2 ± 1.6	0.778 ^b
Tempo amamentação (meses)	30.7 ± 18.9	26.9 ± 19.4	0.179 ^b
IMC (kg/m ²)	28.9 ± 4.6	27.4 ± 5.0	0.128 ^a
25(OH)D (ng/mL)	19.6 ± 5.8	21.0 ± 7.9	0.331 ^b
Tabagismo (%)	8 (20.0)	10 (25.0)	0.597 ^c
Hipertensão (%)	10 (25.0)	14 (35.0)	0.292 ^c
Diabetes (%)	5 (12.5)	8 (20.0)	0.336 ^c
HF de Câncer de mama (%)	8 (20.0)	9 (17.5)	0.634 ^c

Valores médios (± desvio padrão) ou frequência (%).

IMC, índice de massa corporal; 25(OH)D, 25-hidroxivitamina D; HF, história familiar.

*Diferença significativa se $P < 0,05$ (^aTeste *t*-Student, ^bTeste de Distribuição Gama ou ^cTeste do Qui-Quadrado).

Tabela 2. Comparação das características anatomopatológicas e imunohistoquímicas do câncer de mama, os tratamentos quimioterápicos e a resposta patológica completa entre as mulheres submetidas à suplementação de vitamina D (n=40) ou placebo (n=40).

Variáveis	Vitamina D (n=40)	Placebo (n=40)	P* value
Tamanho do tumor (%)			0.684
≤ 2 cm	7 (17.5)	9 (22.5)	
2-5 cm	25(62.5)	22 (55.0)	
≥ 5 cm	8 (20.0)	9 (22.5)	
Tipo histológico (%)			0.317
Ductal	37 (92.5)	38 (95.0)	
Lobular	3 (7.5)	2 (5.0)	
Grau Histológico (%)			0.078
Baixo (grau 1)	2 (5.0)	1 (2.5)	
Intermediário (grau 2)	12 (30.0)	19 (47.5)	
Alto (grau 3)	26 (65.0)	20 (50.0)	
Estádio clínico- AJCC (%)			0.512
I	1 (2.5)	1 (2.5)	
II	17 (42.5)	16 (40.0)	
III	22 (52.5)	23 (57.5)	
Linfonodos axilares (%)			0.098
Negativo	5 (12.5)	8 (20.0)	
Positivo	35 (87.5)	32 (80.0)	
Receptor Estrogênio (%)			0.934
Positivo	26 (65.0)	25 (62.5)	
Negativo	14 (35.0)	15 (37.5)	
Receptor Progesterona (%)			0.914
Positivo	21 (52.5)	20 (50.0)	
Negativo	19 (47.5)	20 (50.0)	
HER2 (%)			0.256

	Positivo	7 (17.5)	11 (27.5)	
	Negativo	33 (82.5)	29 (72.50)	
Ki-67 (%)				0.210
	<20%	12 (30.0)	8 (20.0)	
	≥ 20%	28 (70.0)	32 (80.0)	
Subtipo (%)				0.697
	Luminal HER2-	22 (55.0)	19 (47.5)	
	Luminal HER2+	5 (12.5)	7 (17.5)	
	HER2 puro	2 (5.0)	4 (10.0)	
	Triplonegativo	11 (27.5)	10 (25.0)	
Tipo de cirurgia#				0.320
	Mastectomia	13 (34.2)	14 (37.8)	
	Quadrantectomia	25 (65.8)	23 (62.2)	
Tipo Quimioterapia				0.712
	AC + T	14 (35.0)	11 (27.5)	
	ACdd + T	11 (27.5)	16 (40.0)	
	AC + T+ herceptin	3 (7.5)	1 (2.5)	
	ACdd + T + herceptin	5 (12.5)	4 (10.0)	
	AC + TC	1 (2.5)	1 (2.5)	
	ACdd + TC	6 (15.0)	7 (17.5)	
Taxa de Resposta Patológica#				0.046
	Completa	21 (55.3)	12 (32.4)	
	Parcial	17 (44.7)	25 (67.6)	

Valores em frequência e porcentagem (%).

AJCC, American Joint Committee on Cancer; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; AC: doxorubicina associado a ciclofosfamida, ACdd: doxorubicina associado a ciclofosfamida dose-densa, T: taxano, H: herceptin, TC: taxano associado a carboplatina

75 pacientes foram submetidas à cirurgia, 38 grupo vitamina D e 37 grupo placebo

* Diferença significativa se $P < 0,05$ (Teste do Qui-Quadrado ou Exato de Fisher).

Tabela 3. Comparação das concentrações de 25(OH)D e a resposta patológica completa (RPC) entre as mulheres submetidas à suplementação de vitamina D (n=37) ou ao placebo (n=36) nos momentos basal e após 6 meses de intervenção.

Variável/Grupo	Basal	6 meses	Variação (%)	
<i>25(OH)D (ng/mL)</i>				Valor de P*
Placebo	21.0 ± 7.9a	20.2 ± 6.1a		0.312
Vitamina D	19.6 ± 5.8a	28.0 ± 8.7b		0.032
<i>IMC kg/m²</i>				Valor de P**
Placebo	27.4 ± 5.0a	26.8 ± 4.6a		0.328
Vitamina D	28.9 ± 4.6a	28.1 ± 4.8a		0.211

Valores médios (desvio padrão).

Variação Absoluta: valores finais subtraídos dos valores basais.

*p-valor mostra a diferença significativa entre momentos ($p < 0.05$) e (a,b) mostram diferenças significante entre grupos e (a,a) sem diferença ($p > 0,05$) (Medidas repetidas por meio da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald).

**p-valor mostra a diferença significativa entre momentos ($p < 0.05$) e (a,b) mostram diferenças significante entre grupos e (a,a) sem diferença ($p > 0,05$) (ANOVA no desenho de medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey ajustado)

Tabela 4- Associação entre a resposta patológica completa (RPC) e os parâmetros clínicos, anatomopatológicos e imunohistoquímicos, os tratamentos quimioterápicos e os valores finais de 25(OH)D em 75 mulheres com câncer de mama.

Variáveis	RPC sim (n=33)	RPC não (n=42)	P* value
Idade (anos)			0.419
≤ 50	14 (42.4)	14 (33.3)	
> 50	19 (57.6)	28 (66.7)	
IMC final (Kg/m ²)			0.853
≤ 24.9	9 (27.3)	12 (28.6)	
25- 29.9	11(33.3)	16 (38.1)	
≥ 30	13(39.4)	14 (33.3)	
Tamanho do tumor			0.189
≤ 2 cm	4 (12.1)	9 (21.4)	
2-5 cm	20 (60.6)	23 (54.8)	
≥ 5 cm	9 (27.3)	10 (23.8)	
Grau Histológico			0.814
Baixo (grau 1)	1 (3.0)	1 (2.4)	
Intermediário (grau 2)	11 (33.3)	17 (40.5)	
Alto (grau 3)	21 (63.6)	24 (57.1)	
Estádio clínico AJCC			0.425
I	0 (0.0)	2 (4.7)	
II	13 (39.4)	19 (45.2)	
III	20 (60.6)	21 (50.1)	
Linfonodos axilares (%)			0.290
Negativo	7 (21.2)	6 (14.3)	
Positivo	26 (78.8)	36 (85.7)	
Receptor Estrogenio (%)			0.051
Positivo	18 (54.5)	30 (71.4)	
Negativo	15 (45.4)	12 (28.6)	

Receptor Progesterona (%)			0.314
Positivo	15 (45.5)	24 (57.1)	
Negativo	18 (54.5)	18 (42.9)	
HER2 (%)			0.048
Positivo	10 (30.3)	8 (19.0)	
Negativo	23 (69.7)	34 (81.0)	
Subtipo			0.087
Luminal HER2-	15 (45.5)	22 (52.4)	
Luminal HER2+	3 (9.1)	6 (14.2)	
HER2 puro	7 (21.1)	2 (4.8)	
Triplo negativo	8 (24.2)	12 (28.6)	
Tipo Quimioterapia			0.246
AC + T	7 (21.2)	15 (35.7)	
ACdd + T	14 (42.4)	11 (26.2)	
AC + T+ herceptin	1 (3.0)	3 (7.1)	
ACdd + T + herceptin	5 (15.2)	4 (9.5)	
AC + TC	0 (0.0)	2 (4.8)	
ACdd + TC	6 (18.2)	7 (16.7)	
Valor final de 25(OH)D			<0.0001
<20ng/mL	6 (18.2)	24 (57.1)	
21-29ng/mL	11 (33.3)	14 (33.4)	
≥ 30ng/mL	16 (48.5)	4 (9.5)	

Valores em frequência e porcentagem (%).

AJCC, American Joint Committee on Cancer; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; IMC, índice de massa corpórea; RPC, resposta patológica completa, AC: doxorubicina associado a ciclofosfamida, ACdd: doxorubicina associado a ciclofosfamida dose-densa, T: taxano, H: herceptin, TC: taxano associado a carboplatina

* Diferença significativa se $P < 0,05$ (Teste do Qui-Quadrado ou Exato de Fisher).

Tabela 5- Associação entre os parâmetros clínicos, anatomopatológicos, imunohistoquímicos, tratamentos quimioterápicos e os valores finais de 25(OH)D nas mulheres que apresentaram resposta patológica completa, submetidas à suplementação de vitamina D ou placebo.

Variáveis	Vitamina D	Placebo	<i>P* value</i>
	RPC (n=21)	RPC (n=12)	
Idade (anos)			0.424
≤ 50	10 (47.6)	4 (33.3)	
> 50	11 (52.4)	8 (66.7)	
IMC final (Kg/m ²)			0.807
≤ 24.9	5 (23.8)	4 (33.3)	
25- 29.9	7 (33.3)	4 (33.3)	
≥ 30	9 (42.9)	4 (33.3)	
Tamanho do tumor			0.732
≤ 2 cm	3 (14.3)	1 (8.3)	
2-5 cm	11 (52.4)	7 (58.3)	
≥ 5 cm	6 (28.6)	2 (16.7)	
Grau Histológico			0.040
Baixo (grau 1)	1 (4.8)	1 (8.3)	
Intermediário (grau 2)	9 (42.8)	2 (16.7)	
Alto (grau 3)	11 (52.4)	9 (75.0)	
Estádio clínico AJCC			0.590
I	0 (0.0)	0 (0.0)	
II	9 (42.9)	4 (33.3)	
III	12 (57.1)	8 (66.7)	
Linfonodos axilares (%)			0.171
Negativo	6 (28.6)	2 (18.2)	
Positivo	15 (71.4)	10 (81.8)	
Receptor Estrogenio (%)			0.261
Positivo	13 (61.9)	5 (41.7)	

	Negativo	8 (38.1)	7 (58.3)	
Receptor Progesterona(%)				0.741
	Positivo	10 (47.6)	5 (41.7)	
	Negativo	11 (52.4)	7 (58.3)	
HER2 (%)				0.687
	Positivo	6 (28.6)	4 (33.3)	
	Negativo	15 (71.4)	8 (66.7)	
Tipo Quimioterapia				0.576
	AC + T	3 (14.3)	3 (25.0)	
	ACdd + T	10 (47.6)	5 (41.7)	
	AC + T+ herceptin	0 (0.0)	1 (8.3)	
	ACdd + T + herceptin	4 (19.0)	1 (8.3)	
	AC + TC	0 (0.0)	0 (0.0)	
	ACdd + TC	4 (19.0)	2 (16.7)	
Subtipo				0.566
	Luminal HER2-	10 (47.6)	5 (41.7)	
	Luminal HER2+	2 (9.5)	1 (8.3)	
	HER2 puro	4 (19.0)	3 (25.0)	
	Triplo negativo	5 (23.9)	3 (25.0)	
Valor final de 25(OH)D				0.005
	<20ng/mL	2 (9.5)	4 (33.3)	
	21-29ng/mL	6 (28.6)	5 (41.6)	
	≥ 30ng/mL	13 (61.9)	3 (25.0)	

Valores em frequência e porcentagem (%).

AJCC, American Joint Committee on Cancer; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2; IMC, índice de massa corpórea; RPC, resposta patológica completa; RPP, resposta patológica parcial, AC: doxorubicina associado a ciclofosfamida, ACdd: doxorubicina associado a ciclofosfamida dose-densa, T: taxano, H: herceptin, TC: taxano associado a carboplatina

* Diferença significativa se $P < 0,05$ (Teste do Qui-Quadrado ou Exato de Fisher).

Discussão

No presente estudo, mulheres com câncer de mama suplementadas com VD por seis meses durante a QT neoadjuvante apresentaram maior porcentagem de RPC quando comparada às mulheres do grupo placebo. Mulheres com valores de 25(OH)VD ≥ 20 ng/mL ao final da intervenção tiveram maior chance de obter a RPC em relação as mulheres com deficiência de VD. E quanto maior o valor de 25(OH)D, maior a porcentagem de mulheres com RPC, demonstrando uma associação positiva entre VD e a RPC. Esta relação do valor sérico de VD com a taxa de RPC do tumor, importante fator prognóstico no câncer de mama, está em investigação atual pelos efeitos anticancerígenos da VD em microambientes tumorais^{6,20}. O impacto do presente resultado embasa e sustenta as evidências científicas que associam a deficiência de VD ao prognóstico e mortalidade pelo câncer de mama^{3,8,9}, reforçando a importância da avaliação e suplementação de VD quando necessária.

Entre as pacientes que realizaram a quimioterapia neoadjuvante, a taxa de RPC foi de 44%, sendo que as mulheres suplementadas com VD apresentaram significativamente maior porcentagem de RPC (55,3%) quando comparada as mulheres do grupo placebo (32,4%). Corroborando com nosso resultado, estudo retrospectivo com 327 mulheres, avaliando o impacto dos valores de VD após QT neoadjuvante para câncer de mama, encontrou RPC em 33,6% das mulheres com deficiência de VD (<20ng/mL) e em 66,4% naquelas com valores adequados de VD (≥ 20 ng/mL), com diferença significativa entre os grupos. A deficiência de VD associou-se à incapacidade de atingir RPC em pacientes com câncer de mama submetidas à QT neoadjuvante²². Em outro estudo clínico, não randomizado, o efeito da suplementação VD sobre a RPC foi investigado em 117 pacientes com câncer de mama submetidas a QT neoadjuvante, com dosagens séricas de VD antes e após a QT. Um grupo recebeu suplementação oral de 50.000 UI de VD (n=64). A taxa de

RPC em todas os pacientes que receberam QT neoadjuvante foi de 23,5%, e a adição de VD aumentou significativamente a taxa de RPC²³.

Em nosso estudo, mulheres com valores de 25(OH)VD \geq 20ng/mL ao final do estudo apresentaram maior chance de obter a RPC (OR 0.10 IC 95% 0.02-0.61), em relação as mulheres com deficiência de VD, mesmo quando ajustado para variáveis que reconhecidamente impactam na RPC, como grau histológico, receptor de estrogênio negativo e HER2 positivo. Em concordância aos nossos resultados, estudo retrospectivo avaliou 144 mulheres diagnosticadas com câncer de mama em estágio clínico I a III, com níveis de VD mensurados no diagnóstico ou durante a QT, e concluíram que valores reduzidos de VD foram associados à não obtenção da RPC. Nos resultados da análise multivariada, após o ajuste para os efeitos do estágio clínico e status do receptor, a deficiência de VD aumentou as chances de não atingir a RPC (OR 2.68, IC de 95%, 1,12-6,41, $p=0,03$)²¹.

A associação entre uma melhor RPC à QT neoadjuvante com mudanças positivas nas concentrações sanguíneas de VD pode ser resultado do efeito pleiotrópico da VD nas células tumorais^{18,36}. Nossos resultados reforçam a teoria que aumentar os valores séricos de 25(OH)D através da suplementação de VD forneceria níveis aumentados do substrato em tecidos alvo como a mama, para a produção local de 1,25(OH)2D¹³. E considerando a maior expressão de VDR nas células neoplásicas mamárias quando comparadas com células saudáveis³⁷, a ligação de 1,25(OH)2D ao seu receptor levaria potencialmente a expressão aumentada de genes com efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos, explicando potencialmente por que níveis suficientes de VD podem estar associados a resposta patológica mais favorável^{18,38}.

No presente estudo, quanto maior o valor de 25(OH)D, maior a porcentagem de mulheres com RPC, demonstrando uma associação positiva entre VD e a RPC. Quando

associado à RPC aos valores de 25(OH)D, encontramos que 48,5% das mulheres com RPC atingiram valores finais suficientes de VD (≥ 30 ng/mL), enquanto que 57,2% das mulheres que não obtiveram RPC apresentaram níveis deficientes de VD (< 20 ng/mL). A relação dose-resposta dos níveis séricos de 25(OH)D para benefício sobre o câncer de mama parece inversa e linear até 60 ng/ml³⁹. Essa correlação positiva poderia ser parcialmente explicada pelo potencial efeito anticancerígeno da VD⁴. Além disso, a VD parece influenciar a resposta aos agentes quimioterápicos. Nosso resultado é consistente com estudos experimentais que demonstram que a VD sensibiliza as células do câncer de mama aos agentes quimioterápicos²¹. Resultados *in vitro* mostraram que a VD potencializa as atividades antitumorais de antraciclinas e taxanos, dois compostos citotóxicos amplamente utilizados na quimioterapia neoadjuvante^{40,41}. Além de potencializar a apoptose induzida por adriamicina, paclitaxel e tamoxifeno^{42,43}.

Uma característica relevante identificada em ambos os grupos do nosso estudo foi a hipovitaminose D em mulheres com câncer de mama no momento do diagnóstico da doença. A deficiência de VD é altamente prevalente em mulheres com câncer de mama^{10,11}. Recente revisão sistemática e metanálise, incluindo 25 estudos com mulheres de todos continentes, encontrou que 67,4% das pacientes com câncer de mama apresentavam valores basais abaixo de 30 ng/mL, enquanto esse percentual foi de 33,1% no grupo controle¹¹. Recente estudo do nosso grupo de pesquisa avaliou a associação entre os valores séricos de VD e a sobrevida em 192 mulheres tratadas do câncer de mama. Após cinco anos de seguimento foi observado que a deficiência de VD no momento do diagnóstico associou-se a menor sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica do câncer em comparação às pacientes com valores suficientes de VD, independentemente dos fatores prognósticos do câncer de mama como idade, estágio e

tamanho do tumor, status linfonodal, receptores hormonais e subtipos moleculares do câncer de mama⁹.

O período da QT neoadjuvante é potencial para investigar as interações entre os níveis de VD e a capacidade de resposta do tumor a QT²¹, pois a hipovitaminose D pode ser exacerbada durante o tratamento^{18,44}. Vários mecanismos diferentes podem ser responsáveis pelas reduções nos níveis de 25(OH)D no câncer de mama, induzidas pela QT. Em nível molecular, formas ativas de VD podem ser convertidas em metabólitos inativos pela regulação positiva da enzima CYP3A4 no fígado, um membro da superfamília de metabolizadores de drogas do citocromo P450, regulada positivamente como um mecanismo de defesa contra a QT^{18,45}. Outra possível explicação seria a orientação feita aos pacientes com câncer de mama para evitar a luz solar durante o tratamento, para a prevenção da foto sensibilidade induzida pela QT⁴⁶. Além desses fatos, devemos considerar que pacientes sobre quimioterapia costumam apresentar efeitos colaterais gastrointestinais que podem influenciar a ingestão e absorção nutricional de VD⁴⁷.

No presente estudo a duração da intervenção (6 meses) e a dose suplementada de VD (2.000UI/dia) foram suficientes para provocar aumentos mensuráveis nos valores séricos de 25(OH)D. No momento final, na comparação entre os grupos foi observado aumento significativo na dosagem sérica de 25(OH)D no grupo suplementado com VD (19.6±5.8 ng/mL vs 28.0±8.7 ng/mL, respectivamente), indicando aderência ao tratamento. Por outro lado, as mulheres no grupo placebo apresentaram valores de 25(OH)D compatíveis com deficiência de VD, sem variações durante a QT. Em concordância com nossos resultados, recente estudo clínico avaliou a correção de deficiência de VD em 44 pacientes com hipovitaminose D e câncer de mama submetida a QT neoadjuvante, com doses elevadas de 100.000UI de VD, cada 4 semanas durante a quimioterapia

neoadjuvante. A porcentagem de pacientes com normalização da concentração sérica de 25 (OH)D foi de 47,7%, com concentração sérica mediana de 29,2 ng/mL⁴.

Os fatores preditivos da RPC são de suma importância quando se trata de mulheres com câncer de mama, submetidas à QT neoadjuvante¹⁶. Embasado nisso, em nosso estudo foi realizada a comparação das características anatomopatológicas e imunohistoquímicas dos tumores e dos tratamentos quimioterápicos realizados entre as mulheres com câncer de mama, submetidos à suplementação de VD ou placebo. Foi observado que mulheres com tumores HER2 positivos apresentaram significativamente maior taxa de RPC. Esse resultado está em concordância com a literatura em que subtipos moleculares mais agressivos apresentam melhor RPC¹⁶. O câncer de mama HER2 positivo é um subtipo agressivo de tumor que superexpressa o HER2, promovendo o crescimento de células cancerígenas. Na QT neoadjuvante, os anticorpos monoclonais direcionados ao receptor HER2 melhoraram a taxa de RPC e a sobrevida⁴⁸. Estudo retrospectivo, avaliando as mulheres com câncer de mama que realizaram QT associada ao trastuzumabe, identificou aquelas que receberam suplementação de VD (60% dose <10.000 UI/semana) durante a QT (n=134) e aquelas que não receberam (n=112). A suplementação de VD associou-se com maior intervalo livre de doença (HR 0.36; IC 95%, 0.15-0.88) em pacientes com câncer de mama HER2+ não metastático⁴⁹.

A suplementação destina-se a elevar valores séricos de 25(OH)D de modo a aproveitar ao máximo os benefícios da VD. E a adequação da dosagem recomendada de suplementação pode interferir nos resultados esperados⁵⁰. Estudo clínico avaliou o valor preditivo dos níveis de VD sobre a RPC após QT neoadjuvante em 250 pacientes com câncer de mama participantes do *NEOZOTAC phase-III trial*, randomizadas para receber ou não ácido zoledrônico associado a 400UI de VD e 500mg de cálcio por dia, com avaliações de 25(OH)D no início e antes do último ciclo de QT. Os valores medianos de VD basal e pós-

quimioterapia foram 23,5 ng/mL e 20,5 ng/mL, respectivamente, sem variações nos valores no grupo tratado. Não houve associação significativa entre os valores de VD e a RPC. Os autores concluem que níveis séricos de VD durante a quimioterapia neoadjuvante devem ser monitorados e corrigidos se necessário¹⁸.

O presente estudo tem pontos fortes, bem como limitações. Sua principal força reside no desenho de estudo, pois até onde sabemos na literatura, este é o primeiro estudo clínico randomizado controlado com placebo que avaliou o efeito da suplementação de VD na RPC durante a QT neoadjuvante. A duração da intervenção e a dose administrada foram suficientes para provocar aumentos mensuráveis nos valores séricos de 25(OH)D. Este estudo também apresentou altas taxas de adesão (92% das participantes), sem diferenças entre os grupos de intervenção (VD ou placebo). Apesar de nosso estudo mostrar que a adição de VD durante a QT neoadjuvante aumentou significativamente a taxa de RPC, este estudo tem algumas limitações, pelo fato de ser um estudo de centro único com número relativamente baixo de pacientes, especialmente nos subtipos moleculares, em que o poder de detecção de alterações pode ter sido limitado. No entanto, apesar do pequeno tamanho da amostra, este estudo foi adequadamente desenvolvido para detectar relações estatisticamente significativas entre os níveis de VD as respostas a QT. E por tratar-se de uma população de estudo relativamente homogênea, nossos resultados não podem ser generalizados para outros grupos raciais/étnicos.

Conclusão

No presente estudo, mulheres com câncer de mama submetidas a QT neoadjuvante e a suplementação de 2000UI de VD apresentaram maior taxa de RPC quando comparada às mulheres do grupo placebo. Mulheres com valores de 25(OH)D > 20ng/mL tiveram maior chance de obter RPC em relação as mulheres com deficiência de VD. Nossos resultados

apoiam as evidências que níveis séricos de VD devem ser avaliados durante a QT neoadjuvante e a suplementação pode ser benéfica para o desfecho da RPC em mulheres com câncer de mama. Novos estudos são necessários para validar esses resultados, pois a confirmação desse achado tem importante relevância clínica direta com possíveis implicações terapêuticas.

Referências

- 1- Carlberg C, Velleuer E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochemical Pharmacology* 196, 2022; 114735
- 2- Welsh J. Vitamin D and Breast Cancer: Past and Present. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;177:15-20.
- 3- Hossain S, Beydoun MA, Beydoun HA, et al. Vitamin D and breast cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr ESPEN.* 2019;30:170-184.
- 4- Chartron E, Firmin N, Touraine C, et al. A Phase II Multicenter Trial on High-Dose Vitamin D Supplementation for the Correction of Vitamin D Insufficiency in Patients with Breast Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Nutrients.* 2021;13(12):4429.
- 5-Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(5):342–57
- 6-Pandolfi F, Franza L, Mandolini C, Conti P. Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer. *Clin Ther* 2017;39:884–893.
- 7-Sheng L, Callen DF, Turner AG. Vitamin D₃ signaling and breast cancer: Insights from transgenic mouse models *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018;178:348-353
- 8-Mohr SB, Gorham ED, Kim J, et al. Meta-analysis of vitamin D sufficiency for improving survival of patients with breast cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1163-1166.

- 9- Almeida-Filho BS, Omodei MS, Buttros D, Carvalho-Pessoa E, Carvalho-Pessoa CP, Vespoli H, Nahas EAP. Negative Impact of Vitamin D Deficiency at Diagnosis on Breast Cancer Survival: A Prospective Cohort Study. *Br Journal* 2022;ID 4625233
- 10-Machado M, Almeida-Filho BS, Vespoli HL, Schmitt EB, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Low Pretreatment Serum Concentration of Vitamin D at Breast Cancer Diagnosis in Postmenopausal Women. *Menopause* 2019; 26(3):293-299.
- 11-Voutsadakis IA. Vitamin D baseline levels at diagnosis of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2021;14(1):16-26.
- 12- Sousa Almeida-Filho B, De Luca Vespoli H, Pessoa EC, Machado M, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women.. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;174:284-289.
- 13-Krishnan AV, Swami S, Feldman D. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 2012; 77: 1107-12.
- 14- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009;19(7):468–83.
- 15- Korde LA, MD; Somerfield MR, PhD; Carey LA, MD; Crews JR, MD; Denduluri N, MD;Hwang ES, MD; Khan SA, MD; Loibl S, MD, PhD; Morris EA, MD; Perez A, MD; Regan MM, ScD; Spears PA, BS; Sudheendra PK, MD; Symmans WF, MD; Yung RL, MD; Harvey BE, BS; Hershman DL, MD. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer. *ASCO Guideline - J Clin Oncol*, 2021; 39:1485-1505
- 16- Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer Jr CE, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, Minckwitz Gv. Pathological complete

response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014;384(9938):164-72.

17- Clark AS, Chen J, Kapoor S, et al. I-SPY1 Investigators. Pretreatment vitamin D level and response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer on the I-SPY trial (CALGB 150007/150015/ACRIN6657). *Cancer Med* 2014; 3(3):693–701

18-Charehbili A, Hamdy NA, Smit VT, et al. Dutch Breast Cancer Research Group (BOOG). Vitamin D (25-OH D3) status and pathological response to neoadjuvant chemotherapy in stage II/III breast cancer: Data from the NEOZOTAC trial (BOOG 10-01). *Breast*. 2016;25:69-74.

19-Kim JS, Haule CC, Kim JH, et al. Association between Changes in Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Survival in Patients with Breast Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *J Breast Cancer*. 2018;21(2):134-141.

20- Tokunaga E, Masuda T, Ijichi H, et al. Impact of serum vitamin D on the response and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*. 2022;29(1):156-163.

21-Chiba A, Raman R, Thomas A, et al. Serum Vitamin D Levels Affect Pathologic Complete Response in Patients Undergoing Neoadjuvant Systemic Therapy for Operable Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(2):144-149.

22- Viala M, Chiba A, Thezenas S, et al. Impact of vitamin D on pathological complete response and survival following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: A retrospective study. *BMC Cancer* 2018, 18, 770.

23- Ozmen MD V, Ordu MD C, Ilgun MD AS, Unal MD C, Soybir MD G, Erdogan MD Z, Tapan MS TK, Aktepe MD F, Alco MD G, Duymaz MS T, Ozmen MD T. The effects of vitamin D replacement on pathological complete response (pCR) in breast cancer patients receiving neoadjuvant systemic chemotherapy (NAC). *Breast J*. 2021; 27:902–905.

24-Madden JM, Murphy L, Zgaga L, Bennett K. De novo vitamin D supplement use post-diagnosis is associated with breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;23.

25- Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MG et al. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2017;116(8):1092–1110

26- Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, and Trotti A, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer, New York, NY, USA, 8th edition, 2017.

27- Szymiczek A, Lone A, Akbari MR. Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet.* 2021;99(5):613-637.

28- Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Ann Intern Med* 2010;152(11):726-32.

29- 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.

30- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al.; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.

31- Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 1993;46:189-90.

32- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. 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;134:907-22.
- 33- 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;22:1736–47.
- 34- 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.
- 35- The College of American Pathologists. The CAP Cancer Protocols. Available in: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>.
- 36- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. Kidney Int 2010;78:140e5.
- 37- Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, Manjer J. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. Breast Cancer Res. 2019;21(1):84.
- 38- Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. Biochem J 2012;441:61e76.
- 39- Augustin LS, Libra M, Crispo A, et al. Low glycemic index diet, exercise and vitamin D to reduce breast cancer: design of a clinical trial. BMC Cancer 2017;17(1):69.
- 40- Chaudhry M, Sundaram S, Gennings C, Carter H, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog, ILX-23-7553, enhances the response to adriamycin and irradiation in MCF-7 breast tumor cells. Cancer Chemother. Pharmacol. 2001, 47, 429–436.

41- Hershberger PA, Yu WD, Modzelewski RA et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7,1043–1051.

42- Sundaram S, Chaudhry M, Reardon D, Gupta M, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog EB 1089 enhances the antiproliferative and apoptotic effects of Adriamycin in MCF-7 breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63:1–10.

43- Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2000; 60:2040–8.

44- Jacot W, Pouderoux S, Thezenas S, et al. Increased prevalence of vitamin D insufficiency in patients with breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134:709–17.

45- Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer* 2002; 97:129e32.

46- Akay BN, Unlu E, Buyukcelik A, Akyol A. Photosensitive rash in association with porphyrin biosynthesis possibly induced by docetaxel and trastuzumab therapy in a patient with metastatic breast carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40:989e91.

47- Naito Y, Kai Y, Ishikawa T, Fujita T, Uehara K, Doihara K, Tokunaga S, Shimokawa M, Ito Y, Saeki T. Chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer*, 2020; 27:122–128

48- Greenwell K, Hussain L, Lee D, Bramlage M, Bills G, Mehta A, Jackson A, Wexelman B. Complete pathologic response rate to neoadjuvant chemotherapy increases with increasing HER2/CEP17 ratio in HER2 overexpressing breast cancer: analysis of the National Cancer Database (NCDB). *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Jun;181(2):249-254.

49- Zeichner SB, Koru-Sengul T, Shah N, Liu Q, Markward NJ, Montero AJ, Glück S, Silva O, AhnER. Improved Clinical Outcomes Associated With Vitamin D Supplementation During Adjuvant Chemotherapy in Patients With HER2p Nonmetastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2015; 15(1): e1-11.

50-Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, Lips P, Munns CF, Lazaretti-Castro M, Giustina A, Bilezikian J. Skeletal and Extraskkeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):1109-1151.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo, mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante e a suplementação de 2000UI de vitamina D apresentaram maior taxa de resposta patológica completa quando comparada às mulheres do grupo placebo. Mulheres com valores de 25(OH)D > 20ng/mL tiveram maior chance de obter taxa de resposta patológica completa em relação as mulheres com deficiência de vitamina D. E quanto maior o valor de 25(OH)D, maior a porcentagem de mulheres com resposta patológica completa, demonstrando uma associação positiva entre vitamina D e a resposta patológica completa. Tumores HER2 positivo associaram-se a maior taxa de resposta patológica completa.

Esses resultados sugerem que o tratamento da deficiência de vitamina D em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante poderia impactar positivamente sobre a resposta patológica completa. E apoiam as evidências que níveis séricos de VD devem ser avaliados durante a quimioterapia neoadjuvante e a suplementação pode ser benéfica para o desfecho da resposta patológica completa em mulheres com câncer de mama. Novos estudos são necessários para validar esses resultados, pois a confirmação desse achado tem importante relevância clínica direta com possíveis implicações terapêuticas.

6. REFERÊNCIAS

- ACS- American Cancer Society. Breast cancer facts & figures 2019-2020. Atlanta:American Cancer Society, Inc.; 2019. Disponível em:<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-factsandstatistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>.
- 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.
- AJCC- S. Edge, D. R. Byrd, C. C. Compton, A. G. Fritz, F. L. Greene, and A. Trotti, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer, New York, NY, USA, 8th edition, 2017.
- Akala EO, Fisusi FA. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy - Pharmaceutical Nanotechnology, 2019; 7, 3-23.
- Akay BN, Unlu E, Buyukcelik A, Akyol A. Photosensitive rash in association with porphyrin biosynthesis possibly induced by docetaxel and trastuzumab therapy in a patient with metastatic breast carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2010; 40:989e91.
- Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W, et al. Tumor expression of vitamin D receptor and breast Cancer histopathological characteristics and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2017;23:97– 103.
- Almeida-Filho BS, De Luca Vespoli H, Pessoa EC, Machado M, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Bio* 2017;174:284-289.

- Almeida-Filho BS, Omodei MS, Buttros D, Carvalho-Pessoa E, Carvalho-Pessoa CP, Vespoli H, Nahas EAP. Negative Impact of Vitamin D Deficiency at Diagnosis on Breast Cancer Survival: A Prospective Cohort Study. *Br Journal* 2022;ID 4625233
- 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.
- 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.
- Anagnostis P, Karras S, Goulis DG. Vitamin D in human reproduction: a narrative review. *Int. J. Clin. Pract.*, 2013; 67 (3) 225–235.
- Augustin LS, Libra M, Crispo A, Grimaldi M, De Laurentiis M, Rinaldo M, et al. Low glycemic index diet, exercise and vitamin D to reduce breast cancer recurrence (D EDiCa): design of a clinical trial. *BMC Cancer*. 2017;17(1):69.
- 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.
- BI-RADS - ACR BI-RADS® Atlas: breast imaging and reporting data system. 5th edition. 2013. Available from: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/Bi-Rads>
- 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.

- Bolland MJ, Grey A, Gamble GD, Reid IR. Calcium and vitamin D supplements and health outcomes: a reanalysis of the Women's Health Initiative (WHI) limited-access data set. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(4):1144–1149
- Carlberg C, Velleuer E. Vitamin D and the risk for cancer: A molecular analysis. *Biochemical Pharmacology* 196, 2022; 114735
- Chartron E, Firmin N, Touraine C, et al. A Phase II Multicenter Trial on High-Dose Vitamin D Supplementation for the Correction of Vitamin D Insufficiency in Patients with Breast Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Nutrients*. 2021;13(12):4429.
- Charehbili A, Hamdy NA, Smit VT, et al. Dutch Breast Cancer Research Group (BOOG). Vitamin D (25-OH D3) status and pathological response to neoadjuvant chemotherapy in stage II/III breast cancer: Data from the NEOZOTAC trial (BOOG 10-01). *Breast*. 2016;25:69-74.
- Chaudhry M, Sundaram S, Gennings C, Carter H, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog, ILX- 23-7553, enhances the response to adriamycin and irradiation in MCF-7 breast tumor cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001, 47, 429–436.
- 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
- Chiba A, Raman R, Thomas A, et al. Serum Vitamin D Levels Affect Pathologic Complete Response in Patients Undergoing Neoadjuvant Systemic Therapy for Operable Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(2):144-149.
- 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.
- Chlebowski RT. Vitamin D and breast cancer: interpreting current Evidence. *Breast Cancer Res* 2011;13:217.

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.

Clark AS, Chen J, Kapoor S, et al. I-SPY1 Investigators. Pretreatment vitamin D level and response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer on the I-SPY trial (CALGB 150007/150015/ACRIN6657). *Cancer Med* 2014; 3(3):693–701.

Coleman RE, Winter MC, Cameron D, Bell R, Dodwell D, Keane MM, Gil M, Ritchie D, Passos-Colho JL, Wheatley D, Burkinshaw R, Marshall SJ, Thorpe H on behalf of the AZURE (BIG01/04) Investigators. The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1099 – 1105

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, Perou C, Blumenthal G, Blohmer J, Mamounas EP, Bergh J, Semiglazov V, Justice R, Eidtmann H, Paik S, Piccart M, Sridhara R, Fasching PA, Slaets L, Tang S, Gerber B, Geyer Jr CE, Pazdur R, Ditsch N, Rastogi P, Eiermann W, Minckwitz Gv. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014;384(9938):164-72.

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.

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.

- 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.
- 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 Inter* 2010;21(7):1151-4.
- 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.
- Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Moseley JM. 1,25 – dihydroxyvitamin - D receptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979; 2 (8156-8157):1335-1336.
- 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. *BreastCancer Res* 2011;13:R50.
- Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 1993;46:189-90.
- Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupre T, Mesrine S, Boutron-Ruault MC, 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* 2010;19:2341- 2350.
- 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
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Garland FC. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol.* 2009;19(7):468–83.
- 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;22:1736–47.
- 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.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. 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;134:907-22.
- 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* 2010;182(12):E610-8.
- Hershberger PA, Yu WD, Modzelewski RA et al. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7,1043–1051.
- Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014;111(1):23-45.
- Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Management and Research*, 2014;6 253–259
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1678S- 88S.
- Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clin Chem* 2010;56(5):729-31.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al.; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911- 30.

Hossain S; Beydoun MA; Beydoun HA; Chen X; Zonderman AB; Wood RJ. Vitamin D and breast cancer: A systematic review and meta- analysis of observational studies. *Clin Nutr ESPEN*. 2019; 30: 170–184.

Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, Manjer J. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):84.

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.

IARC- International Agency for Research on Cancer. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide [Internet]. Lyon: IARC; 2012 [citado 14 Fev 2018]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

INCA- Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Estimativa 2023: Instituto Nacional do Câncer (INCA). 2022 [cited 2023 Jan 31]. Available from: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>

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.

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

Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *J Nutr* 2006;136(4):887–92.

Kim H, Greenberg JS, Javitt MC. Breast calcifications due to Mönckeberg medial calcific sclerosis. *Radiographics*. 1999;19(5):1401-3.13.

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.

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):2772–2784

Kim JS, Haule CC, Kim JH, et al. Association between Changes in Serum 25-HydroxyvitaminD Levels and Survival in Patients with Breast Cancer Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *J Breast Cancer*. 2018;21(2):134-141.

Korde LA, MD; Somerfield MR, PhD; Carey LA, MD; Crews JR, MD; Denduluri N, MD; Hwang ES, MD; Khan SA, MD; Loibl S, MD, PhD; Morris EA, MD; Perez A, MD; Regan MM, ScD; Spears PA, BS; Sudheendra PK, MD; Symmans WF, MD; Yung RL, MD; Harvey BE, BS; Hershman DL, MD. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer. *ASCO Guideline - J Clin Oncol*, 2021; 39:1485-1505.

Krishnan AV, Swami S, Feldman D. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 2012; 77: 1107-12.

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. *J Intern Med* 2006;260(3):245-54.

Machado M, Almeida-Filho BS, Vespoli HL, Schmitt EB, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Low Pretreatment Serum Concentration of Vitamin D at Breast Cancer Diagnosis in Postmenopausal Women. *Menopause* 2018 *in press*.

Madden JM, Murphy L, Zgaga L, Bennett K. De novo vitamin D supplement use post- diagnosis is associated with breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Jul 23.

- 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.
- Maeda SS, Borba V, Brasílio M, Camargo R, Weber Silva D, Borges J, Bandeira F, Lazaretti-Castro M. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2014;58(5):411-33.
- 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.
- 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.
- Moss SM, Wale C, Smith R, Evans A, Cuckle H, Duffy SW. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality in the UK Age trial at 17 years' follow-up: A randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(9).
- Miyoshi Y, Ando A, Takamura Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *Int J Cancer* 2002; 97:129e32.
- Nahas EAP, Padoani NP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric* 2009;12(5):431-8.
- Naito Y, Kai Y, Ishikawa T, Fujita T, Uehara K, Doihara K, Tokunaga S, Shimokawa M, Ito Y, Saeki T. Chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with breast cancer: a prospective cohort study *Breast Cancer*, 2020; 27:122–128

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.

NAS- National Academy of Sciences–Institute of Medicine–Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride Washington (DC): National Academy Press; 1997.

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.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) in Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2023;4:63-64

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.

O'Brien KM, Sandler DP, Taylor JA, Weinberg CR. Serum vitamin D and risk of breast cancer within five years. *Environmental Health Perspectives* 2017; 125 077004

Ozmen MD V, Ordu MD C, Ilgun MD AS, Unal MD C, Soybir MD G, Erdogan MD Z, Tapan MS TK, Aktepe MD F, Alco MD G, Duymaz MS T, Ozmen MD T. The effects of vitamin D replacement on pathological complete response (pCR) in breast cancer patients receiving neoadjuvant systemic chemotherapy (NAC). *Breast J*. 2021; 27:902–905.

Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-year risks of breast- cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med*. 2017;377:1836-46

Pandolfi F, Franza L, Mandolini C, Conti P. Immune Modulation by Vitamin D: Special Emphasis on Its Role in Prevention and Treatment of Cancer. *Clin Ther* 2017;39:884– 893.

- Pinder MC, Duan Z, Goodwin JS, Hortobagyi GN, Giordano SH. Congestive heart failure in older women treated with adjuvant anthracycline chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:3808-15.
- Poole EM, Shu X, Caan BJ, Flatt SW, Holmes MD, Lu W, Kwan ML, Nechuta SJ, Pierce JP, Chen WY. Postdiagnosis supplement use and breast cancer prognosis in the After Breast Cancer Pooling Project. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139:529-37.
- 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 case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:2655-2660.
- Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *New Engl J Med* 2011;364(3):248-54.
- 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.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, 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;96:53–8.
- Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An update on vitamin D metabolism, *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21 6573
- 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.
- Schmitt EB, Nahas-Neto J, Bueloni-Dias F, Poloni PF, Orsatti CL, Petri Nahas EA. Vitamin D deficiency is associated with metabolic syndrome in postmenopausal women. *Maturitas* 2018;107:97-102.

- Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Ann Intern Med* 2010;152(11):726-32.
- Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(3)
- Simon MS, Beebe-Dimmer JL, Hastert TA, Manson JE, Cespedes Feliciano EM, Neuhaus ML, Ho GYF, Freudenheim JL, Strickler H, Ruterbusch J, Barac A, Chlebowski R, Caan B. Cardiometabolic risk factors and survival after breast cancer in the Women's Health Initiative. *Cancer* 2018;124(8): 1798-1807
- Sperati F, Vici P, Maugeri-Sacca M, Stranges S, Santesso N, Mariani L et al. Vitamin D supplementation and breast cancer prevention: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS ONE* 2013;8(7):e69269
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3).
- Szymiczek A, Lone A, Akbari MR. Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet*. 2021;99(5):613-637.
- Tabár L, Vitak B, Chen THH, Yen AMF, Cohen A, Tot T, et al. Swedish two-county trial: Impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades. *Radiology*. 2011;260(3)
- Tokunaga E, Masuda T, Ijichi H, et al. Impact of serum vitamin D on the response and prognosis in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*. 2022;29(1):156-163.
- 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.

- Valladares T, Simoes R, Bernardo W, Schmitt ACB, Cardoso MRA, Aldrighi JM. Prevalence of hypovitaminosis D in postmenopausal women: a systematic review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2019; 65 (5) 691–698.
- Vashi PG, Trukova K, Lammersfeld CA, Braun DP, Gupta D: Impact of oral vitamin D supplementation on serum 25-hydroxyvitamin D levels in oncology. *Nutr J* 2010, 9:60- 69.
- Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MGet al. The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25- hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 2017;116(8):1092–1110
- Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, et al. Action of 1,25(OH)₂D₃ on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;142:57–65.
- Viala M, Chiba A, Thezenas S, et al. Impact of vitamin D on pathological complete response and survival following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: A retrospective study. *BMC Cancer* 2018, 18, 770.
- Voutsadakis I. Vitamin D baseline levels at diagnosis of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 14, 2021; 16– 26
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. 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;138:241-56.
- Zeichner SB, Koru-Sengul T, Shah N, Liu Q, Markward NJ, Montero AJ, Glück S, Silva O, Ahn ER. Improved Clinical Outcomes Associated With Vitamin D Supplementation During Adjuvant Chemotherapy in Patients With HER2⁺ Nonmetastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2015; 15(1): e1-11.

7. ANEXOS

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, a senhora para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Suplementação de vitamina D em mulheres com câncer de mama submetidas quimioterapia neoadjuvante: ensaio clínico duplo cego, placebo-controlado e randomizado”, que será desenvolvido por mim Michelle Sako Omodei, médica mastologista e pela Professora Eliana Aguiar Petri Nahas da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

Nessa pesquisa estamos estudando o efeito da vitamina D sobre a resposta ao seu tratamento para o câncer de mama. Como a senhora faz seguimento no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas de Botucatu e será submetida à quimioterapia, está sendo convidada a participar desta pesquisa. Informamos que antes da quimioterapia e ao final serão colhidos 10 ml de sangue para dosar a vitamina D. O risco dessa coleta pode ser ardência e dor no local que desaparecerá rapidamente. Esclarecemos que o seu sangue será armazenado apenas durante sua participação para análise das amostras ao final deste estudo e que nenhum sangue ficará guardado para pesquisas futuras. Solicito seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar informações lá contidas sobre a sua saúde e resultados de exames que estão no seu prontuário sobre o câncer de mama.

Informamos que neste estudo as participantes serão divididas em dois grupos, realizado por meio de sorteio onde apenas um grupo receberá a medicação estudada, ou seja, um grupo de mulheres usará a vitamina D na forma de 2 comprimidos ao dia e outro usará apenas 2 comprimidos sem efeito algum, conhecido como placebo, que deverá ser usado durante os 6 meses da quimioterapia. Não são descritos desconfortos após a ingestão da vitamina D ou placebo. A senhora deverá retornar as consultas agendadas para o seu tratamento.

Esclarecemos que os benefícios desse estudo serão para futuras pacientes, quando tivermos o conhecimento dos resultados da pesquisa. O pesquisador responsável estará disponível para responder a quaisquer perguntas sobre sua participação e que senhora tem

o direito de receber informações adicionais sobre o estudo. Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Informamos que a sua participação nesta pesquisa não trará qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento para o câncer de mama e que a senhora continuará com o acompanhamento e assistência ao final do encerramento da sua participação nessa pesquisa junto ao Serviço de Mastologia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Não haverá custo ou gasto para participar desta pesquisa. E você terá direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, em que 01 via será entregue a Senhora devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 11:30 horas e das 14:00 às 17:00 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, EU,.....
 CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

 Pesquisador

 Participante da Pesquisa

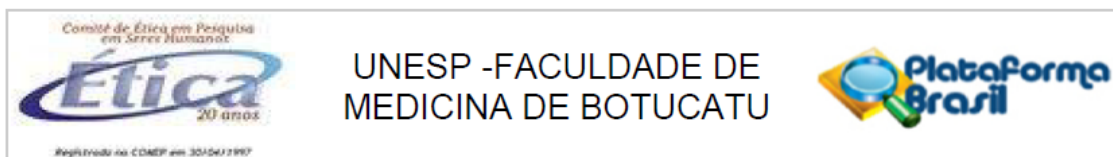
Michelle Sako Omodei e-mail: michelle_omodei@hotmail.com

Rua Atílio Losi, 553- Jardim Paraíso - Botucatu – SP- Fone: 14-981790026

Eliana A. P. Nahas- e-mail: epetri@fmb.unesp.br

Av Primavera s/n – Vale do Sol II - Botucatu - SP – Fone: 14- 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: Suplementação de vitamina D em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante: Ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo-controlado

Pesquisador: Eliana Aguiar Petri Nahas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47632921.3.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.794.317

Apresentação do Projeto:

As informações descritas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram retiradas dos documentos e arquivo - Informações Básicas da Pesquisa.

Vários estudos têm relatado elevada frequência de hipovitaminose D em pacientes com câncer de mama. A relevante função desempenhada pela vitamina D (VD) sobre a massa óssea está bem definida, contudo efeitos extra-ósseos da VD sobre câncer de mama estão sob investigação atual. O estudo proposto procura reconhecer o papel da suplementação da vitamina D (VD) sobre o câncer de mama. O objetivo principal será avaliar a taxa de resposta patológica completa com a suplementação de VD em mulheres na pós-menopausa com câncer de mama, submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Trata-se de ensaio clínico, randomizado, duplo-cego e placebo-controlado para avaliar os efeitos da suplementação de VD. O grupo populacional será constituído de pacientes atendidas no Centro de Avaliação em Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP. Serão incluídas mulheres com idade 45 anos e diagnóstico recente histológico de câncer de mama, elegíveis para quimioterapia neoadjuvante.

Estimou-se tamanho amostral de no mínimo 85 mulheres com câncer de mama e considerando 30% de perda, um total de 110 mulheres. As pacientes serão randomizadas, em sequência de

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

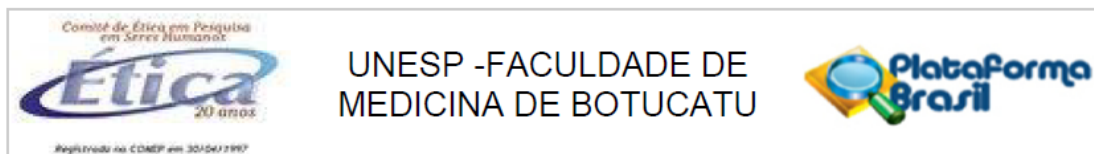
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.794.317

pesquisas, que será apresentado novo TCLE. Ou informar que será armazenado apenas para análise das amostras neste estudo.

RESPOSTA: O TCLE foi corrigido e adequado de acordo com a solicitação do parecer e anexado novamente na Plataforma Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes documentos:

1. Folha de rosto
2. Anuência do HCFMB/FMB
3. projeto completo
4. TCLE aos participantes maiores de 18 anos
5. Anexado Regulamento de Biorrepositório.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado, em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa FMB/UNESP, o Projeto de Pesquisa encontra-se APROVADO.

A coleta de dados deverá ser iniciada após data de aprovação do CEP.

Apresentar relatório final de atividades após finalização da pesquisa.

Att.

CEP-FMB

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório /	biorrepositorio_el.pdf	21/06/2021 10:33:35	SILVANA ANDREA MOLINA LIMA	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609 **E-mail:** cep@fmb.unesp.br

7.3. Anexo III – CONSORT 2010



Lista de informações CONSORT 2010 para incluir no relatório de um estudo randomizado

Seção/Tópico	Item No	Itens da Lista	Relatado na pg No
Titulo e Resumo			
	1a	Identificar no título como um estudo clínico randomizado	_____
	1b	Resumo estruturado de um desenho de estudo, métodos, resultados e conclusões para orientação específica, consulte CONSORT para resumos	_____
Introdução			
Fundamentação e objetivos	2a	Fundamentação científica e explicação do raciocínio	_____
	2b	Objetivos específicos ou hipóteses	_____
Métodos			
Desenho do estudo	3a	Descrição do estudo clínico (como paralelo, factorial) incluindo a taxa de alocação	_____
	3b	Alterações importantes nos métodos após ter iniciado o estudo clínico (como critérios de elegibilidade), com as razões	_____
Participantes	4a	Crítérios de elegibilidade para participantes	_____
	4b	Informações e locais de onde foram coletados os dados	_____
Intervenções	5	As intervenções de cada grupo com detalhes suficientes que permitam a replicação, incluindo como e quando eles foram realmente administrados	_____
Desfechos	6a	Medidas completamente pré-especificadas definidas de desfechos primários e secundários, incluindo como e quando elas foram avaliadas	_____
	6b	Quaisquer alterações nos desfechos após o estudo clínico ter sido iniciado, com as razões	_____
Tamanho da amostra	7a	Como foi determinado o tamanho da amostra	_____
	7b	Quando aplicável, deve haver uma explicação de qualquer análise de interim e diretrizes de encerramento	_____
Randomização:			
Seqüência geração	8a	Método utilizado para geração de seqüência randomizada de alocação	_____
	8b	Tipos de randomização, detalhes de qualquer restrição (tais como randomização por blocos e tamanho do bloco)	_____
Alocação mecanismo de ocultação	9	Mecanismo utilizado para implementar a seqüência de alocação randomizada (como recipientes numerados seqüencialmente), descrevendo os passos seguidos para a ocultação da seqüência até as intervenções serem atribuídas	_____
Implementação	10	Quem gerou a seqüência de alocação randomizada, quem inscreveu os participantes e quem atribuiu as intervenções aos participantes	_____
Cegamento	11a	Se realizado, quem foi cegado após as intervenções serem atribuídas (ex. Participantes, cuidadores, assessores de resultado) e como	_____
	11b	Se relevante, descrever a semelhança das intervenções	_____
Métodos estatísticos	12a	Métodos estatísticos utilizados para comparar os grupos para desfechos primários e secundários	_____
	12b	Métodos para análises adicionais, como análises de subgrupo e análises ajustadas	_____
Resultados			
Fluxo de participantes (é fortemente recomendado a utilização de um diagrama)	13a	Para cada grupo, o número de participantes que foram randomicamente atribuídos, que receberam o tratamento pretendido e que foram analisados para o desfecho primário	_____
	13b	Para cada grupo, perdas e exclusões após a randomização, junto com as razões	_____
Recrutamento	14a	Definição das datas de recrutamento e períodos de acompanhamento	_____
	14b	Dizer os motivos de o estudo ter sido finalizado ou interrompido	_____
Dados de Base	15	Tabela apresentando os dados de base demográficos e características clínicas de cada grupo	_____
Números analisados	16	Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluídos em cada análise e se a análise foi realizada pela atribuição original dos grupos	_____
Desfechos e estimativa	17a	Para cada desfecho primário e secundário, resultados de cada grupo e o tamanho efetivo estimado e sua precisão (como intervalo de confiança de 95%)	_____
	17b	Para desfechos binários, é recomendada a apresentação de ambos os tamanhos de efeito, absolutos e relativos	_____
Análises auxiliares	18	Resultados de quaisquer análises realizadas, incluindo análises de subgrupos e análises ajustadas, distinguindo-se as pré-especificadas das exploratórias	_____
Danos	19	Todos os importantes danos ou efeitos indesejados em cada grupo (observar a orientação específica CONSORT para danos)	_____
Discussão			
Limitações	20	Limitações do estudo clínico, abordando as fontes dos potenciais vieses, imprecisão, e, se relevante, relevância das análises	_____
Generalização	21	Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados do estudo clínico	_____
Interpretação	22	Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	_____
Outras informações			
Registro	23	Número de inscrição e nome do estudo clínico registrado	_____
Protocolo	24	Onde o protocolo completo do estudo clínico pode ser acessado, se disponível	_____
Fomento	25	Fontes de financiamento e outros apoios (como abastecimento de drogas), papel dos financiadores	_____

* Recomendamos fortemente a leitura desta norma em conjunto com o CONSORT 2010. Explicação e Elaboração de esclarecimentos importantes de todos os itens. Se relevante, também recomendamos a leitura das extensões do CONSORT para estudos cluster randomizados, estudos de não-inferioridade e de equivalência, tratamentos não-farmacológicos, intervenções de ervas e estudos pragmáticos. Extensões adicionais estão por vir: para aquelas e até dados de referências relevantes a esta lista de informações, ver www.consort-statement.org.