



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

BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

**Vitamina D e a sobrevida de mulheres na
pós-menopausa tratadas de câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa. Associada Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientadora: Profa. Dra. Heloisa De Luca Vespoli

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Pessoa

Botucatu

2021

BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

**Vitamina D e a sobrevida de mulheres na
pós-menopausa tratadas de câncer de mama**

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. Associada Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientadora: Profa. Dra. Heloisa De Luca Vespoli

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Pessoa

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida Filho, Benedito de Sousa.

Vitamina D e a sobrevida de mulheres na pós-menopausa
tratadas de câncer de mama / Benedito de Sousa Almeida
Filho. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahas

Coorientador: Heloísa De Luca Vespoli

Capes: 40101150

1. Vitamina D. 2. Mamas - Câncer. 3. Pós-menopausa.
4. Taxa de sobrevida.

Palavras-chave: Câncer de mama; Pós-menopausa; Sobrevida;
Vitamina D.

Agradecimentos

À minha família, pela vida, apoio e incentivo durante todas as etapas da minha trajetória acadêmica;

À Professora Eliana Nahás, pela atenção, por se fazer presente, em todas as etapas da execução do projeto, pela disponibilidade, orientação técnica e científica, pelas oportunidades oferecidas e por sempre estar disposta a ouvir e contribuir com palavras que confortam, aconselhando sempre para o caminho melhor;

Aos Professores e Coorientadores Dra. Heloisa Véspoli e Dr. Eduardo Pessoa, e a Dra. Carla Pessoa, meus grandes educadores na área da Mastologia;

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial à Solange Sako, pelo auxílio direto e indireto durante toda a realização deste trabalho;

Aos companheiros de trabalho e de todas as horas, Michelle Sako, Felipe Fonseca, Gildo Gardinalli e Fernando Koenig, por me ajudarem na coleta das amostras e, principalmente, pela grande amizade e descontrações nesta jornada;

Por todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, reitero o meu apreço e a minha eterna gratidão;

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

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas	12
Resumo	14
Abstract	16
1. Introdução	18
2. Objetivos	32
3. Métodos	33
4. Resultados	
4.1. Artigo Original	39
“Negative Impact of Serum Vitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival”	
5. Conclusões	69
6. Referências	70
7. Anexos	
7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	88
7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.	90

LISTA DE ABREVIATURAS

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

25(OH)D - 25 hidroxivitamina D, calcidiol

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

CMIA - *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*

CSS - *Cancer-specific survival*, sobrevida específica do câncer

DFS – *Disease-Free Survival*, sobrevida livre de doença

EAP - Escritório de Apoio à Pesquisa

EUA – Estados Unidos da América

FISH - Hibridação *in situ* fluorescente

HER2 - Fator de crescimento epidérmico humano 2

HR – *Hazard ratio*

IC - Intervalo de confiança

IGF-1 - Fator de crescimento insulino-like

IHQ - Imunohistoquímica

IMC – Índice de massa corpórea

INCA – Instituto Nacional do Câncer

OS – *Overall survival*, sobrevida global

PTH - paratormônio

RE, ER - Receptor de estrogênio

RP, PR - Receptor de progesterona

RR – *Risk ratio*

SAS - *Statistical Analyses System*

TNM - tamanho do tumor, status linfonodal, metástase

UI - Unidades

VD – Vitamina D

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre os valores séricos de vitamina D (VD) no momento do diagnóstico e a sobrevida global (OS), sobrevida livre de doença (DFS) e sobrevida específica do câncer (CSS) em mulheres na pós-menopausa tratadas do câncer de mama.

Métodos: Trata-se de coorte prospectiva de centro único. Foram incluídas pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama invasivo entre 2014 a 2016, com idade ≥ 45 anos e amenorreia ≥ 12 meses, e dosagem de VD no momento do diagnóstico, antes de qualquer tratamento do câncer. As pacientes foram classificadas de acordo com valores séricos de 25-hidroxivitamina-D [25(OH)D] em três grupos: suficiente (≥ 30 ng/mL), insuficiência (entre 20-29 ng/mL) e deficiência (< 20 ng/mL). Foram coletados dados clínicos e anatomopatológicos. O desfecho primário foi OS e os desfechos secundários foram DFS e CSS. Curva de Kaplan-Meier e modelo de regressão de Cox foram empregados para avaliar a associação entre valores de 25(OH)D e a OS, DFS e CSS. As diferenças nas taxas de sobrevida foram avaliadas por razões de risco (HR).

Resultados: Foram incluídas 192 mulheres com média de idade no diagnóstico de $61,3 \pm 9,6$ anos, valor médio de 25(OH)D de 25,8 ng/mL (variando de 12,0-59,2 ng/mL) e seguimento entre 54 – 78 meses. Valores suficientes de VD foram detectados em 65 pacientes (33,9%), insuficientes em 92 (47,9%) e deficientes em 35 (18,2%). Pacientes com insuficiência e deficiência de 25(OH)D apresentaram maior proporção de tumores de alto grau, localmente avançado e com metástase à distância, linfonodos axilares positivos, receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) negativos e índices altos de Ki67 ($p < 0.05$). O tempo médio de sobrevida global foi de $54,4 \pm 20,2$ meses (variação de 9-78 meses) e 51 pacientes (26,6%) foram a óbito. Patients with VD deficiency and insufficiency at diagnosis had significantly worse OS, DFS and CSS compared to patients

with sufficient values ($p < .0001$). Fatores que influenciaram significativamente a sobrevida foram: idade, estágio e tamanho do tumor, status linfonodal, RE e RP e valores de VD. Após ajustes para essas variáveis, pacientes com valores de 25(OH)D deficientes ou insuficientes no momento do diagnóstico apresentaram risco significativamente maior de mortalidade global (HR 4,65, IC 95% 1,65-13,12), maior risco de recorrência da doença (HR 6,87, IC 95% 2,35-21,18) e maior risco de morte pela doença (HR 5,91, IC 95% 1,98 -17,60) que aquelas com valores suficientes.

Conclusão: Em mulheres na pós-menopausa tratadas para câncer de mama, a deficiência de vitamina D sérica 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 vitamina D, 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).

Abstract

Objective: To evaluate the association between serum vitamin D (VD) levels at diagnosis and overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and cancer-specific survival (CSS) in postmenopausal women treated for breast cancer.

Methods: This is a single-center prospective cohort. The study included patients newly diagnosed with invasive breast cancer between 2014 and 2016, aged ≥ 45 years and in amenorrhea for ≥ 12 months, and VD assessment at the time of diagnosis, before any cancer treatment. Patients were classified into three groups according to serum levels of 25-hydroxyvitamin-D [25(OH)D]: sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (between 20-29 ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL). Clinical and anatomopathological data were collected. The primary outcome was OS and secondary outcomes were DFS and CSS. Kaplan-Meier curve and Cox regression model were used to assess the association between 25(OH)D levels and OS, DFS and CSS. Differences in survival were evaluated by hazard ratios (HR).

Results: The study included 192 women with a mean age of 61.3 ± 9.6 years at diagnosis, mean 25(OH)D levels of 25.8 ng/mL (ranging from 12.0 to 59.2 ng/mL) and follow-up period between 54-78 months. Sufficient VD levels were detected in 65 patients (33.9%), insufficient in 92 (47.9%) and deficient in 35 (18.2%). Patients with 25(OH)D insufficiency and deficiency had a larger proportion of high-grade tumors, locally advanced and with distant metastasis, positive axillary lymph nodes, negative estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) and higher Ki67 index ($p < 0.05$). The mean overall survival time was 54.4 ± 20.2 months (range 9-78 months) and 51 patients (26.6%) died during the study period. Patients with VD deficiency and insufficiency at diagnosis had significantly lower OS, DFS and CSS compared to patients with sufficient values ($p < .0001$). After adjustment for clinical and tumoral prognostic factors, patients with serum 25(OH)D levels considered deficient at the time of diagnosis had a

significantly higher risk of global death (HR 4.65, 95% CI 1.65-13.12), higher risk of disease recurrence (HR 6.87, 95% CI 2.35-21.18) and higher risk of death from the disease (HR 5.91, 95% CI 1.98-17.60) than the group with sufficient 25(OH)D levels.

Conclusion: In postmenopausal women treated for breast cancer, serum vitamin D deficiency at the time of diagnosis was associated with lower overall survival, disease-free survival, and cancer specific survival compared to patients with sufficient vitamin D concentration, regardless prognostic factors of breast cancer (age, stage and size of the tumor, lymph node status, hormone receptors and breast cancer subtypes).

1. Introdução

1.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. O câncer de mama foi o câncer mais comumente diagnosticado em 2020, com cerca de 2,3 milhões de novos casos, o que representa 25% de todos os tipos de cânceres diagnosticados em mulheres. Como a quinta principal causa de mortalidade por câncer, foi responsável por 1 em cada 6 mortes por câncer em mulheres e 685.000 mortes no geral (6,9%), ocupando o primeiro lugar em incidência em 159 países e o primeiro em mortalidade em 110 países no ano de 2020 (ACS, 2021). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 66.280 casos novos de câncer de mama no Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,6 casos novos a cada 100 mil mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras, correspondendo a 29,7% dos casos de câncer em mulheres (INCA, 2020)

Além dos fatores relacionados a vida reprodutiva da mulher estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama, os fatores potencialmente modificáveis associados ao aumento de risco incluem ganho de peso após os 18 anos, obesidade (para câncer de mama na pós-menopausa), terapia hormonal da menopausa, consumo de álcool e inatividade física (ACS, 2021). Contudo, a idade é o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente próximo aos 50 anos, e posteriormente, ocorrem de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é atribuída ao início da menopausa. De fato, cerca de 70% dos casos de câncer de mama ocorrem em mulheres acima dos 50 anos (INCA, 2020). No Brasil, dados do estudo AMAZONA, a mediana da idade no diagnóstico câncer de mama foi entre 53 a 55 anos (Simon et al, 2019).

A prevenção primária dessa neoplasia não é possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Até o momento, o rastreamento mamográfico é a principal ação para diagnóstico precoce do câncer de mama e, conseqüentemente, na redução da mortalidade pela doença (Tabár et al, 2011). O *American Cancer Society* recomenda que: 1- mulheres entre 40 e 44 anos com risco médio de desenvolver câncer de mama tenham a opção de realizar a mamografia anual; 2- mulheres entre 45 e 54 anos realizem mamografia anual; 3- mulheres com 55 anos ou mais façam a mamografia bienal ou continuem a mamografia anual (ACS, 2021). A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM), a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e o Colégio Brasileiro de Radiologia (CBR) sugerem o rastreamento mamográfico anual a partir do 40 anos, embora o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e o Sistema Único de Saúde (SUS) indiquem o início a partir dos 50 anos com periodicidade bienal (Urban et al, 2017; INCA, 2020). Tabár *et al.* avaliaram 133 mil mulheres, randomizadas em dois grupos: com ou sem rastreamento mamográfico preconizado. Após 29 anos de seguimento, o estudo concluiu que o rastreamento mamográfico diminuiu o risco de morte por câncer de mama em 30% (Tabár et al, 2011).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente pelo diagnóstico em estádios avançados (INCA, 2020). De acordo com dados do *American Cancer Society*, a taxa de sobrevida em 5 e 10 para o câncer de mama são 90% e 84%, respectivamente (ACS, 2021). Em relação ao câncer de mama na América do Sul e Central, o estudo CONCORD-2 observou aumento nas taxas de sobrevida câncer-específica entre 1995-1999 e 2005-2009, principalmente no Brasil, de 78% para 87%, respectivamente (Alemani et al, 2014).

Em relação à sobrevida global em 10 anos no Brasil, avaliando informações coletadas em registros de base populacional, a sobrevida para o câncer de mama entre 1998 e 2000 era de 41,5% e entre 1995 e 2003 de 57,8% (Nunes, 2011).

Dados do estudo AMAZONA demonstraram que mulheres brasileiras têm maior risco de serem diagnosticadas com câncer de mama em estágio avançado e em idade mais jovem do que as mulheres em países de alta renda (Simon et al, 2019). Nesse mesmo estudo, as taxas de sobrevida global no Brasil em 5 anos para câncer de mama em estágio inicial foram de 96,8% para o estágio I e 94,2% para o estágio II. No tumor localmente avançado (estádio III), a sobrevida global em 5 anos foi de 70,5%. Os subtipos triplo-negativo e HER-2-positivo foram associados a resultados inferiores em termos de sobrevida global em pacientes com câncer de mama em estágio II ou III (Simon et al, 2019). Mais recentemente, uma coorte brasileira com dados de 1113 pacientes com câncer de mama na região sudeste, a sobrevida global em 10 anos observada foi de 83,8% (Caleffi et al, 2020). Estes dados, parecem mostrar a disparidade que existe entre as regiões do Brasil, um país de dimensões continentais, possivelmente em decorrência da ausência de um programa eficaz de rastreamento populacional e pela cobertura mamográfica inadequada no Brasil.

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). É adquirida pela dieta pela ingestão de alimentos ricos em óleo de peixe, fígado e ovos. Entretanto, a maior fonte decorre da ativação na pele (derme e epiderme). A partir da exposição aos raios UVB ocorre a ativação na pele (derme

e epiderme), do composto 7-deidrocolesterol que se transforma em vitamina D₃, sendo armazenada e liberada pelas células de gordura (Rosen, 2011). Essa forma, cuja ativação não é metabólica, necessita das funções hepáticas e renais preservadas. É transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma hidroxilação no carbono 25, pelo citocromo P450 R21, tornando-se 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol, forma inativa da VD. Para se tornar ativa, a 25(OH)D necessita ainda de uma hidroxilação na posição 1, pelo citocromo P450 27B1, nos túbulos proximais dos rins, sob a ação da enzima 1 α -hidroxilase, transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos biológicos (Heaney et al, 2011; Roth et al, 2019).

O nome 'vitamina D' é um equívoco histórico. A forma ativa, o calcitriol, pode ser considerada um hormônio, pois é sintetizado em humanos, e submetido a regulação autócrina, interagindo com receptor nuclear. A VD tem importante e reconhecido papel na mineralização óssea, na concentração de cálcio/fósforo e na regulação da paratireoide (Rosen, 2011; Bouillon et al, 2019). A forma ativa da VD regula a transcrição de número expressivo de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea. A VD também modula a transcrição de células do ciclo protéico que diminuem a proliferação celular e aumentam sua diferenciação (precursores de osteoclastos, enterócitos e queratinócitos). Essa propriedade pode explicar a ação da VD na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele (Rosen, 2011; Roth et al, 2019).

A 1,25(OH)₂D, produzida no rim, é secretada na circulação sanguínea, ligada à proteína de ligação à vitamina D (VDBP) e, em seguida, transportada para órgãos-alvo, onde induz respostas genômicas e não-genômicas através da interação com o receptor nuclear de vitamina D (VDR). A sinalização da VD por meio do VDR tem um papel

fisiológico importante na homeostase do cálcio e em outros processos teciduais (Voutsadakis, 2020). Muitas células e tecidos expressam o citocromo P450 27B1 assim como VDR, o que implica que a conversão local de 25(OH)D para 1,25(OH)₂D, a forma ativa, possa ocorrer em vários tecidos (Bouillon et al, 2019). Em tecidos cancerígenos, a VD tem efeitos anticâncer que são mediados por meio de VDR atuando como um fator de transcrição e regulando várias dezenas de genes com ação antiproliferativa, pró-apoptótica e de diferenciação celular (Shao et al, 2012).

A dosagem de 25(OH)D é considerada o melhor marcador para se avaliar e monitorizar o estado nutricional de VD no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais (Holick, 2010; Roth et al, 2019; Amrein et al, 2020). 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 como valores inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L) (Holick et al., 2011). No Brasil, segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, valores superiores a 20 ng/mL são considerados desejáveis para população saudável com idade até 60 anos, ao passo que valores entre 30-60 ng/mL são recomendados apenas para grupos de risco (Maeda et al, 2014).

Entretanto, número crescente de estudos sugere que são necessários valores acima de 30ng/mL para garantir melhor disponibilidade de VD (Dawson-Hughes et al., 2010; Holick, 2010; Amrein et al, 2020). 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; Bouillon et al, 2019). Na insuficiência de VD evidencia-se elevação do PTH circulantes, traduzindo um hiperparatireoidismo secundário, com redução da fração ativa de 1,25(OH)₂D, que aumenta a reabsorção óssea

(Holick, 2010; Bouillon et al, 2019). A deficiência da VD pode ser confirmada pela aferição plasmática de 25(OH)D, devido à sua meia-vida longa (15 dias), estabilidade relativa, concentração abundante no sangue e capacidade de resposta a suplementação de VD (Roth et al, 2019). Por outro lado, as concentrações de 1,25(OH)₂D estão usualmente dentro dos valores normais de referência ou mesmo aumentada em pacientes deficientes/insuficientes, razão pela qual não são utilizadas como referência na prática clínica diária (Holick, 2010).

Reconhece-se que a deficiência de VD é condição médica frequente em todo mundo (Hilger et al, 2014; Amrein et al, 2020). Mesmo moradores de regiões próximas a linha do equador, com alta incidência de sol, apresentam valores inadequados de VD. Importante 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). 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; Schmitt et al 2018). Estudo clínico de corte transversal avaliou a ocorrência da hipovitaminose D em 463 mulheres na pós-menopausa (idade entre 45-75 anos), sem suplementação de VD, atendidas no Ambulatório de Climatério e Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Valores suficientes de 25(OH)D foram detectados em 148 pacientes (32%), insuficientes em 151 (32,6%) e deficientes em 164 (35,4%) (Schmitt et al, 2018). Entre as prováveis causas da hipovitaminose D em mulheres na pós-menopausa 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 (Maeda et al 2014).

Sabendo-se que as fontes dietéticas de VD são inadequadas, é interessante que mulheres na pós-menopausa recebam suplementação para garantir a saúde óssea (Holick, 2010; Eastell et al, 2019). 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 2000 UI/dia pode ser necessário para atingir valor recomendável em alguns pacientes (Dawson-Hughes et al., 2010). Em contraste, o *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). A suplementação diária de 1000UI de VD (dentro de um período mínimo de seis meses) aumenta os valores séricos em torno de 10 ng/mL, dose esta sugerida para pacientes com idade inferior a 65 anos e com idade superior deveriam receber dose diária de 2000 UI (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 50.000 UI/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

e elevar valores séricos de 25(OH)D acima de 30ng/ml de modo a aproveitar ao máximo os benefícios da VD (Bouillon et al, 2019; Roth et al, 2019).

1.3. Vitamina D e o Câncer de mama

A vitamina D parece desempenhar papel no desenvolvimento do câncer de mama, atuando através da ligação ao receptor de vitamina D (VDR), que é expresso no tecido mamário (Mishra et al, 2013; Welsh, 2018). Várias pesquisas pré-clínicas demonstraram que seu ligante, a 1,25(OH)₂D₃, modula o desenvolvimento normal da glândula mamária e a sensibilidade à carcinogênese (Welsh, 2018). O VDR foi identificado pela primeira vez em linhagem de células do câncer de mama em 1979 (Eisman et al, 1979). A ativação de VDR pela 1,25(OH)₂D₃ resulta em heterodimerização com o receptor de retinóide X e ligação a elementos de resposta cognatos de VD em genes alvos que participam na diferenciação celular, crescimento celular, apoptose, inflamação e modulação imune (Welsh et al, 2003; Lopes et al, 2012; Sheng et al, 2018). Em estudos experimentais em câncer de mama, a VD diminui a proliferação celular, induz a apoptose, diminui a invasão e induz a diferenciação de células cancerosas (Welsh, 2011). As células cancerosas sofrem alterações fisiológicas, que diminuem a sua susceptibilidade à VD. As células malignas têm níveis intracelulares diminuídos de 1 α -hidroxilase (enzima ativadora codificada pelo CYP27B1) em comparação com as células normais, o que diminui a produção intracelular de VD. Além disso, há uma maior degradação da VD nas células tumorais, causando resistência aos efeitos antitumorais da VD (Thanasitthichai et al, 2015).

O ligante VD-VDR exibe atividade antiproliferativa em muitos tipos de tumor, assim como os membros da família p53 ativada, através da indução do bloqueio do ciclo

celular, da senescência, da diferenciação e de apoptose (Feldman et al, 2014; Welsh, 2018). Evidências suportam ligação cruzada entre as vias da VD e da sinalização p53. Todos os três membros da família p53 - p53, p63, p73 - participam da ativação do gene VDR, enquanto VDR regula vários genes que também são alvos das proteínas da família p53, incluindo p21, Bax, Bcl-2 e MDM2 (Kommagani et al, 2007; Feldman et al, 2014). Alguns estudos têm demonstrado redução na expressão do VDR em células de câncer de mama em comparação a células normais da mama, devido a polimorfismos do gene do VDR (Engel et al, 2012; Lopes et al, 2012; Abd-Elsalam et al, 2015; Francis et al, 2021). No câncer de mama a expressão do VDR varia de 58% a 80%, com relatos de pacientes portadoras de tumores VDR positivos apresentarem maior sobrevida livre de doença (Mishra et al, 2013). Recente estudo demonstrou que a alta expressão de VDR em tumores de mama invasivos associou-se a fatores de bom prognóstico e a menor risco de morte por câncer de mama (Huss et al, 2019).

A forma biologicamente ativa da VD, a 1,25(OH)₂D₃, regula a diferenciação, proliferação e apoptose das células epiteliais, dando peso à evidência científica que associa a deficiência de VD à incidência e mortalidade pelo câncer de mama (Sheng et al, 2018). A deficiência de VD é frequente em pacientes com câncer de mama e algumas evidências sugerem que valores reduzidos de 25(OH)D aumentam o risco de desenvolvimento e progressão da doença (Welsh, 2018). Crew *et al* identificaram que 74% das pacientes com câncer de mama apresentavam deficiência de VD (<20 ng/ml) e que apesar da prescrição de 400UI de VD/dia, poucas pacientes (<15%) atingiram valores desejáveis de VD (>30 ng/mL) (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 (Chlebowski, 2011).

Recente estudo realizado no Centro de Avaliação em Mastologia do HCFMB, avaliando 209 mulheres com câncer de mama comparadas a 418 mulheres (controle), com idade entre 45-75 anos, observou que as pacientes com câncer de mama apresentaram significativamente 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%, 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). Em 2020 foi realizada uma revisão sistemática e meta-análise de estudos que relatavam os valores séricos de VD em pacientes com câncer de mama diagnosticado recentemente. Um total de 25 estudos (10 com controles e 15 sem controles) forneceram dados sobre os desfechos de interesse. No grupo de pacientes com câncer de mama, 67,4% apresentaram valores de 25(OH)D abaixo de 30 ng/mL, enquanto no grupo controle esta porcentagem foi 33,7% ($p<0.05$). Os autores concluem que alta prevalência de hipovitaminose D é observada em pacientes com câncer de mama recém-diagnosticado e pode estar relacionada com o desenvolvimento ou a progressão do câncer de mama (Voutsadakis et al, 2020).

Resultados de estudos epidemiológicos que examinaram a associação entre valores circulantes de 25(OH)D e o risco de câncer têm sido inconsistentes (Voutsadakis et al, 2020). Alguns estudos prospectivos não demonstraram associação (McCullough et al, 2009; Almquist et al, 2010; Eliassen et al, 2011; Scarmo et al, 2013), enquanto outros encontraram associação inversa significativa (Rejnmark et al, 2009; Engel et al, 2010; O'Brien et al, 2017). Scarmo *et al* conduziram estudo caso-controle com duas coortes prospectivas: a *New York University Women's Health Study*, que envolveu 14.274 mulheres saudáveis (34 a 65 anos idade) de uma clínica de mamografia da cidade de Nova

York; e a *Northern Sweden Mammary Screening Cohort* com 28.800 participantes de um programa de rastreamento do câncer de mama na Suécia. Foram incluídos 1585 casos novos de câncer de mama para 2940 controles. Não houve associação entre os valores circulantes de 25(OH)D e risco global do câncer de mama (Scarmo et al, 2013). Por outro lado, o estudo de coorte francês E3N demonstrou efeito protetor da VD no risco de câncer de mama em mulheres abaixo dos 53 anos de idade. Os investigadores sugeriram que a VD pode atuar inibindo o fator de crescimento *insulino-like* (IGF-1), que tem ação proliferativa e que diminui com a idade; assim seria esperado um efeito anticarcinogênico mais forte da VD em mulheres na pré-menopausa (Engel et al, 2010). E o estudo de coorte norte-americana com mais de 50.000 mulheres com idade entre 35-74 encontrou associação entre níveis séricos mais baixos de 25(OH)D e maior risco de câncer de mama na pós-menopausa ao longo de um acompanhamento de 5 anos (O'Brien et al, 2017).

A concentração de VD poderia ser considerada um fator prognóstico em pacientes com câncer de mama (Kim et al, 2011, Mohr et al, 2012; Almeida-Filho et al, 2017; Welsh, 2018). Goodwin et al. observaram que mulheres com valores deficientes de VD apresentaram maior risco de recorrência e morte pelo câncer de mama quando comparadas as mulheres com valores adequados de VD (Goodwin et al, 2009). Estudo de revisão sistemática avaliou o papel da VD sobre o prognóstico em pacientes com câncer de mama. Entre janeiro de 2009 e setembro de 2013, seis estudos investigaram as associações dos níveis de 25(OH)D com a sobrevida global em pacientes com câncer de mama. As concentrações de 25(OH)D circulantes elevadas foram associadas com significativa melhora na sobrevida em dois estudos, com tendência a melhor sobrevida em outros dois e nenhuma associação nos últimos dois. Esta revisão destacou a necessidade de mais estudos avaliando o papel da VD no prognóstico entre pacientes com câncer

(Toriola et al, 2014). Outra meta-análise foi realizada a partir de cinco estudos que avaliaram a relação entre a VD e a mortalidade pelo câncer de mama. Valores plasmáticos elevados de 25(OH)D estiveram associados com menores taxas de mortalidade após o diagnóstico de câncer de mama. Pacientes no quartil mais alto de 25(OH)D tiveram aproximadamente metade da taxa de mortalidade por câncer de mama quando comparadas aquelas no menor quartil. Os autores sugerem que valores de 25(OH)D deveriam ser restaurados ao seu valor normal (30-80 ng/mL) em todas as pacientes com câncer de mama. Entretanto mais estudos clínicos devem ser iniciados para confirmar esta associação (Mohr et al, 2014).

Recente estudo de coorte norte-americana envolvendo 1666 pacientes com câncer de mama encontrou que após 8 anos de seguimento as concentrações séricas de 25(OH)D foram menores em mulheres com tumores em estágio avançado e com tumor triplo-negativo. Os valores de 25(OH)D também foram inversamente associados aos riscos de progressão da doença e morte. Em comparação com o tercil mais baixo, as mulheres com o tercil mais alto de 25(OH)D tiveram sobrevida geral superior. Esta associação permaneceu após o ajuste para fatores prognósticos clínicos (Yao et al, 2016). De forma similar, estudo avaliando mulheres egípcias com câncer de mama não-metastático demonstrou que a deficiência de VD impactou negativamente na sobrevida livre de doença após 30 meses de seguimento (Ismail et al, 2018). Em 2020, estudo dinamarquês com 2510 mulheres evidenciou que, após um seguimento médio de 5,59 meses, valores baixos de 25(OH)D foram associados a menor sobrevida global e livre de doença (Kanstrup et al, 2020). Por outro lado, Mizrak Kaya et al., investigando o efeito dos valores de VD no prognóstico de câncer de mama ressecável, não conseguiram estabelecer qualquer relação entre a VD e as características do tumor ou a sobrevida das pacientes (Mizrak Kaya et al, 2017).

Uma meta-análise explorou as possíveis relações dose-resposta entre os valores de VD e a sobrevida geral em pacientes com câncer de mama, permitindo diferenças entre as populações dos vários estudos. Seis estudos com um número total de 5.984 pacientes foram identificados. Os valores médios de 25(OH)D nos estudos variaram de 23,3 nmol/L (9,3 ng/mL) a 187,5 nmol/L (75 ng/mL). Utilizando análise de dose-resposta, o HR (*hazard ratio*) combinado para a sobrevida global foi de 0.99 ($p < 0.001$). Partindo de um limite de 23,3 nmol/L (9,3 ng/mL) para um incremento de 10 nmol/L, 20 nmol/L, ou 25 nmol/L nos valores circulantes de 25(OH)D, o risco de mortalidade geral por câncer de mama diminuiu 6%, 12% e 14%, respectivamente. Os resultados sugerem que há uma relação dose-resposta linear significativa entre os valores circulantes de 25(OH)D e a sobrevida geral em pacientes com câncer de mama. No entanto, estudos de coorte prospectivos e ensaios clínicos mais bem desenhados são necessários para confirmar esses achados (Hu et al, 2017). No Brasil não temos estudos prospectivos avaliando o impacto dos valores de VD ao diagnóstico sobre o prognóstico de pacientes com câncer de mama.

1.4. Justificativa

Com a demonstração do efeito anticarcinogênico da VD, vários estudos foram realizados avaliando seu efeito sobre o risco de câncer de mama e o papel da suplementação da vitamina D. Entretanto, o impacto das concentrações séricas de VD no momento do diagnóstico e o prognóstico de pacientes com câncer de mama é menos analisado, com alguns estudos mostrando pior sobrevida em pacientes com hipovitaminose D e outros não demonstrando uma relação causal entre valores séricos de

25(OH)D e a letalidade do câncer de mama. Pelo número crescente de sobreviventes do câncer de mama e a alta prevalência de deficiência de VD entre pacientes com câncer, uma avaliação do papel da VD no prognóstico entre pacientes com câncer é essencial.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Principal

Investigar a associação entre os valores séricos de vitamina D (VD) no momento do diagnóstico do câncer de mama e a sobrevida em mulheres na pós-menopausa.

2.2. Objetivo Específico

Avaliar a associação entre os valores séricos de vitamina D (VD) e a sobrevida global, a sobrevida livre de doença e a sobrevida específica pelo câncer em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama.

3. Métodos

Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de uma coorte prospectiva de centro único. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Centro de Avaliação em Mastologia (CAM) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP. Foram incluídas as pacientes com: 1- diagnóstico histológico de câncer de mama invasivo entre 2014 a 2016; 2- idade ≥ 45 anos e data da última menstruação há pelo menos 12 meses; 3- dosagem sérica de VD no

momento do diagnóstico do câncer de mama. Foram excluídas mulheres: 1- usuárias de doses farmacológicas de VD; 2- câncer de mama bilateral; 3- em terapia neoadjuvante; 4- portadoras de câncer prévio. Todas as voluntárias participantes do estudo foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos e confidencialidade dos dados, sem quaisquer prejuízos para as mesmas. As pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) de acordo com exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB-UNESP (CAAE: 71399117.2.0000.5411) (Anexo II).

Dados Clínicos

Inicialmente, no dia da consulta foram coletados por meio de entrevista os seguintes dados clínicos: idade no momento do diagnóstico, idade da menopausa, tempo de menopausa, paridade, tabagismo atual, uso prévio de terapia hormonal da menopausa e histórico de doenças crônicas (hipertensão, diabetes). Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura e índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$). Para mensuração do peso, foi utilizada balança antropométrica eletrônica microdigital tipo plataforma (Filizola[®], Brasil), com capacidade de 150 kg com precisão 0,1 Kg e 0,5 cm (peso e estatura, respectivamente), 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* para classificação das pacientes, conforme o IMC: $\leq 24,9 \text{ kg/m}^2$ normal, de 25 a 29,9 kg/m^2 sobrepeso e $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ obesidade (WHO, 2000).

Análise da vitamina D

Foi realizada avaliação sérica da 25(OH)D pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMB. A 25(OH)D foi processada pelo método da quimiluminescência automatizada por micropartículas (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMIA) com *Architect 25-OH Vitamin D assay Kit*, pelo analisador Architect® i2000 (Abbott®, Santa Clara, California, USA). A sensibilidade analítica foi de 1,9 ng/mL e o coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi < 10%, segundo descrição do Kit. O intervalo de referência é de 0.0-160.0 ng/mL, segundo o método. Foram considerados suficientes valores ≥ 30 ng/mL, insuficiência de 20 a 29 ng/mL e deficiência < 20 ng/mL (Bischoff-Ferrari et al, 2006; Holick et al., 2011).

Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir dos relatórios dos prontuários das pacientes foram obtidos: diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau, estágio do tumor, status dos receptores hormonais (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e a atividade proliferativa epitelial (Ki67). O envolvimento linfonodal foi avaliado após a cirurgia ou pela avaliação do linfonodo sentinela. O diâmetro do tumor foi obtido a partir dos laudos histopatológicos e, graduados histologicamente em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), de acordo com o método proposto por Elston & Ellis (1993), que utiliza como critério os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico (Rampaul, 2001). 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),

estádio 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 e M1).

O perfil imunohistoquímico (RE, RP, HER e Ki67) foi determinado pela técnica de imunohistoquímica (IHQ) utilizando blocos de tecido, segundo recomendação dos Kits empregados (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). Os ensaios de IHQ visam demonstrar a presença e localização de proteínas em secções de tecido, por meio de análise semi-quantitativa quanto a positividade ou negatividade do marcador. A coloração para IHQ é realizada em secções finas de tecido fixado em formalina que estão sujeitas a vários métodos de recuperação de antígenos. Isto é seguido por incubação do tecido com um anticorpo primário dirigido contra a proteína/antígeno alvo. Uma vez que os anticorpos são altamente específicos, o anticorpo irá ligar-se apenas à proteína de interesse na secção de tecido. A interação anticorpo-antígeno é então visualizada utilizando detecção cromogênica, em que uma enzima conjugada ao anticorpo cliva um substrato para produzir um precipitado colorido no local da proteína, denominada detecção fluorescente, sendo visualizado pela microscopia de fluorescência (Wells et al, 1984)

Após avaliação imunohistoquímica, os tumores foram agrupados em nenhum, baixa, média ou alta expressão de RE, RP e Ki67, utilizando intervalos de 0-1%, 2-10%, 11-50% e 51-100% de núcleos positivos. Para os receptores de estrogênio e progesterona foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais (Hammond et al, 2010). Para o Ki67, como não existe consenso na literatura em relação à positividade, foi considerado alto se mais de 20% das células tumorais estivessem marcadas (Goldhirsch et al, 2013). Para análise do HER2 foi utilizado

critérios da ASCO (Wolff et al, 2014), sendo 0 sem marcação de membrana, 1+ marcação parcial de membrana, 2+ marcação completa de membrana, fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais e 3+ marcação completa e intensa de membrana em mais de 10% das células tumorais. A amplificação do gene HER2 foi testada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) quando a imunohistoquímica resultou em escore 2+ (Dowsett et al, 2003). O anatomopatológico e o perfil imunohistoquímico foram realizados pelo Serviço de Patologia da FMB-Unesp.

Após esta avaliação, os cânceres de mama foram categorizados em quatro subtipos moleculares com base em perfis de imuno-histoquímica 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)

Análise Estatística

A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados segundo grupo de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama de acordo os valores séricos de 25(OH)D em suficiente (n=65), insuficiente (n=92) e deficiente (n=35). Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem para variáveis qualitativas. Foram analisadas as seguintes variáveis: 1- clínicas (idade, paridade, idade e tempo de menopausa, história de uso de terapia hormonal da menopausa, hipertensão, diabetes, tabagismo e IMC); 2- Dosagem sérica de 25(OH)D; 3- dados anatomopatológicos e de imunohistoquímica do câncer de mama (tipo e grau histopatológico, tamanho do tumor, estágio do tumor, linfonodo axilar, RE, RP, HER2 e Ki-67). Para comparação entre os grupos em relação às características quantitativas foi empregado ANOVA e a

Distribuição Gama (variáveis assimétricas). Na associação entre a frequência das características categóricas foi empregado o Teste do Qui-quadrado.

A medida de desfecho primário foi a sobrevida global (*Overall Survival, OS*) e como desfechos secundários a sobrevida livre de doença (*Disease Free Survival, DFS*) e a sobrevida específica do câncer (*Cancer-Specific Survival, CCS*). A sobrevida global foi definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico e a data do óbito (relacionado ao câncer de mama ou óbito por qualquer causa). A sobrevida livre de doença foi definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico e a data da primeira recidiva ou óbito, o que ocorrer primeiro. Recidiva foi considerada como qualquer recidiva tumoral local, regional ou a distância. A sobrevida específica do câncer foi definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico e a data do óbito relacionado ao câncer de mama. Os dados de seguimento foram coletados até 31 de dezembro de 2020.

Para calcular os desfechos de sobrevida o método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foram realizados para todas as pacientes. Um modelo de risco proporcional de Cox foi empregado para analisar a associação entre 25(OH)D e a sobrevida. Análises univariadas e multivariadas foram empregadas para estimar as razões de risco (HR) e intervalos de confiança de 95% (IC de 95%). Variáveis clínicas, anatomopatológicas e de imunohistoquímica foram examinadas por meio de análise univariável. A análise multivariável foi ajustada para idade, IMC, tamanho, tipo e grau do tumor, estágio tumoral, status axilar e dados da imunohistoquímica. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System (SAS)*, versão 9.4, 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

Negative Impact of Serum Vitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival

Almeida-Filho BS, Vespoli HDL, Carvalho-Pessoa E, Nahas EAP

Abstract

Objective: To evaluate the association between serum vitamin D (VD) levels at diagnosis and overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and cancer-specific survival (CSS) in postmenopausal women treated for breast cancer.

Methods: This is a single-center prospective cohort. The study included patients newly diagnosed with invasive breast cancer between 2014 and 2016, aged ≥ 45 years and in amenorrhea for ≥ 12 months, and VD assessment at the time of diagnosis, before any cancer treatment. Patients were classified into three groups according to serum levels of 25-hydroxyvitamin-D [25(OH)D]: sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (between 20-29

ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL). Clinical and anatomopathological data were collected. The primary outcome was OS and secondary outcomes were DFS and CSS. Kaplan-Meier curve and Cox regression model were used to assess the association between 25(OH)D levels and OS, DFS and CSS. Differences in survival were evaluated by hazard ratios (HR).

Results: The study included 192 women with a mean age of 61.3 ± 9.6 years at diagnosis, mean 25(OH)D levels of 25.8 ng/mL (ranging from 12.0 to 59.2 ng/mL) and follow-up period between 54-78 months. Sufficient VD levels were detected in 65 patients (33.9%), insufficient in 92 (47.9%) and deficient in 35 (18.2%). Patients with 25(OH)D insufficiency and deficiency had a larger proportion of high-grade tumors, locally advanced and with distant metastasis, positive axillary lymph nodes, negative estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) and higher Ki67 index ($p < 0.05$). The mean overall survival time was 54.4 ± 20.2 months (range 9-78 months) and 51 patients (26.6%) died during the study period. Patients with VD deficiency and insufficiency at diagnosis had significantly lower OS, DFS and CSS compared to patients with sufficient values ($p < .0001$). After adjustment for clinical and tumoral prognostic factors, patients with serum 25(OH)D levels considered deficient at the time of diagnosis had a significantly higher risk of global death (HR 4.65, 95% CI 1.65-13.12), higher risk of disease recurrence (HR 6.87, 95% CI 2.35-21.18) and higher risk of death from the disease (HR 5.91, 95% CI 1.98-17.60) than the group with sufficient 25(OH)D levels.

Conclusion: In postmenopausal women treated for breast cancer, serum vitamin D deficiency at diagnosis was independently associated with lower overall survival, disease-free survival and cancer-specific survival compared to patients with sufficient serum levels of vitamin D.

Keywords Vitamin D; 25(OH)D; survival rate; breast cancer; prognosis

Introduction

Breast cancer is the type of cancer that mostly affects women in the world, both in developing and developed countries; with about 2.3 million new cases in 2020, comprising 25% of all cancers diagnosed in women.¹ In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) estimates 66,280 new cases of breast cancer, for each year of the 2020-2022 triennium.² According to data from the American Cancer Society, the 5- and 10-year relative survival rates for women with invasive breast cancer are 90% and 84%, respectively.¹ Despite being considered a relatively good prognosis cancer if diagnosed and treated in a timely manner, the AMAZONA study demonstrated that Brazilian

women have a higher risk of being diagnosed with late-stage breast cancer and at a younger age than women in high-income countries.³

Vitamin D concentration can be considered a prognostic factor in women with breast cancer.^{4,5} Vitamin D is a steroid hormone that has various physiologic effects in several tissues.⁶ The major source of vitamin D is endogenous synthesis in the skin (dermis and epidermis). Upon exposure of the skin to UV-B radiation, 7-dehydroxycholesterol is converted to vitamin D₃. Vitamin D₃ is transported to the liver, where it is hydroxylated at carbon 25 to 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]. Activation of vitamin D requires hydroxylation of 25(OH)D at position 1 in the proximal renal tubules. This step is catalyzed by the enzyme 1 α -hydroxylase, which converts 25(OH)D to 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D₃], the biologically active form of vitamin D.^{7,8} The main organs where vitamin D acts are those involved in calcium homeostasis, including bones, intestine, and kidneys; but most tissues of the body express vitamin D receptor (VDR), including the mammary gland.⁶

Effects of the active form of vitamin D (1,25(OH)₂D₃) on the breast are mediated by VDR, which controls the expression of genes that regulate antineoplastic actions, such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis, which is in accordance to scientific evidence linking hypovitaminosis D to breast cancer incidence and mortality.^{9,10} Vitamin D deficiency is common in postmenopausal breast cancer women and some evidence suggests that low vitamin D status increases the risk for disease development or progression.^{5,8} A recent systematic review and meta-analysis of studies reporting data on the role of vitamin D levels in patients with newly diagnosed breast cancer found that 67.4% of patients with breast cancer had a baseline level of 25(OH)D below 30 ng/mL, whereas this percentage was 33.7% in the control group. A high prevalence of vitamin D

insufficiency observed in patients with newly diagnosed breast cancer may have a physiopathological link to breast cancer development and progression.⁶

The impact of vitamin D at the time of diagnosis on the outcome of patients with breast cancer is less well understood. A meta-analysis based on five studies assessing the relation between VD and breast cancer mortality revealed that high serum levels of 25(OH)D were associated with a lower mortality rate. Patients with levels in the highest quartile had approximately half of the breast cancer mortality rate when compared to those with the lowest quartile. However, more clinical trials should be designed to confirm this association.¹¹ Another systematic review identified six studies that evaluated the association of circulating 25(OH)D with the prognosis in patients with breast cancer. Elevated 25(OH)D levels were associated with a significantly better survival in two studies, a borderline better survival in two, and no impact on survival in the other two studies.¹² In view of the increasing number of breast cancer survivors and the high prevalence of vitamin D deficiency among patients with breast cancer, an evaluation of the role of vitamin D in prognosis and survival among patients with breast cancer is essential. Therefore, in our study, we aimed at evaluating the association between serum vitamin D (VD) levels at diagnosis and overall survival, disease-free survival and cancer-specific survival in postmenopausal women treated for breast cancer.

Methods

Study design and sample selection

This study is a single-center prospective cohort. The population group comprised 192 postmenopausal women diagnosed with breast cancer who attended the Breast Disease Assessment Center of the University Hospital in Southeastern Brazil during 2014-2016. Women with the following characteristics were included: histological

diagnosis of breast cancer, last menstruation at least 12 months prior to presentation, aging 45 years or older and serum VD measurement at the time of breast cancer diagnosis, before any cancer treatment. Exclusion criteria included pharmacological use of any dose of VD; *in situ* or bilateral breast cancer; personal history of other cancers; patients in neoadjuvant chemotherapy; renal failure (creatinine > 1.4 mg/dL); liver diseases; abusive alcohol consumption and grade III obesity. The study was performed in compliance with the Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from all participants and the study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP).

Clinical assessments

All participants underwent individual interviews in which the following data were collected: age, menopausal age, time since menopause, parity, current smoking, previous use of hormone therapy and history of chronic diseases. Smokers were defined as patients who reported smoking, regardless of the number of cigarettes smoked. Anthropometric data included weight, height, and body mass index (BMI; $\text{weight} / \text{height}^2$). BMI were classified according to the system used by the World Health Organization in 2002: less than 24.9 kg/m² as normal, from 25 to 29.9 kg/m² as overweight, from 30 to 34.9 kg/m² as grade I obesity, from 35 to 39.9 kg/m² as grade II obesity, and 40 kg/m² or greater as grade III obesity.

Vitamin D measurement

Serum VD assessment was collected immediately after diagnosis of breast cancer prior to any proposed treatment, approximately 20 to 30 days post-diagnosis. For serum 25(OH)D dosage, we used the Architect 25-OH Vitamin D assay kit by the Architect®

i2000 analyzer (Abbott®, Santa Clara, California, USA), which is based on the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). The detection limit was 1.9 ng/mL and the intra- and inter-assay coefficient of variation was <10%, as described in the assay kit. The reference range was 0.0-160.0 ng / mL, according to the method. Levels ≥ 30 ng/mL were considered sufficient, between 20 and 29 ng/mL insufficient and < 20 ng/mL were considered deficient (Bischoff-Ferrari et al, 2006; Holick et al., 2011). All laboratory tests were processed by the Clinical Analysis Laboratory of Botucatu Medical School.

Tumor features

Breast cancer tumors were classified according to established prognostic characteristics: tumor size, type and histological staging, grade, axillary lymph node status, hormone receptor status (estrogen receptor, ER; progesterone receptor, PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and epithelial proliferative activity (Ki67). Tumor diameter was obtained from histopathological reports and histologically graded as grade 1 (well differentiated), grade 2 (moderately differentiated), and grade 3 (undifferentiated) according to the method proposed by Elston and Ellis (1993), which uses architectural aspects, nuclear differentiation levels, and mitotic index as criteria.¹³ Axillary lymph node status was classified as positive lymph node involvement if there was at least one positive lymph node according to clinical and/or histopathological examination. Tumors were categorized according to 8th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM system (tumor size and extension, lymph node status, metastasis),¹⁴ grouped into stages (I-IV): stage I (T1N0M0), stage II (IIA - T0N1M0, T1N1M0 and T2N0M0, IIB - T2N1M0 and T3N0M0, stage III (IIIA -

T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 and T3N2M0, stage IIIB - T4N0M0, T4N1M0 e T4N2M0, stage IIIC - any TN3M0) and stage IV (any T any N and M1).

Hormone receptor status and epithelial proliferative activity were assessed by standard methods, using immunohistochemistry (IHC) for ER, PR, HER2 and Ki-67 status performed according to the streptavidin–biotin–peroxidase complex methods (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). ER and PR were considered positive if >1% of cells stained positive on IHC.¹⁵ Ki-67 was considered high if > 20% of the tumor cells were labeled.¹⁶ HER2 was considered positive if the fluorescence in situ hybridization (FISH) test, systematically performed in all IHC 2+ tumors, showed HER2 genomic amplification or, in the absence of FISH, if IHC was 3+. All histopathological and immunohistochemical analyses were performed by the Department of Pathology of Botucatu Medical School.

Breast cancer was then categorized into four molecular subtypes based on surrogate immunohistochemical profiles: 1 - luminal HER-negative (ER positive and/or PR positive, HER2 negative); 2- Luminal HER2-positive (ER positive and/or PR positive and HER2 positive); 3- HER2 enriched (ER and PR negative and HER2 positive); 4- Triple-negative (ER, PR and HER2 negative).¹⁸

Statistical analysis

From all data, tables of clinical variables and parameters in each group were created according to serum level of 25 (OH) D in sufficient (n=65), insufficient (n=92) and deficient (n=35). For data analysis, mean and standard deviation were calculated for quantitative variables and frequency and percentage for qualitative variables. The following variables were assessed: 1- clinical (age, parity, age and time since menopause, past use of menopausal hormone therapy, hypertension, diabetes, smoking and BMI); 2-

Serum dosage of 25(OH)D; 3- anatomopathological and immunohistochemistry data of breast cancer (type and histopathological grade, tumor size, tumor stage, axillary lymph node status, ER, PR, HER2 and Ki-67). For comparison between groups in terms of quantitative characteristics, ANOVA and Gamma Distribution (asymmetric variables) were used. In the association between frequency of categorical characteristics, Chi-square test was used.

The primary outcome was overall survival (OS) and secondary outcomes were disease-free survival (DFS) and cancer-specific survival (CSS). Overall survival was defined as the time interval between date of diagnosis and date of death (related to breast cancer or death from any cause). Disease-free survival was defined as the time interval between date of diagnosis and date of the first recurrence or death, whichever came first. Recurrence was considered as any local, regional or distant tumor recurrence. Cancer-specific survival was defined as the time interval between date of diagnosis and date of death related to breast cancer. Follow-up data were collected until December 31, 2020.

To calculate survival outcomes, the Kaplan-Meier method and log-rank test were performed for all patients. A Cox proportional hazard model was used to analyze the association between 25 (OH) D and survival. Univariate and multivariate analyzes were used to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (95% CI). Clinical, anatomopathological and immunohistochemistry variables (ER, PR, HER2 and Ki67) were assessed using univariate analysis. Multivariate analysis was adjusted for age, BMI, size, type and tumor grade, tumor stage, axillary status and immunohistochemistry data. A level of significance of 5% or the corresponding P value was adopted in all tests. The analyses were performed using the Statistical Analysis System 9.2 program (SAS).

Results

A total of 192 postmenopausal women were included in the prospective cohort, with a mean age at the time of breast cancer diagnosis of 61.3 ± 9.6 years, with a mean serum 25(OH)D level of 25.8 ng/mL (ranging from 12.0 to 59.2 ng/mL) and a follow-up period between 54 and 78 months. Patients were classified according to serum concentrations of 25(OH)D at the time of diagnosis into three groups: sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficiency (20-29 ng/mL) and deficiency (< 20 ng/mL). Sufficient levels were detected in 65 patients (33.9%), insufficient in 92 patients (47.9%) and deficient in 35 patients (18.2%).

Clinical features according to serum 25(OH)D levels are shown in Table 1. There were no differences in age, time since menopause, parity, BMI, smoking, use of menopausal hormone therapy and history of hypertension or diabetes. The associations between 25(OH)D levels and tumor characteristics are shown in Table 2. Patients with insufficient and deficient 25(OH)D serum levels had a significantly higher proportion of high-grade tumors, positive axillary lymph nodes, advanced-stage tumors and distant metastasis, lower proportion of positive ER and PR, higher Ki-67 indices and higher rate of triple-negative tumors (Table 2).

During the proposed follow-up period, overall and cancer-specific survivals (OS and CSS) were 73.4% and 78.1%, respectively. The mean overall survival time was 54.4 ± 20.2 months (ranging from 9 to 78 months) and 51 patients (26.6%) died during follow-up, 44 (22.9%) from cancer and 7 (3.6%) for other causes: 4 due to CVD (coronary disease, stroke or venous thromboembolism) and 3 due to infection/sepsis. Overall, 47 patients had distant metastasis, 22 of whom had bone metastasis, 20 lung/pleura metastasis, 3 liver metastasis and 2 central nervous system metastasis. Of the 168 patients (87.5%) who were not diagnosed with distant metastasis at the time of the initial diagnosis of breast cancer (metastasis *de novo*), 33 (19.6%) developed distant metastases with an

average time from diagnosis of 24.8 ± 12.8 months. In the 9 cases in which locoregional recurrence was identified, the patients also had distant disease.

Figures 1 to 3 show the Kaplan-Meier graphs of overall survival, recurrence-free survival and cancer-specific survival according to serum levels of 25(OH)D. Patients with VD deficiency and insufficiency at diagnosis had significantly inferior OS, DFS and CSS compared to patients with sufficient values ($p < .0001$). Multivariate analysis was performed to determine the risk factors that affected survival curves for breast cancer. Among all factors analyzed, those that significantly influenced overall survival were age, tumor size and stage, lymph node status, hormone receptors (ER and PR) and serum VD levels. After adjusting for these variables, patients with serum 25(OH)D levels considered deficient at the time of diagnosis had a significantly higher risk of global death (HR 4.65, 95% CI 1.65-13.12), higher risk of disease recurrence (HR 6.87, 95% CI 2.35-21.18) and higher risk of death from the disease (HR 5.91, 95% CI 1.98-17.60) than the group with sufficient 25(OH)D levels.

Table 1- Comparison between clinical features according to serum levels of 25-hydroxyvitamin D, sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (20-30 ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL).

Variables	Sufficient (n=65)	Insufficient (n=92)	Deficient (n=35)	P value*
Age (years)	$60.7 \pm 9.6a$	$61.2 \pm 9.2a$	$61.9 \pm 10.3a$	0.711
Menarche age (years)	$13.1 \pm 1.6a$	$12.8 \pm 1.6a$	$12.8 \pm 1.2a$	0.530
Menopause age (years)	$48.4 \pm 3.8a$	$48.8 \pm 3.5a$	$48.1 \pm 3.1a$	0.614

Postmenopausal time (years)	12.3 ± 10.3a	12.5 ± 9.1a	13.3 ± 10.5a	0.659 [§]
Parity (number of children)	2.9 ± 2.2a	2.7 ± 1.9a	2.8 ± 1.9a	0.850 [§]
BMI (kg/m ²)	31.0 ± 5.1a	31.0 ± 5.5a	30.0 ± 3.9a	0.578
25(OH)D (ng/mL)	35.0 ± 6.0a	24.8 ± 2.8b	17.1 ± 2.5c	<.0001
Smoking, n (%)	11 (16.9)a	14 (15.2)a	6 (17.1)a	0.809 [#]
Past use of MHT, n (%)	10 (15.4)a	8 (8.7)a	4 (11.4)a	0.305 [#]
Hypertension, n (%)	30 (46.2)a	52 (56.5)a	18 (51.4)a	0.438 [#]
Diabetes, n (%)	9 (13.9)a	20 (21.7)a	8 (22.8)a	0.295 [#]

Values are presented as mean ± standard deviation (SD) or frequency (number) and percentage.

25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D; BMI, body mass index; MHT, menopausal hormone therapy.

* P value: (a, b) significant difference between groups and (a, a) without difference (p>0.05) (ANOVA, Gamma distribution[§] or Chi-square Test[#]).

Table 2- Comparison between anatomopathological characteristics according to serum levels of 25-hydroxyvitamin D, sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (20-30 ng/mL) and deficient (<20 ng/mL).

Variables	Normal (n=65)	Insufficient (n=92)	Deficient (n=35)	P* value
Tumor size (cm), n (%)				0.693
≤ 2	19 (29.2)	25 (27.2)	13 (37.1)	
2-5	40 (61.6)	57 (62.0)	17 (48.6)	
≥ 5	6 (9.2)	10 (10.9)	5 (14.3)	
Histological type, n (%)				0.382
Ductal	62 (95.4)	88 (95.7)	34 (97.1)	
Lobular	3 (4.6)	4 (4.3)	1 (2.9)	
Histological grade, n (%)				0.017
Low (grade 1)	9 (13.8)	6 (6.5)	1 (2.8)	
Intermediate (grade 2)	38 (58.5)	47 (51.1)	13 (37.1)	

High (grade 3)	18 (27.7)	39 (42.4)	21 (60.1)	
AJCC clinical stage, n (%)				0.0109
I	19 (33.3)	32 (33.3)	8 (20.5)	
II	23 (40.4)	38 (39.6)	8 (20.5)	
III	10 (17.5)	19 (19.7)	13 (33.3)	
IV	5 (8.8)	7 (7.3)	10 (25.6)	
Lymph node status, n (%)				0.0042
Negative	39 (60.0)	31 (33.7)	14 (40.0)	
Positive	26 (40.0)	61 (66.3)	21 (60.0)	
Estrogen receptor, n (%)				0.0001
Positive	61 (93.8)	77 (83.4)	21 (60.0)	
Negative	4 (6.2)	15 (16.6)	14 (40.0)	
Progesterone receptor, n (%)				0.047
Positive	52 (80.0)	63 (68.5)	20 (57.1)	
Negative	13 (20.0)	29 (31.5)	15 (42.9)	
HER2 status, n (%)				0.905
Positive	13 (20.0)	19 (20.6)	6 (17.1)	
Negative	52 (80.0)	73 (79.4)	29 (82.9)	
Ki-67 index, n (%)				0.0006
<20%	32 (49.2)	25 (27.2)	5 (14.3)	
≥ 20%	33 (50.8)	67 (72.8)	30 (85.7)	
Intrinsic subtype, n (%)				0.0003
Luminal HER2-	40 (72.7%)	79 (76.7%)	16 (47.1%)	
Luminal HER2+	12 (21.8%)	10 (9.7%)	5 (14.7%)	
HER2-enriched	1 (1.8%)	8 (7.8%)	2 (5.9%)	
Triple negative	2 (3.7%)	6 (5.8%)	11 (33.3%)	

Values presented in frequency and percentage. AJCC, American Joint Committee on Cancer; HER2, human epidermal growth factor receptor type 2.

* Significant difference if $P < 0.05$ (Chi-Square test).

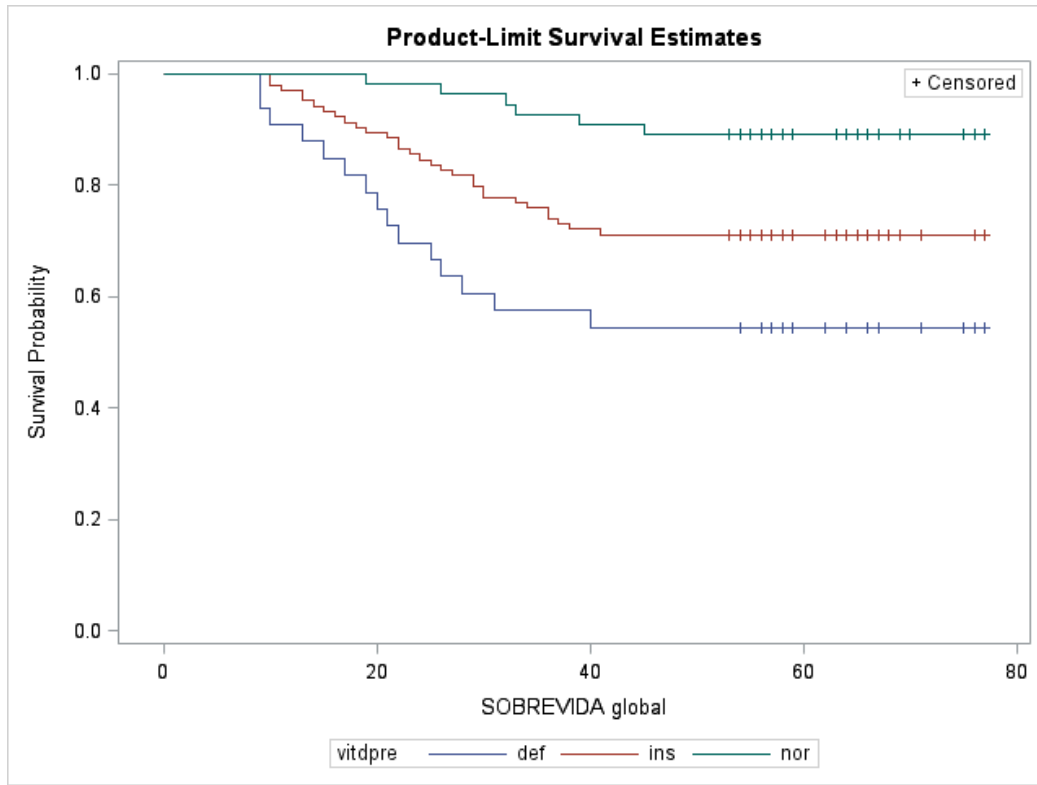


Figure 1. Kaplan-Meier graph for overall survival in patients with breast cancer according to serum level of 25-hydroxyvitamin D. Sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (20-30 ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL).

* Significance between sufficient x insufficient $p = 0.004$ and between sufficient x deficient $p < .0001$

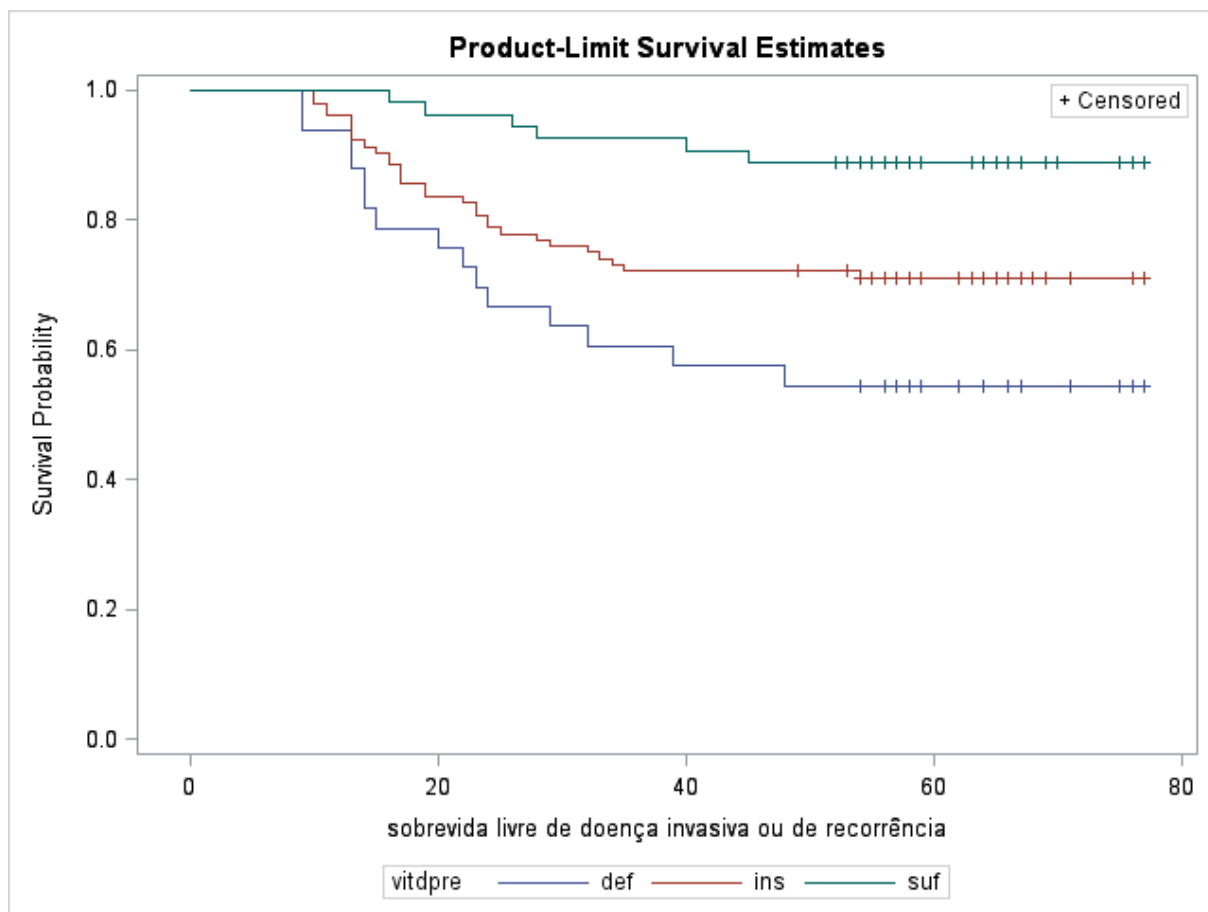


Figure 2. Kaplan-Meier graph for disease-free survival in patients with breast cancer according to serum level of 25-hydroxyvitamin D. Sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (20-30 ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL).

* Significance between sufficient x insufficient $p = 0.001$ and between sufficient x deficient $p < .0001$

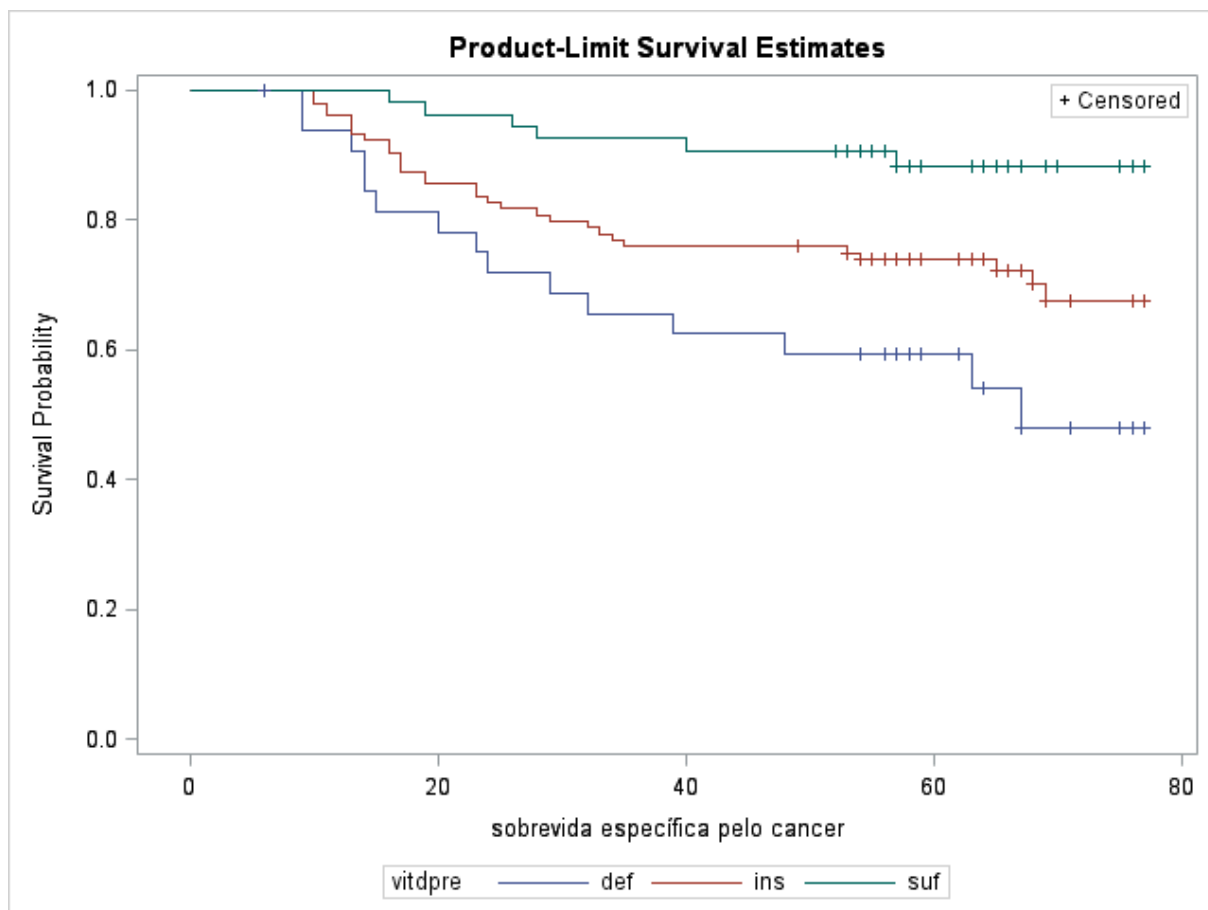


Figure 3. Kaplan-Meier graph for cancer-specific survival in patients with breast cancer according to serum level of 25-hydroxyvitamin D. Sufficient (≥ 30 ng/mL), insufficient (20-30 ng/mL) and deficient (< 20 ng/mL).

* Significance between sufficient x insufficient $p = 0.002$ and between sufficient x deficient $p < .0001$

Discussion

From our analysis, in postmenopausal women, vitamin D deficiency at the time of diagnosis was associated with lower overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and cancer specific survival (CSS) compared to patients with sufficient vitamin D concentration, regardless prognostic factors of breast cancer (age, stage and size of the tumor, lymph node status, hormone receptors and breast cancer subtypes). It is well established that prognostic and predictive factors are of paramount importance when dealing with breast cancer and it has been in accordance with the improving knowledge on tumor biology and options for proper management.¹⁹ The evidence of a relationship between vitamin D levels of breast cancer patients and their subsequent survival has been an important subject in many recent researches and debates. In fact, several previous pre-clinical and clinical studies assessing the role of vitamin D in breast cancer have revealed that serum 25(OH)D levels might be independently associated with breast cancer features and prognosis.^{8-10, 20, 21}

In the present study based on 192 Brazilian postmenopausal women with primary invasive breast cancer, low levels of serum 25(OH)D at diagnosis were observed in 66,1% of patients, in which 47.9% had insufficient and 18.2% had deficient levels of vitamin D. This finding is consistent with previous trials, which report 50-74% vitamin D insufficiency and deficiency in newly diagnosed breast cancer patients.²²⁻²⁷ Our analysis also showed that low levels of serum 25(OH)D were significantly associated with higher-grade tumors, positive axillary status, negative ER and PR, higher Ki67 index, and higher rates of the most aggressive intrinsic subtype, triple-negative tumors. During follow-up, OS, DFS and CSS were also independently affected by vitamin D deficiency.

As increasing tumor grade is classically noted to lead to decreased breast cancer-specific survival and axillary lymph node status reflects actual end-results data on the

interaction between tumor aggressiveness and host defense mechanisms, the fact that low levels of vitamin D was observed in 76,9% of all grade-3 tumors and in 75% of the patients with positive axilla (N1+) suggests a prognostic effect of vitamin D related to a more aggressive behavior, consistent with a potential role of vitamin D in breast carcinogenesis and regulation of breast cancer cell phenotypes. In the study by Hatse et al. 25(OH)D levels at time of diagnosis was shown to be linked to larger tumor size and higher malignancy grade²⁸ and two other studies by Villasenor et al. and Vrieling et al. found that lower 25(OH)D levels were associated with more lymph node involvement and distant metastases.^{29,23}

An important finding in our study was the relation between vitamin D insufficiency and deficiency and a higher proportion of locally advanced and metastatic disease at diagnosis, which is in accordance with literature data showing that locally advanced breast cancer patients have more severe vitamin D deficiency than those with early-stage diseases. Thanasitthichai et al. conducted a cross-sectional analysis of 25(OH)D levels and clinicopathological characteristics in 200 cases of breast cancer. Low 25(OH)D level (<32 ng/mL) was significantly found in the majority of cases with advanced stage of the disease, positive node involvement and large tumors.³⁰ In view of the increasing number of cancer survivors and the high prevalence of vitamin D deficiency among patients with cancer, an evaluation of the role of circulating 25-OHD in prognosis among patients with cancer is essential. A previous study of Canadian women with breast cancer found similar association; patients who had very low levels of 25(OH)D at diagnosis were more likely to have aggressive and metastatic disease. In fact, women with very low levels of vitamin D were 94% more likely to develop metastases than women with normal levels and were 73% more likely to die from breast cancer.²⁶ In

our study, of the 47 patients who had distant metastasis at diagnosis or during follow-up, only 6 (12%) had sufficient 25(OH)D levels at breast cancer diagnosis.

As for biological and intrinsic prognostic factors, the measurement of ERs, PRs and HER2 is known to be a standard practice in the evaluation of patients with primary breast cancer because it provides phenotypical features related to tumor molecular subtype. Our finding that insufficient and deficient level of vitamin D were associated with a lower proportion of positive ER and PR tumors mainly characterizes higher-risk tumors. A significant reduced rate of Ki67 expression in patients with low vitamin D levels was also observed and, despite the controversies related to the reproducibility of its expression, several metaanalyses point to an association between Ki67 with the risk of both relapse and overall survival and its role as an independent prognostic factor for both disease-free and overall survival.³¹⁻³⁴

Of all 162 patients with luminal-phenotype tumors in the present study, only 21 (12,9%) had deficient 25(OH)D levels whereas, among patients with triple-negative tumors (ER-, PR- and HER2-), 11 of 19 patients (57,8%) had VD deficiency; this is in accordance with other studies assessing the relation of vitamin D level with receptor expression and tumor subtypes.^{4,8,11,35,36} A case-control study comprising women with breast cancer and the same number of women in the control group revealed that lower concentrations of vitamin D were associated to poorly differentiated cell cancers and triple-negative tumors.³⁵ Another study, a large prospective cohort of 1666 breast cancer survivors by Yao et al, showed that low 25(OH)D levels were associated with poor prognostic characteristics and a higher risk of triple-negative breast cancer.³⁷ Similar results were observed in studies evaluating expression of VDR. In the recent study by Huss et al, vitamin D receptor (VDR) expression was evaluated in a tissue microarray of invasive breast tumors and it was found to be associated with favorable prognostic

characteristics, such as low grade, ER positivity, PR positivity, low Ki67 expression, and Luminal-like subtypes.³⁸

In terms of mortality from breast cancer or all-cause mortality, we found significant inverse associations between vitamin D status and cancer survival. Patients with 25(OH)D levels deficiency or insufficiency at the time of diagnosis had a significantly worse OS (HR 4.65, IC95% 1.65-13.12), DFS (HR 6.87, IC95% 2.35-21.18) and CSS (HR 5.91, IC95% 1.98-17.60) compared to patients with sufficient 25(OH)D levels, which has been observed in most previous reports.²⁶⁻²⁸ In a Norwegian study, patients with breast cancer and higher serum 25(OH)D levels (>35 ng/mL) had a significantly decreased risk of breast cancer-specific mortality compared to those with lower serum 25(OH)D levels (<20 ng/mL).³⁹ Three different meta-analyses assessing the impact of VD on breast cancer survival showed similar results.^{11,40,41} Two meta-analyses by Mohr et al and Maalmi et al assessed the relationship between vitamin D levels at breast cancer diagnosis and case fatality rates. The analyses found that women in the highest serum 25(OH)D concentration group were more likely to have a better prognosis when women in the lowest serum 25(OH)D concentration group.^{11,40} A larger meta-analysis by Kim et al including 30 studies revealed that among 6092 patients with breast cancer, high 25(OH)D status was weakly associated with low breast cancer risk, but strongly associated with better breast cancer survival. They observed that high blood levels of vitamin D were significantly associated with lower breast cancer mortality (RR, 0.58; 95% CI, 0.40-0.85) and overall mortality (RR, 0.61; 95% CI, 0.48-0.79).⁴¹ More recently, a study of Kanstrup et al. with 2510 women with primary invasive breast cancer, patients with the lowest 25(OH) D levels (≤ 20 ng/mL) had an inferior event-free survival with a HR of 1.63 (95% CI 1.21–2.19) compared to women in the third quartile (30–40 ng/mL)⁴². Likewise, a randomized clinical trial showed that patients with high levels of

25(OH)D prior to chemotherapy had significantly improved overall survival and progression-free survival.⁴³

In accordance with these robust data, several mechanisms through which sufficient levels of 25(OH)D may improve survival among breast cancer patients have been studied. Vitamin D has been associated to the control of a variety of cellular mechanisms through interaction with a number of different genes with respect to cancer development such as differentiation, cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and metastatic potential.^{5,10,44} The net effect is characterized by slowing tumor cell growth and progression and maintaining a more differentiated and, subsequently, less aggressive state.^{5,9} In addition, vitamin D sufficiency seems to suppress downregulation of E-cadherin, a glycoprotein that helps cells to keep in close contact and consequently a well-differentiated state, thus improving breast cancer prognosis.^{45,46} It is well known that breast cancer is complex and that risk factors and etiologies differ on the basis of endogenous and exogenous exposures, underlying biology and genetics concepts.^{10,47} Furthermore, differing and multifactor patterns impact distant disease-free and overall survival.⁴⁷ Therefore, although our findings may indicate an association between vitamin D and breast cancer outcome, it is unlikely that these prognostic effects of vitamin D are casual or due to chance.

In addition to continuing to explore these non-VDR vitamin D-related genetic associations with cancer, there may be important interactions between vitamin D status and vitamin D-related genetic variation that have not yet been fully elucidated but deserve evaluation.^{4,8,22} Therefore, addressing these gaps should provide new data needed to help inform evidence-based recommendations for or against the use of vitamin D supplements for primary and secondary cancer prevention that cannot be made at this time. Until then, and with few exceptions, the scientific community remains unable to make evidence-

based recommendations related to optimal 25(OH)D concentrations or for or against the use of vitamin D supplementation for primary or secondary prevention of breast cancer.

As a strength of this study, we used a longitudinal cohort and it is the first prospective analysis assessing the impact of serum 25(OH)D levels in prognostic factors and long-term survival in Brazilian women with breast cancer; which provides a direct glance evidence that vitamin D may be a leading host factor influencing breast cancer prognosis to our patients. This is encouraging, but it is very clear that more research is needed. Other strengths of our data include no patients lost during follow-up and homogeneity of clinical features in the three groups categorized by 25(OH)D. This is important considering that factors related to comorbidities and lifestyle are associated with both circulating 25(OH)D and risk of breast cancer and could interfere with data analysis.

As limitations, it was a single-center study with a relatively low number of patients and only a single measurement of serum 25(OH)D levels made at diagnosis. The significant associations between 25(OH)D levels and breast cancer survival rates in our analyses had relatively wide confidence intervals, making the level of uncertainty greater, although there may still be enough precision to make decisions about the utility of the findings. Considering that the width of the confidence interval for an individual study depends to a large extent on the sample size; larger studies would certainly give more precise estimates of the effects observed.

Conclusion

In postmenopausal women treated for breast cancer, vitamin D deficiency at the time of diagnosis was associated with lower overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and cancer specific survival (CSS) compared to patients with sufficient vitamin D

concentration, regardless prognostic factors of breast cancer (age, stage and size of the tumor, lymph node status, hormone receptors and breast cancer subtypes).

References

1. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2021. Atlanta: American Cancer Society, 2021.
2. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020 : Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.
3. Simon SD, Bines J, Werutsky G, Nunes JS, Pacheco FC, Segalla JG, Gomes AJS, Adam Van Eyll BMHR, Gimenes DL, Crocamo S, Freitas-Junior R, Lago LD, Queiroz GS, Jobim de Azevedo S, Rosa DD, Delgado G, Borges GS, Verônica do Nascimento Y, Zaffaroni F, Martínez-Mesa J, Barrios CHE. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. *Breast* 44:113-119, 2019.
4. 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 Biol* 2017;174:284-289.
5. Welsh J. Vitamin D and Breast Cancer: Past and Present. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;177:15-20.
6. 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.
7. Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *The New England journal of medicine*. 2011;364(3):248-54.

8. 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.
9. 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.
10. Sheng L, Callen DF, Turner AG. Vitamin D 3 signaling and breast cancer: Insights from transgenic mouse models *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 ;178:348-353.
11. 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(3):1163-1166.
12. Toriola AT, Nguyen N, Scheitler-Ring K, Colditz GA. Circulating 25-hydroxyvitamin D Levels and Prognosis among Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(6): 917–33.
13. Rampaul RS, Pinder SE, Elston CW, Ellis IO; Nottingham Breast Team. Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management: The Nottingham Breast Team. *Eur J Surg Oncol.* 2001 Apr;27(3):229-38.
14. AJCC Cancer Staging Manual (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017
15. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of

estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Jun;134(6):907-22.

16. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.

17. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology.; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):241-56.

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

19. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17:323-324.

20. Hatse S et al (2012) Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis* 33(7):1319–1326

21. Vrieling A et al (2014) Circulating 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: influence of tumor characteristics and lifestyle factors? *Int J Cancer* 134(12):2972–2983

22. 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
23. Vrieling A, Hein R, Abbas S, et al. Serum 25- hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R74.
24. Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupré T, Mesrine S, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F. Serum 25(OH) Vitamin D and Risk of Breast Cancer: A Nested Case-Control Study from the French E3N Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 19(9); 2341–50.
25. Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røksahm TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control* 2012;23:363–70.
26. 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.
27. Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, Insalaco MR, Skinner KA. The association between breast cancer prognostic indicators and serum 25-OH vitamin D levels. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2590e9.
28. Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, Smeets A, Brouwers B, Vandorpe T, Brouckaert O, Peuteman G, Laenen A, Verlinden L, Kriebitzsch C, Dieudonné AS, Paridaens R, Neven P, Christiaens MR, Bouillon R, Wildiers H. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis*. 2012 Jul;33(7):1319-26.
29. Villaseñor A, Ballard-Barbash R, Ambis A, Bernstein L, Baumgartner K, Baumgartner R, Ulrich CM, Hollis BW, McTiernan A, Neuhauser ML. Associations of serum 25-

hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Cancer Causes Control*. 2013 Apr;24(4):759-67.

30. Thanasitthichai S, Prasitthipayong A, Boonmark K, Purisa W, Guayraksa K. Negative Impact of 25-hydroxyvitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(10):3101-3106.

31. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:539-552.

32. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, Li L, Xu F, Zhou E, Yang K. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol*. 2017 Apr;13(9):843-857.

33. Gui Y, Xu S, Yang X, Gu L, Zhang Z, Luo X, Chen L. A meta-analysis of biomarkers for the prognosis of triple-negative breast cancer patients. *Biomark Med*. 2016 Jul;10(7):771-90.

34. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008 Aug;17(4):323-34.

35. Yao S, Zirpoli G, Bovbjerg DH, Jandorf L, Hong CC, Zhao H, Sucheston LE, Tang L, Roberts M, Ciupak G, Davis W, Hwang H, Johnson CS, Trump DL, McCann SE, Ademuyiwa F, Pawlish KS, Bandera EV, Ambrosone CB. Variants in the vitamin D pathway, serum levels of vitamin D, and estrogen receptor negative breast cancer among African-American women: a case-control study. *Breast Cancer Res*. 2012 Apr 4;14(2):R58.

36. Krishnan AV, Swami S, Feldman D. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids*. 2012 Sep;77(11):1107-12.
37. Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, et al. Association of serum level of vitamin D at diagnosis with breast cancer survival: a case-cohort analysis in the Pathways Study. *JAMA Oncol*. 2017;3(3):351-357
38. 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 Jul 29;21(1):84.
39. Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røksahm TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control*, 2012 23 (2): 363–370.
40. Maalmi H, Ordoñez-Mena JM, Schöttker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*. 2014;50(8):1510-1521.
41. 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
42. Kanstrup C, Teilum D, Rejnmark L, Bigaarda randomized clinical trial showed that patients with high levels of 25(OH)D prior to chemotherapy had significantly improved overall survival and progression-free survival JV, Eiken P, Kroman N, Tjønneland A, Mejdahl MK. 25-Hydroxyvitamin D at time of breast cancer diagnosis and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2020;179(3):699-708.
43. Ng K, Nimeiri HS, McCleary NJ, Abrams TA, Yurgelun MB, Cleary JM, Robinson DA, Schrag D, Miksad R, Bullock AJ, Allen J, Zuckerman D, Chan E, Chan JA, Wolpin BM, Constantine M, Weckstein DJ, Faggen MA, Thomas CA, Kournioti C, Yuan C,

- Ganser C, Wilkinson B, Mackintosh C, Zheng H, Hollis BW, Meyerhardt JA, Fuchs CS. Effect of High-Dose vs Standard-Dose Vitamin D3 Supplementation on Progression-Free Survival Among Patients With Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: The SUNSHINE Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019 Apr 9;321(14):1370-1379.
44. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D. Alterations in Vitamin D signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 2012; 10:483.
45. Mohr SB, Gorham ED, Alcaraz JE, Kane CI, Macera CA, Parsons JK, Wingard DL, Garland CF. Does the evidence for an inverse relationship between serum vitamin D status and breast cancer risk satisfy the Hill criteria? *Dermatoendocrinol*. 2012 Apr 1;4(2):152-7.
46. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3 2001 (5): 289–293.
47. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288-300.

5. Conclusão

Em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama, a deficiência de vitamina D no momento do diagnóstico associou-se a menor sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica pelo câncer em comparação às pacientes com valores suficientes de vitamina D, independentemente de fatores prognósticos do câncer de mama (idade, estágio e tamanho do tumor, status linfonodal e receptores hormonais).

6. Referências

- Abbas S, Linseisen J, Slinger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J: Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer: results of a large case–control study. *Carcinogenesis* 2008, 29:93-99.
- AJCC Cancer Staging Manual (8th edition). Springer International Publishing; American Joint Commission on Cancer; 2017

- Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 2007;3(4):225-30.
- Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang XS, Bannon F, Ahn JV, Johnson CJ, Bonaventure A, Marcos-Gragera R, Stiller C, Azevedo e Silva G, Chen WQ, Ogunbiyi OJ, Rachet B, Soeberg MJ, You H, Matsuda T, Bielska-Lasota M, Storm H, Tucker TC, Coleman MP; CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 2015;385(9972):977-1010.
- 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 Biol* 2017;174:284-289
- 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.
- American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2021. Atlanta: American Cancer Society, 2021.
- American Joint Committee on Cancer, Cancer Staging Manual. Sixth Edition, 2002; 227-228.
- 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.
- Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL, Haussler MR, Pike JW, Colston K, Easton D, Coombes RC. Immunocytochemical determination of estrogen receptor,

- progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in breast cancer and relationship to prognosis. *Cancer Res* 1991;51:239–244.
- Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, Coombes RC: Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(3):607-613.
- 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.
- Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 3 2001 (5): 289–293.
- 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.
- Chen H, Reed G, Guardia J, Lakhan S, Couture O, Hays E, et al. Vitamin D directly regulates Mdm2 gene expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(1):370–4.
- 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
- Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, Li L, Xu F, Zhou E, Yang K. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.* 2017 Apr;13(9):843-857.
- Chlebowski RT. Vitamin D and breast cancer: interpreting current Evidence. *Breast Cancer Research* 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.
- Colston KW. Vitamin D and breast cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(4):587–99.
- 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 international* 2010;21(7):1151-4.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
- Ditsch N, Toth B, Mayr D, Lenhard M, Gallwas J, Weissenbacher T, Dannecker C, Friese K, Jeschke U. The association between vitamin D receptor expression and prolonged survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2012;60(2):121–9
- 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.
- Eastell R, Rosen CJ, Black DM, Cheung AM, Murad MH, Shoback D. Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019 May 1;104(5):1595-

- 1622Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Moseley JM: 1,25-dihydroxyvitamin-Dreceptor in breast cancer cells. *Lancet* 1979;2(8156-8157):1335-1336.
- Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I, Moseley JM: 1,25-dihydroxyvitamin-Dreceptor 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. *Breast Cancer 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.
- Engel P, Fagherazzi G, Boutten A, Dupré T, Mesrine S, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F. Serum 25(OH) Vitamin D and Risk of Breast Cancer: A Nested Case-Control Study from the French E3N Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 19(9); 2341–50.
- Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240(4854):889-895.
- 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.
- Francis I, AlAbdali N, Kapila K, John B, Al-Temaimi RA. Vitamin D pathway related polymorphisms and vitamin D receptor expression in breast cancer. *Int J Vitam Nutr Res*. 2021 Jan;91(1-2):124-132.
- Freake HC, Abeyasekera G, Iwasaki J, Marcocci C, MacIntyre I, McClelland RA, Skilton RA, Easton DF, Coombes RC: Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors

in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res* 1984;44(4):1677-1681.

Gnagnarella P, Raimondi S, Aristarco V, Johansson HA, Bellerba F, Corso F, Gandini S.

Vitamin D Receptor Polymorphisms and Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1268:53-114.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et

al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-23.

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.

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.

Gui Y, Xu S, Yang X, Gu L, Zhang Z, Luo X, Chen L. A meta-analysis of biomarkers for the prognosis of triple-negative breast cancer patients. *Biomark Med*. 2016 Jul;10(7):771-90.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons

PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010 Jun;134(6):907-22.

- Hanley DA, Cranney A, Jones G, Whiting SJ, Leslie WD, Cole DE, et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal* 2010;182(12):E610-8.
- Hatse S, Lambrechts D, Verstuyf A, Smeets A, Brouwers B, Vandorpe T, Brouckaert O, Peuteman G, Laenen A, Verlinden L, Kriebitzsch C, Dieudonné AS, Paridaens R, Neven P, Christiaens MR, Bouillon R, Wildiers H. Vitamin D status at breast cancer diagnosis: correlation with tumor characteristics, disease outcome, and genetic determinants of vitamin D insufficiency. *Carcinogenesis*. 2012 Jul;33(7):1319-26.
- Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *The British journal of nutrition*. 2014;111(1):23-45.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
- Holick MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical chemistry*. 2010;56(5):729-31.
- Hu K, Callen DF, Li J, Zheng H. Circulating Vitamin D and Overall Survival in Breast Cancer Patients: A Dose-Response Meta-Analysis of Cohort Studies. *Integr Cancer Ther*. 2018;17(2):217-225.

- 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 Jul 29;21(1):84.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro : INCA, 2019.
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:539-552.
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:539-552.
- 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.
- Ismail A, El-Awady R, Mohamed G, Hussein M, Ramadan SS. Prognostic Significance of Serum Vitamin D Levels in Egyptian Females with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 ;19(2):571-576.
- Jeffreys M, Redaniel MT, Martin RM. The effect of pre-diagnostic vitamin D supplementation on cancer survival in women: a cohort study within the UK Clinical Practice Research Datalink. *BMC Cancer.* 2015;15:670
- Kanstrup C, Teilmann D, Rejnmark L, Bigaard JV, Eiken P, Kroman N, Tjønneland A, Mejdahl MK. 25-Hydroxyvitamin D at time of breast cancer diagnosis and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;179(3):699-708.

- 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
- Kermani IA, Kojidi HT, Gharamaleki JV, Sanaat Z, Ziaei JE, Esfahani A, et al. Association of serum level of 25 hydroxy-vitamin D with prognostic factors for breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2011;12(6):1381-4.
- 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):2772–84.
- Kimball S, Fuleihan Gel H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4):339-414.
- Kommagani R, Payal V, Kadakia MP. Differential regulation of vitamin D receptor (VDR) by the p53 Family: p73-dependent induction of VDR upon DNA damage. *J Biol Chem* 2007; 282(41):29847–54.
- Krishnan AV, Swami S, Feldman D. The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids*. 2012 Sep;77(11):1107-12.
- Kuhn T, Kaaks R, Becker S, Eomois PP, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and the risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition: a nested case-control study. *Int J Cancer* 2013; 133(7):1689–700
- LaPorta E, Welsh J. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144:65–73.

- LeFevre ML; US Preventive Services Task Force. Screening for vitamin D deficiency in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2015;162 (2):133-140.
- Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *Journal of internal medicine.* 2006;260(3):245-54.
- Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D. Alterations in Vitamin D signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 2012; 10:483.
- Maalmi H, Ordoñez-Mena JM, Schöttker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer.* 2014;50(8):1510-1521.
- 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*.
- Maeda SS, Borba V, Camargo M, Silva D, Borges J, Bandeira F, Lazaretti-Castro M. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(5):411-33.
- 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.
- Mason RS. Vitamin D: a hormone for all seasons. *Climacteric* 2011;14(2):197-203.

- 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.
- Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chen Z, Shang X, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE* 2013;8(3): e57967
- Mizrak Kaya D, Ozturk B, Kubilay P, Onur H, Utkan G, Cay Senler F, Alkan A, Yerlikaya H, Koksoy EB, Karci E, Demirkazik A, Akbulut H, Icli F. Diagnostic serum vitamin D level is not a reliable prognostic factor for resectable breast cancer. *Future Oncol.* 2018;14(15):1461-1467.
- Mohr SB, Gorham ED, Alcaraz JE, Kane CI, Macera CA, Parsons JK, Wingard DL, Garland CF. Does the evidence for an inverse relationship between serum vitamin D status and breast cancer risk satisfy the Hill criteria? *Dermatoendocrinol.* 2012 Apr 1;4(2):152-7.
- 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(3):1163-1166.
- Moyer VA; US Preventive Services Task Force. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014;160(8):558-564
- 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.

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.

Nunes RD. Estudo de sobrevida das mulheres com câncer de mama na cidade de Goiânia, entre 1995 e 2003. Goiânia: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás; 2011.

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

Ooi LL, Zheng Y, Zhou H, Trivedi T, Conigrave AD, Seibel MJ, Dunstan CR (2010) Vitamin D deficiency promotes growth of MCF-7 human breast cancer in a rodent model of osteosclerotic bone metastasis. *Bone* 47 (4): 795–803.

Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol* 2006, 59:1334-1336.

Pande M, Thompson PA, Do KA, Sahin AA, Amos CI, Frazier ML, Bondy ML, Brewster AM. Genetic variants in the vitamin D pathway and breast cancer disease-free survival. *Carcinogenesis* 2013;34(3):587–594.

Peppone LJ, Rickles AS, Janelins MC, Insalaco MR, Skinner KA. The association between breast cancer prognostic indicators and serum 25-OH vitamin D levels. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2590e9.

Rampaul RS, Pinder SE, Elston CW, Ellis IO; Nottingham Breast Team. Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management: The Nottingham Breast Team. *Eur J Surg Oncol*. 2001 Apr;27(3):229-38.

- 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
- 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.
- Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 1987; 8(3):138–140.
- 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.
- Rosen CJ. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *The New England journal of medicine*. 2011;364(3):248-54.
- Ross CA, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96:53-58.
- Russo LA, Gregorio LH, Lacativa PG, Marinheiro LP. [Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53(9):1079-87.
- 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.

Shao T, Klein P, Grossbard ML. Vitamin D and breast cancer. *Oncologist* 2012;17:36–45.

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

Simon SD, Bines J, Werutsky G, Nunes JS, Pacheco FC, Segalla JG, Gomes AJS, Adam Van Eyll BMHR, Gimenés DL, Crocamo S, Freitas-Junior R, Lago LD, Queiroz GS, Jobim de Azevedo S, Rosa DD, Delgado G, Borges GS, Verônica do Nascimento Y, Zaffaroni F, Martínez-Mesa J, Barrios CHE. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. *Breast* 44:113-119, 2019

So JY, Lee HJ, Smolarek AK, Paul S, Wang CX, Maehr H, Uskokovic M, Zheng X, Conney AH, Cai L, Liu F, Suh N (2011) A novel Gemini vitamin D analog represses the expression of a stem cell marker CD44 in breast cancer. *Mol Pharmacol* 79 (3): 360–367.

Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008 Aug;17(4):323-34.

Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008;17:323-324.

Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Albertelli MA, Feldman D. Dietary vitamin D(3) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol) exhibit equivalent

- anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology* 2012. 153 (6): 2576–2587.
- Szymiczek A, Lone A, Akbari MR. Molecular intrinsic versus clinical subtyping in breast cancer: A comprehensive review. *Clin Genet*. 2021 May;99(5):613-637.
- Tabár L, Vitak B, Chen TH et al. Swedish Two-County Trial: Impact of Mammographic Screening on Breast Cancer Mortality during 3 Decades. *Radiology*, 2011; 260: 658-63.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKEy reports* 2014;3:495.
- Tang BM, Eslick GD, Nowson C, Smith C, Bensoussan A. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370(9588):657-66.
- Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16 (12), 4881-4883
- Thanasitthichai S, Prasitthipayong A, Boonmark K, Purisa W, Guayraksa K. Negative Impact of 25-hydroxyvitamin D Deficiency on Breast Cancer Survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(10):3101-3106.
- Toriola AT, Nguyen N, Scheitler-Ring K, Colditz GA. Circulating 25-hydroxyvitamin D Levels and Prognosis among Cancer Patients: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(6): 917–33.
- Tretli S, Schwartz GG, Torjesen PA, Røksahm TE. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and survival in Norwegian patients with cancer of breast, colon, lung, and lymphoma: a population-based study. *Cancer Causes Control* 2012 23 (2): 363–370.

- Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhaes MC, Sassaki 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.
- Urban LA, Chala LF, Bauab SP, Schaefer MB, Santos RP, Maranhão NMA, et al. Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para rastreamento do câncer de mama por métodos de imagem. *Radiol Bras*. 2017;50:244-9.
- 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.
- Villaseñor A, Ballard-Barbash R, Ambis A, Bernstein L, Baumgartner K, Baumgartner R, Ulrich CM, Hollis BW, McTiernan A, Neuhaus ML. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Cancer Causes Control*. 2013 Apr;24(4):759-67.
- Visvanathan K, Mondul A, Zeleniuch-Jacquotte A, Mukhtar TK, Smith-Warner SA, Ziegler RG. Circulating vitamin D concentrations and breast cancer risk: A pooled analysis of 17 cohorts. *Cancer Research* 2015; 75(9 Supplement):P3-07-1.
- 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.
- Vrieling A, Hein R, Abbas S, et al. Serum 25- hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Res* 2011;13:R74.
- Wang D, Velez de-la-Paz OI, Zhai JX, Liu DW. Serum 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Tumour Biol* 2013;34(6):3509-17.

- Wang J, Slominski A, Tuckey RC, Janjetovic Z, Kulkarni A, Chen J, Postlethwaite AE, Miller D, Li W. 20-hydroxyvitamin D inhibits proliferation of cancer cells with high efficacy while being non-toxic. *Anticancer Res* 2012;32(3):739-46.
- Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ: Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 2003;133:2425S-2433S.
- Welsh J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523(1):107–14.
- Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:1721S-1724S.
- Welsh J. Vitamin D and Breast Cancer: Past and Present. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;177:15-20.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology.; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):241-56.
- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284
- Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, et al. Association of serum level of vitamin D at diagnosis with breast cancer survival: a case-cohort analysis in the Pathways Study. *JAMA Oncol*. 2017;3(3):351-357

Yao S, Zirpoli G, Bovbjerg DH, Jandorf L, Hong CC, Zhao H, Sucheston LE, Tang L, Roberts M, Ciupak G, Davis W, Hwang H, Johnson CS, Trump DL, McCann SE, Ademuyiwa F, Pawlish KS, Bandera EV, Ambrosone CB. Variants in the vitamin D pathway, serum levels of vitamin D, and estrogen receptor negative breast cancer among African-American women: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2012 Apr 4;14(2):R58.

Zinser GM, McEleney K, Welsh J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2003;200(1-2):67-80.

Zinser GM, Welsh JE. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed post-lactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Mol Endocrinol* 2004;18:2208–2223.

7. Anexos

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

CONVIDO, a Senhora para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Polimorfismo do receptor da vitamina D e a sobrevida de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama que será desenvolvido pelo médico Dr. Benedito de Souza Almeida Filho e pela Professora Eliana Aguiar Petri Nahas da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

Estamos estudando se alterações no sangue da vitamina D tem efeito sobre a evolução do câncer de mama. Como a senhora faz seguimento no Ambulatório de Mastologia, do Hospital das Clínicas de Botucatu, está sendo convidada a participar desta pesquisa. Sua participação será de responder a um questionário, com duração de 10 minutos. E será coletado material de sua boca com um cotonete de algodão que será passado duas vezes na bochecha. O risco dessa coleta pode ser uma ardência na boca que desaparecerá rapidamente. Solicito também 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.

Para a senhora, sua participação não trará benefícios nesse momento. Esclarecemos que os benefícios desse estudo serão para futuras pacientes, quando tivermos o conhecimento dos resultados da pesquisa. 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, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

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, ____/____/____

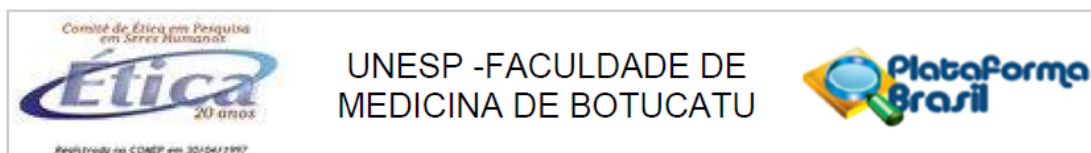
Pesquisador

Participante da Pesquisa

Benedito de Souza Almeida Filho- e-mail: almeidafilhobenedito@gmail.com
Rua Joao Passos, 600 – apto 84 – Centro – Botucatu – SP Fone: 14-981652276

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: Polimorfismo do receptor da vitamina D e a sobrevida de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama

Pesquisador: BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71399117.2.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.206.729

Apresentação do Projeto:

Projeto adequadamente apresentado.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação do polimorfismo do receptor da vitamina D (VDR) com a sobrevida de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama.

Trata-se de estudo observacional e prospectivo. Serão incluídas 200 pacientes atendidas no Centro de Avaliação em Mastologia (CAM) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP, entre 2014 e 2016, com câncer de mama, 45 anos, que tiveram dosagem sérica de 25(OH)VD na época do diagnóstico. A sobrevida será avaliada em até 5 anos.

Critérios de exclusão estão descritos.

Serão obtidos dados clínicos e antropométricos. No prontuários, serão avaliados: dosagem de vitamina D e imunohistoquímica do tumor. O polimorfismo do receptor da vitamina D será avaliado em amostras de células bucais coletadas no dia da entrevista com swab bucal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não envolve riscos ou benefícios para as participantes. Esta informação encontra-se claramente exposta no TCLE.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

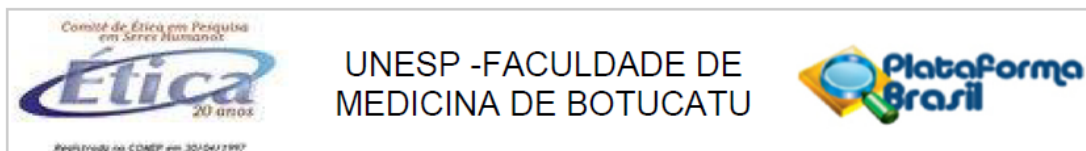
UF: SP

Telefone: (14)3880-1608

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.206.729

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de interesse na área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Autorizações estão incluídas no processo.

Recomendações:

Recomendo aprovação pelo CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 07/08/2017, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado o Relatório Final de Atividades, o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 07/08/2017 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_939467.pdf	17/07/2017 18:57:26		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	17/07/2017 18:56:38	BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	17/07/2017 18:52:34	BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/06/2017 19:38:50	BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Doutorado.docx	14/06/2017 19:37:18	BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO	Aceito

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

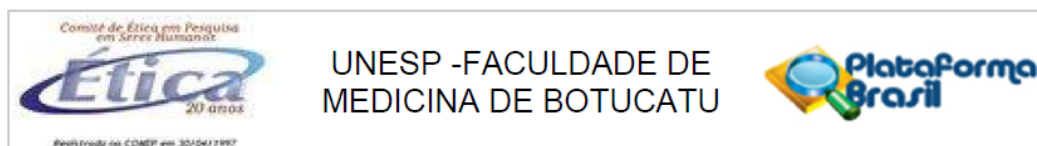
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.206.729

Cronograma	Cronograma.docx	14/06/2017 19:36:30	BENEDITO DE SOUSA ALMEIDA FILHO	Aceito
------------	-----------------	------------------------	---------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Agosto de 2017

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
 (Coordenador)