



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PÂMELA LONARDONI MICHELETTI

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE VITAMINA D E MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS E DE TOXICIDADE AO TRATAMENTO  
QUIMIOTERÁPICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA**

---

Londrina  
2018

PÂMELA LONARDONI MICHELETTI

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE VITAMINA D E MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS E DE TOXICIDADE AO TRATAMENTO  
QUIMIOTERÁPICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Isaias Dichi.

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Micheletti, Pâmela Lonardoni.

AVALIAÇÃO DO STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE TOXICIDADE AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA / Pâmela Lonardoni Micheletti. - Londrina, 2018.

116 f. : il.

Orientador: Isaías Dichi.

Coorientador: Carolina Panis.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de mama - Tese. 2. Vitamina D - Tese. 3. Cardiotoxicidade - Tese. 4. Prognóstico - Tese. I. Dichi, Isaías. II. Panis, Carolina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

PÂMELA LONARDONI MICHELETTI

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE VITAMINA D E MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS E DE TOXICIDADE AO TRATAMENTO  
QUIMIOTERÁPICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Isaías Dichi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra Carolina Panis  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE

---

Profa. Dra. Ana Cristina do Amaral Herrera  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -  
PUCPR

---

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Bruno Ricardo Barreto Pires  
Instituto Nacional de Câncer - INCA

Londrina, 21 de junho de 2018

PÂMELA LONARDONI MICHELETTI

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE VITAMINA D E MARCADORES  
INFLAMATÓRIOS E DE TOXICIDADE AO TRATAMENTO  
QUIMIOTERÁPICO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA (SUPLENTES)**

---

Prof. Dr. Marcell Lozovoy  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de junho de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Nossa Senhora e São Miguel Arcanjo, por me abençoarem durante todo esse processo e me permitirem concluir este trabalho.

Aos meus pais, Anita e Julio, por todo apoio, incentivo e orações, sem os quais não teria tornado esse momento possível e aos quais serei eternamente grata.

À minha Família, principalmente minha irmã Marcela, por ter cuidado com todo carinho dos meus Filhos, para que pudesse me ausentar e realizar meus estudos.

Ao meu marido, Paulo Augusto Farina, por todo apoio, calma e por sempre estar ao meu lado durante esse período.

Aos meus Filhos, Thomas, Benjamin e Alice, que são a razão do meu viver e que um dia compreenderão os motivos da minha ausência.

Ao meu orientador Professor Dr. Isaías Dichi por aceitar me orientar e por todo apoio concedido.

À minha coorientadora Professora Dra. Carolina Panis pela confiança, dedicação, carinho e amizade.

Aos Professores Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy e em especial à professora Dra. Andrea Name Colado Simão que sempre estiveram à

disposição para me ajudar e me coorientar com muita sabedoria, paciência e dedicação.

À Daniela Frizon Alfieri e Tamires Flauzino por toda ajuda e amizade nos trabalhos realizados no laboratório que certamente contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Naiara Mari e Letícia Gordan pela amizade e parceria. Foi muito bom ter vocês ao meu lado durante esses anos de doutorado.

Aos meus amigos Brunna França Robles, Nicole Stadtlober, Lorena Flor, Camila Cataldi, Bruno Shekigushi, Bruna Miglioranza e Ana Gabriela, que me ajudaram na a realização deste trabalho e elogiaram os bolos que levei ao Laboratório.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Às pacientes e seus familiares.

À minha Avó Maria (*in memoriam*), por todo exemplo, sabedoria e orações.

*“Só no plano do indivíduo autoconsciente é que o conhecimento pode adquirir validade: só na consciência individual vivente se realiza a prova apodíctica, só o indivíduo tem acesso efetivo às verdades universais, enquanto a coletividade deve se contentar com fórmulas mais ou menos convencionais — ou consensuais — de uma verdade meramente potencial.”*

*Olavo de Carvalho*

MICHELETTI, Pâmela Lonardon. **Avaliação do status de vitamina d e marcadores inflamatórios e de toxicidade ao tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de mama.** 116 f. Tese (Doutorado do Programa Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** O câncer da mama ainda é a forma mais comum de câncer entre as mulheres, ocupando o primeiro lugar em incidência no Brasil. É uma doença multifatorial, podendo ser adquirida no decorrer da vida ou por transmissão hereditária. Diante da necessidade de se diagnosticar precocemente mulheres com câncer de mama, é imprescindível avaliar marcadores prognósticos que são capazes de prever o desfecho da doença como a vitamina D, bem como identificar antecipadamente a cardiotoxicidade que é um dos efeitos tóxicos da quimioterapia responsável por altas taxas de mortalidade.

**Artigo 1:** O objetivo do trabalho foi avaliar os níveis plasmáticos da 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) ao diagnóstico e verificar sua relação com parâmetros clínicos e prognósticos em mulheres com câncer de mama e sua relação com a agressividade da doença. Esse estudo envolveu um total de 147 mulheres com carcinoma ductal infiltrativo da mama. Foram coletadas amostras de sangue e as pacientes foram submetidas a procedimentos cirúrgicos para coleta do tumor. As biópsias de tumor foram classificadas por imunohistoquímica em 4 subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER 2 positivo e triplo negativo. A 25(OH)D foi avaliada em amostras de plasma usando um kit comercial à base de quimioluminescência (Architect™, Abbot). Os resultados foram comparados pelo teste t de Student ou pelo teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição das variâncias. A média de idade ao diagnóstico foi de 56,1 anos. Foi observado que menores níveis plasmáticos de vitamina D ao diagnóstico estavam relacionados a marcadores clínicos de pior prognóstico como: invasão linfonodal ( $23,69 \pm 0,94$  ng/mL em linfonodos negativos e  $20,34 \pm 1,3$  ng/mL em linfonodos positivos,  $p = 0,0390$ ), quimiorresistência ( $20,45 \pm 1,32$  ng/mL em quimiorresistente e  $23,54 \pm 0,83$  ng/mL em quimiorresponsiva,  $p = 0,0454$ ), metástases ( $20,58 \pm 1,18$  ng/mL em pacientes metastáticos e  $23,61 \pm 0,94$  ng/mL naqueles sem metástase,  $p = 0,05$ ), portadoras de tumores triplo-negativos quando comparados aos tumores luminais ( $23,42 \pm 0,99$  ng/mL em triplo negativos e  $17,17 \pm 2,89$  ng/mL em tumores luminais A,  $p = 0,0409$ ), e óbito nos dois primeiros anos do diagnóstico ( $23,62 \pm 0,80$  ng/mL em pacientes vivas 2 anos após o diagnóstico e  $19,71 \pm 1,54$  ng/mL em pacientes que morreram,  $p = 0,0197$ ). O estudo mostrou que níveis plasmáticos mais baixos de 25(OH)D no momento do diagnóstico estão diretamente associados a marcadores clínicos de mau prognóstico em câncer de mama. Em conclusão, os níveis reduzidos de vitamina D no plasma ao diagnóstico de câncer de mama podem ser um marcador plausível do prognóstico da doença.

**Artigo 2:** O presente estudo teve como objetivo avaliar marcadores do dano cardíaco (CK total, CKMB e PCR), marcadores inflamatórios (ferro livre, homocisteína e TNF- $\alpha$ ) bem como o lipidograma em pacientes com câncer de mama submetidas a ciclos agudos de doxorubicina, paclitaxel ou trastuzumabe e verificar se existe associação entre esses marcadores e a toxicidade ao tratamento quimioterápico. Foram incluídas no estudo 120 pacientes com câncer de mama e 50

controles saudáveis. Todas as análises foram realizadas em sistemas automatizados, e o TNF- $\alpha$  foi avaliado por método imunoenzimático (ELISA, eBioscience). Para as análises estatísticas cada grupo foi comparado com os controles de acordo com sua normalidade pelo teste t de Student e teste de Mann-Whitney. Nossos resultados mostraram que níveis plasmáticos aumentados de CK-MB foram encontrados no grupo tratado com paclitaxel e naqueles tratados com trastuzumabe quando comparados aos controles (CTR  $1,26\pm 0,338$  U/L; DOX  $5,208\pm 2,73$  U/L; PTX  $8,78\pm 4,2$  U/L, TZ  $6,9\pm 1,97$  U/L,  $p < 0,001$ ). Os níveis plasmáticos de hsPCR foram significativamente maiores nos três grupos após os tratamentos (CTR  $0,66\pm 0,18$  mg/dL; DOX  $4,80\pm 1,23$  mg/dL,  $p = 0,0005$ ; PTX  $7,12\pm 1,87$  mg/dL,  $p = 0,0006$ ; TZ  $3,12\pm 0,68$  mg/dL,  $p = 0,095$ ). O lipidograma mostrou um aumento significativo nos níveis de colesterol total em pacientes tratados com paclitaxel (PTX  $201,7\pm 19,54$ ,  $p = 0,05$ ) e trastuzumabe (TZ  $218,3\pm 16,79$ ,  $p = 0,0317$ ), em relação aos controles saudáveis (CTR Colesterol  $167,1\pm 7,85$ ); e nos níveis de triglicerídeos (DOX  $187,6\pm 25,06$ ,  $p = 0,0231$ , PTX  $201,7\pm 19,54$ ,  $p = 0,0277$ , TZ  $218,3\pm 16,79$ ,  $p = 0,0127$ ), em relação aos controles (CTR Triglicerídeos  $137,9\pm 5,24$ ). A análise do TNF- $\alpha$  circulante mostrou aumento dessa citocina em todos os grupos tratados quando comparados aos controles (CTR  $9,47\pm 1,56$  pg/mL; DOX  $42,31\pm 17,96$  pg/mL,  $p = 0,01$ ; PTX  $38,27\pm 9,12$  pg/mL,  $p = 0,023$  e TZ  $89,6\pm 12,11$ ,  $p = 0,032$ ). Os níveis plasmáticos de homocisteína foram significativamente aumentados nos três grupos tratados em relação aos controles saudáveis (CTR  $7,80\pm 0,397$   $\mu$ mol/L; DOX  $9,11\pm 0,83$   $\mu$ mol/L,  $p = 0,021$ ; PTX  $10,95\pm 0,86$   $\mu$ mol/L,  $p = 0,005$  e TZ  $9,95\pm 1,15$   $\mu$ mol / L,  $p = 0,0396$ ). Ferro livre também foi encontrado significativamente elevado em todos os grupos (CTR  $89,17\pm 9,5$  ug/dL; DOX  $138,8\pm 18,6$  ug/dL,  $p = 0,0193$ ; PTX  $113\pm 18,6$  ug/dl,  $p = 0,045$  e TZ  $120,5\pm 4,64$  ug/dl,  $p = 0,0058$ ). Nossos dados demonstraram que marcadores de rotina de avaliação do dano cardíaco como CKMB e PCR apresentam-se alterados no sangue após o tratamento agudo em pacientes com câncer de mama. Bem como o lipidograma e marcadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , homocisteína e ferro livre. Após as análises sugere-se que marcadores de rotina de lesão cardíaca apresentam indícios de que poderiam ser usados como possíveis indicadores de cardiotoxicidade induzida pelas drogas usadas na quimioterapia.

**Palavras chave:** Câncer de mama. Prognóstico. Vitamina D. Quimioterapia. Toxicidade.

MICHELETTI, Pamela Lonardoni. **Evaluation of vitamin d status and inflammatory and toxicity markers to chemotherapeutic treatment in patients with breast cancer.** 116 p. Thesis (Doctoral Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer is still the most common form of cancer among women, ranking first in incidence in Brazil. It is a multifactorial disease that can be acquired during the course of life or through hereditary transmission. Given the need to diagnose women with breast cancer early, it is essential to evaluate prognostic markers that are capable of predicting the outcome of the disease such as vitamin D, as well as to identify in advance cardiotoxicity, which is one of the toxic effects of chemotherapy responsible for high rates mortality.

### Article 1:

The objective of this study was to evaluate the plasma levels of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) in the diagnosis and to verify its relation with clinical and prognostic parameters in women with breast cancer and its relation with the aggressiveness of the disease. This study involved a total of 147 women with infiltrative ductal carcinoma of the breast. Blood samples were collected and the patients underwent surgical procedures to collect the tumor. Tumor biopsies were classified by immunohistochemistry into 4 molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER 2 positive and triple negative. 25 (OH) D was evaluated on plasma samples using a commercial chemiluminescent kit (Architect™, Abbot). The results were compared by Student's t-test or the Mann-Whitney test, according to the variance distribution. The mean age at diagnosis was 56.1 years. It was observed that lower plasma levels of vitamin D at diagnosis were related to clinical markers of worse prognosis such as lymph node invasion ( $23.69 \pm 0.94$  ng / mL in negative lymph nodes and  $20.34 \pm 1.3$  ng / mL in lymph nodes positive,  $p = 0.0390$ ), chemoresistance ( $20.45 \pm 1.32$  ng / mL in chemoresistant and  $23.54 \pm 0.83$  ng / mL in chemoresponsive,  $p = 0.0454$ ), metastases ( $20.58 \pm 1.18$  ng / mL in metastatic patients and  $23.61 \pm 0.94$  ng / mL in those without metastasis,  $p = 0.05$ ), with triple-negative tumors compared to luminal tumors ( $23.42 \pm 0.99$  ng / mL in triple negatives and  $17.17 \pm 2.89$  ng / mL in luminal tumors A,  $p = 0.0409$ ), and death in the first two years of the diagnosis ( $23.62 \pm 0.80$  ng / mL in patients alive 2 years after diagnosis and  $19.71 \pm 1.54$  ng / mL in patients who died,  $p = 0.0197$ ). The study showed that lower plasma 25(OH)D levels at the time of diagnosis are directly associated with clinical markers of poor prognosis in breast cancer. In conclusion, reduced levels of vitamin D in plasma to the diagnosis of breast cancer may be a plausible marker of the prognosis of the disease.

**Article 2:** The present study aimed to evaluate markers of cardiac damage (total CK, CKMB and CRP), inflammatory markers (free iron, homocysteine and TNF- $\alpha$ ) as well as lipidogram in breast cancer patients undergoing acute cycles of doxorubicin, paclitaxel or trastuzumab and to verify if there is an association between these markers and the toxicity to the chemotherapeutic treatment. Included in the study were 120 breast cancer patients and 50 healthy controls. All analyzes were performed in automated systems, and TNF- $\alpha$  was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience). For the statistical analyzes, each group was compared with the controls according to their normality by Student's t-test and Mann-Whitney test. Our results showed that increased plasma levels of CK-MB were

found in the paclitaxel treated group and in those treated with trastuzumab when compared to controls (CTR  $1.26 \pm 0.338$  U / L, DOX  $5.208 \pm 2.73$  U / L, PTX  $8, 78 \pm 4.2$  U / L, TZ  $6.9 \pm 1.97$  U / L,  $p < 0.001$ ). Plasma levels of hsPCR were significantly higher in the three groups after treatments (CTR  $0.66 \pm 0.18$  mg / dL, DOX  $4.80 \pm 1.23$  mg / dL,  $p = 0.0005$ , PTX  $7.12 \pm 1.87$  mg / dL,  $p = 0.0006$ , TZ  $3.12 \pm 0.68$  mg / dL,  $p = 0.095$ ). The lipidogram showed a significant increase in total cholesterol levels in patients treated with paclitaxel (PTX  $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.05$ ) and trastuzumab (TZ  $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0317$ ), in relation to healthy controls (CTR Cholesterol  $167.1 \pm 7.85$ ); and in triglyceride levels (DOX  $187.6 \pm 25.06$ ,  $p = 0.0231$ , PTX  $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.0277$ , TZ  $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0127$ ), in relation to the controls (CTR Triglycerides  $137.9 \pm 5.24$ ). Analysis of circulating TNF- $\alpha$  showed an increase in this cytokine in all treated groups compared to controls (CTR  $9.47 \pm 1.56$  pg / mL, DOX  $42.31 \pm 17.96$  pg / mL,  $p = 0.01$ ; PTX  $38.27 \pm 9.12$  pg / mL,  $p = 0.023$  and TZ  $89.6 \pm 12.11$ ,  $p = 0.032$ ). Plasma levels of homocysteine were significantly increased in the three treated groups relative to healthy controls (CTR  $7.80 \pm 0.397$   $\mu$ mol / L, DOX  $9.11 \pm 0.83$   $\mu$ mol / L,  $p = 0.021$ , PTX  $10.95 \pm 0, 86$   $\mu$ mol / L,  $p = 0.005$  and TZ  $9.95 \pm 1.15$   $\mu$ mol / L,  $p = 0.0396$ ). Free iron was also found to be significantly elevated in all groups (CTR  $89.17 \pm 9.5$   $\mu$ g / dL, DOX  $138.8 \pm 18.6$   $\mu$ g / dL,  $p = 0.0193$ , PTX  $113 \pm 18 6$   $\mu$ g / dL,  $p = 0.045$  and TZ  $120.5 \pm 4.64$   $\mu$ g / dl,  $p = 0.0058$ ). Our data demonstrated that routine markers of evaluation of cardiac damage such as CKMB and CRP are altered in the blood after acute treatment in patients with breast cancer. As well as lipidogram and pro-inflammatory markers such as TNF- $\alpha$ , homocysteine and free iron. After the analyzes, it is suggested that routine cardiac injury markers show indications that they could be used as possible indicators of drug-induced cardiotoxicity used in chemotherapy.

**Keywords:** Breast cancer. Prognosis. Vitamin D. Chemotherapy. Toxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH)2D	<i>1,25-dihydroxyvitamin D</i> (1,25-dihidroxivitamina D)
25(OH)D	<i>25-hydroxyvitamin D</i> (25-hidroxivitamina D)
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BNP	Peptídeo Natriurético Do Tipo B
BRCA1	<i>Breast Cancer Type 1</i> (Câncer de mama tipo 1)
BRCA2	<i>Breast Cancer Type 2</i> (Câncer de mama tipo 2)
CCNB1	<i>Cyclin B1</i> (Ciclina B1)
CK	Creatinaquinase
CK-MB	Creatinofosfo-quinase Isoenzima MB
CRP	<i>C-reactive protein</i> (Proteína C reativa)
CTR	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
ER	<i>Estrogen Receptor</i> (Receptor de Estrogênio)
FEVE	Fração De Ejeção Do Ventrículo Esquerdo
GGT	Gama Glutamiltransferase
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> (receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano)
IDC	<i>Infiltrating Ductal Carcinoma</i> (carcinoma ductal infiltrante)
IgG1	Imunoglobulina G 1
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Ki-67	Antígeno nuclear Ki-67
LN	Linfonodo
M	Presença de metástases à distância
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i> (Minuto Duplo Murino 2)
miRNA	microRNA
MKI67	<i>Marker of Proliferation Ki-67</i> (Marcador de proliferação Ki-67)
MYBL2	<i>MYB Proto-Oncogene Like 2</i> (MYB Proto-Oncogene tipo 2)
N	Envolvimento de linfonodos regionais

OMS	Organização Mundial da Saúde
PTX	Paclitaxel
PR	<i>Progesterone Receptor</i> (Receptor de Progesterona)
RNA	Ácido Ribonucleico
T	Tumor primário
TNF- $\alpha$	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TZ	Trastuzumab
UVB	Ultravioleta B
VDBP	<i>Vitamin D Binding Protein</i> (Proteína de Ligação à Vitamina D)
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (Receptor de vitamina D)

## SUMÁRIO


<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1.	Câncer de Mama – Epidemiologia	15
1.2.	Fatores clinicopatológicos e prognóstico no câncer de mama	19
1.3.	Marcadores clinicopatológicos emergentes no câncer de mama	32
1.3.1.	Vitamina D como potencial marcador no câncer de mama	33
1.3.1.1.	Metabolismo da vitamina D	33
1.3.1.2.	Vitamina D como fator prognóstico no câncer de mama	38
1.3.2.	Marcadores de toxicidade ao tratamento quimioterápico	43
1.3.2.1.	Tratamento do câncer de mama	43
1.3.2.2.	Marcadores de toxicidade	50
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>55</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>56</b>
3.1.	Objetivos específicos	56
<b>4.</b>	<b>CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
4.1.	Delineamento	57
4.2.	Aspectos éticos	57
4.3.	População	57
4.4.	Amostra	57
4.5.	Critérios de Exclusão	58
4.6	Exames Laboratoriais	58
4.6.1	Vitamina D	58
4.6.2	Marcadores de toxicidade cardíaca	59
4.6.3	Marcadores inflamatórios	59
4.7	Análise Estatística	59
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>ARTIGO 1</b>		<b>61</b>
<b>ARTIGO 2</b>		<b>78</b>

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de Mama – Epidemiologia

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres e tem altas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo, inclusive no Brasil (TORRE et al., 2012; CECILIO et al., 2015). O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima, para o Brasil, 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco considerado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres o que representa 29,5% de todos os tipos de câncer diagnosticados na população feminina (Figura 1). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil). Só em 2015, no Brasil, ocorreram 15.403 óbitos por câncer de mama (INCA 2018).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2018).

De acordo com avaliação do INCA, o Estado do Paraná deve registrar em 2018 perto de 3.730 novos casos de câncer de mama (cerca de 64,70 casos da doença para cada 100 mil habitantes – taxa bruta) (Figura 2), o que dá uma média de aproximadamente 10 diagnósticos por dia. Esse número permanece invariável desde 2016. Curitiba, a capital do estado, ficaria responsável por 820 dessas ocorrências (cinco diagnósticos a cada dois dias). Também de acordo com esse instituto, os três tipos de câncer mais recorrentes nas mulheres do estado do Paraná são o de mama, ovário e colo de útero. Juntos serão responsáveis por mais de

4.930 novos registros de neoplasias nas mulheres paranaenses em 2018, sendo o câncer de mama o mais prevalente (INCA 2018).

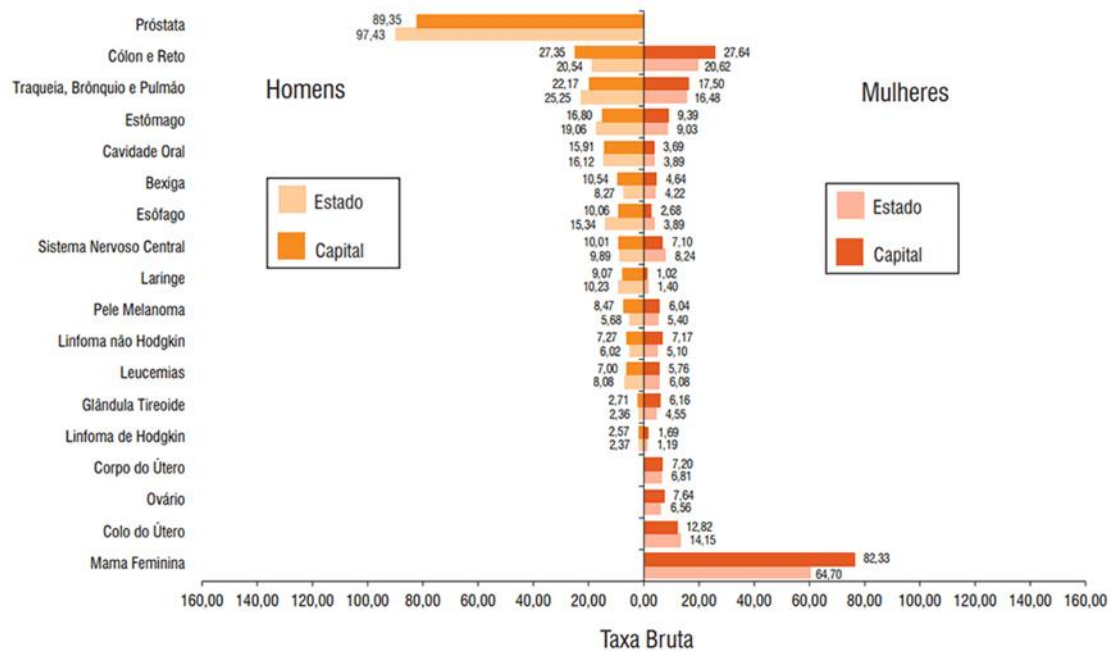


Figura 2: Incidência de câncer de mama por sexo estimada para 2018 no estado do Paraná (INCA 2018).

A incidência dessa neoplasia tem aumentado a nível mundial. Contudo, nos países desenvolvidos, a incidência alcançou um equilíbrio acompanhado de queda nos últimos anos. Além disso, nesses países, as percentagens de mortalidade apresentaram uma tendência de declínio, mostrando uma combinação de melhoria devido a detecção precoce, por meio de rastreamento populacional, e intervenções terapêuticas mais eficazes (STEWART; WILD, 2014).

Alguns fatores que podem influenciar o risco de desenvolver o tumor no tecido mamário são idade precoce na menarca (menor que 12 anos) - o que implica o início de um padrão hormonal maduro, incluindo o início da ovulação, alterações hormonais cíclicas e menstruação - tem sido continuamente relacionado a um aumento do risco de desenvolver câncer de mama, (aumento de 5% no risco para cada ano de antecipação da menarca) (HANKINSON; TAMIMI; HUNTER, 2008; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2012; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018) e menopausa tardia (após os 55 anos) (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013). Fatores reprodutivos adicionais que aumentam o risco compreendem nuliparidade (nunca ter filhos), primeira gestação após os 30

anos de idade (COLDITZ; BAER; TAMINI, 2006; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018), níveis elevados de hormônios sexuais, uso de contraceptivos e a amamentação por um período inferior a um ano. A terapia de reposição hormonal também pode aumentar os riscos de desenvolver câncer de mama (*WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS*, 2002; HOLMBERG; ANDERSON, 2004; BOFF; WISINTAINER, 2006; SHANTAKUMAR et al., 2007; MOSCONI et al., 2009; MØRCH et al. 2017). Todos esses aspectos acima mencionados mostram um papel da dose permanente da exposição aos hormônios sexuais endógenos e exógenos ao longo da vida, onde quanto maior o período de tempo de produção hormonal, maior o risco de desenvolver o câncer de mama (McPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

Os fatores de risco relacionados ao estilo de vida são o consumo de álcool, com um aumento no risco de 20% para mulheres com consumo moderado e de 60% para consumo excessivo (*WORLD CANCER RESEARCH*, 2007; BAGNARDI et al., 2015; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018), ganho de peso após os 18 anos e/ou estar com sobrepeso ou obesidade e sedentarismo (*WORLD CANCER RESEARCH*, 2007; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018). Fatores associados à história médica mostram um aumento de 67% do risco de desenvolver câncer de mama em mulheres com histórico familiar da doença em parentes de primeiro grau. O risco aumenta duas vezes se houver mais de um parente afetado pela doença (COLDITZ; BAER; TAMINI, 2006; *COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST*, 2012; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018). Mutações hereditárias nos genes BRCA1 e BRCA2 (herança autossômica dominante) constitui de 5–10% de todos casos de câncer de mama feminina (KRAINER et al., 1997; MARTIN; WEBER, 2000; CASTERA et al. 2014). A densidade mamográfica, que é a porcentagem geral de tecido denso (tecido não adiposo) analisado na mamografia, também está relacionada ao risco de desenvolver câncer de mama sendo influenciada por fatores hormonais, reprodutivos e de estilo de vida (HANKINSON; TAMIMI; HUNTER, 2008; MASALA et al., 2017; BRAVI; DECARLI; RUSSO, 2018). Outros fatores que influenciam o aparecimento da doença são certas condições benignas da mama, tal como hiperplasia atípica, alta dose de radiação no peito em idade jovem (por exemplo, para tratamento de linfoma), e diabetes tipo 2 (independente da obesidade) (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013; STEWART; WILD, 2014).

Embora seja classificado como um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado apropriadamente, as taxas de letalidade por câncer de mama permanecem altas no Brasil. Nos países de baixa e média renda, o diagnóstico do câncer de mama ocorre em estágios mais avançados da doença, aumentando a morbidade relacionada ao tratamento, comprometendo a qualidade de vida e reduzindo a sobrevida das pacientes. A mamografia bienal para as mulheres, na faixa etária de 50 a 69 anos, é a estratégia de acompanhamento indicada para o controle do câncer de mama no Brasil (INCA, 2018). A mamografia é um método efetivo de rastreamento para detecção precoce do câncer de mama constituindo a técnica ideal para identificação de lesões subclínicas (SMITH et al. 2003; *AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2018). Assim a constatação precoce do câncer de mama é fundamental para que ocorra uma redução da mortalidade pela doença, pois o prognóstico das pacientes está diretamente relacionado ao estágio da doença no momento do diagnóstico.

Na América Latina, Allemani e colaboradores (2015), com o estudo CONCORD-2 (*Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study*), encontraram um aumento nos índices de sobrevida câncer-específica entre 1995-1999 e 2005-2009, principalmente no Brasil, de 78% para 87%, respectivamente. No Brasil, em referência à sobrevida global, em 10 anos poucos estudos aferiram informações coletadas em registros de base populacional, demonstrando sobrevida global de 41,5% entre 1998 e 2000 e de 57,8% entre 1995 e 2003 (NUNES, 2011). Estes dados, mesmo exíguos, diferem substancialmente em relação a países desenvolvidos provavelmente em consequência da carência de um programa eficiente de rastreamento populacional e por uma cobertura mamográfica inapropriada no Brasil. Segundo a *AMERICAN CANCER SOCIETY*, 2018, na população mundial, a sobrevida média depois de cinco anos da doença é de 61% e nos países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 78%. Em 2016, segundo dados do *American Cancer Society*, o percentual de sobrevida em 5, 10 e 15 anos para o câncer de mama são 89%, 83%, e 78%, respectivamente. Nos Estados Unidos ocorreu uma queda expressiva da mortalidade por câncer de mama a contar do ano 2000. Essa diminuição foi atribuída pela redução na terapia de reposição hormonal e pelo rastreamento mamográfico populacional o que proporcionaram uma redução na taxa de mortalidade geral de câncer de mama de 36% de 1989-2012,

isso se deve também a melhorias na detecção precoce e tratamentos mais eficazes para a doença (KERLIKOWSKIE, 2010; MILLER; BEN-AHARON; HAINES, 2012; TORIOLA; COLDITZ, 2013).

## **1.2. Fatores clinicopatológicos e prognóstico no câncer de mama**

Um fator prognóstico poderia ser definido como um parâmetro possível de ser mensurado no momento do diagnóstico e que serviria como preditor da sobrevida ou do tempo livre de doença (DONEGAN, 1979). A heterogeneidade da história natural do câncer de mama é conhecida, contudo seus fatores determinantes ainda continuam desconhecidos. Sendo o câncer de mama um tumor onde seu desenvolvimento se processa de forma relativamente lenta, a possibilidade de se estabelecer o diagnóstico ainda em fase precoce é elevada (CLARK, 1996).

Dhingra e Hortobagyi (1996) organizaram os eventuais fatores prognósticos do câncer de mama em quatro grupos, aos quais denominam geração. Na primeira geração são incorporados os fatores anatômicos (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos, subtipos histológicos, idade, etc.); na segunda geração estão contidas as propriedades patológicas quantitativas (grau histológico, necrose tumoral, ploidia, índice mitótico, etc.) e responsividade endócrina (receptores hormonais de estrogênio e progesterona); na terceira geração são agrupados os fatores moleculares específicos-reguladores do crescimento (amplificadores de oncogenes – ex: *neu/C-erbB-2*, *myc*; e supressores de genes – ex: p53, nm23), as proteases (como a catepsina D); por fim, na quarta geração são compreendidos os preditores de metástases específicos para os distintos órgãos (micrometástases em medula óssea, polimorfismo de *L-myc*, *Vimentin*). Sua aplicação baseia-se nas recomendações de consensos multidisciplinares como do *College of American Pathologists* e do *American Society of Clinical Oncology* (*NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH*, 1991; MITTENDORF et al., 2014).

Como na maioria dos cânceres, a idade é o principal fator de risco para câncer de mama. De acordo com o *15th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015*, a neoplasia maligna da mama é a principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres com 40 anos ou menos em países desenvolvidos, onde as taxas de sobrevivência de mulheres jovens com câncer de mama é menor do que para mulheres mais velhas. As pacientes jovens são mais

propensas a desenvolver subtipos mais agressivos de câncer de mama e doença HER2 positiva e também apresentam doença em estágio mais avançado. A idade jovem é um fator de risco independente para recidiva e morte da doença (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). Existem diferenças entre as mulheres jovens diagnosticada com câncer de mama que afetam a conduta do tratamento, devendo levar em consideração o *status* pré-menopausal no momento do diagnóstico, preocupações com fertilidade, genética e questões emocionais que devem ser consideradas. Já em pacientes idosas o desafio é equilibrar o tratamento eficaz contra comorbidades potenciais e minimizar o tratamento excessivo. A incidência de câncer de mama continua a aumentar, particularmente em mulheres mais velhas, e a mediana que a expectativa de vida de uma paciente que foi diagnosticada aos 70 anos é de 16 anos, uma mulher diagnosticada aos 80 anos tem uma perspectiva de aproximadamente 10 anos (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015).

O estado dos linfonodos axilares é fator prognóstico respeitável na falta de metástases à distância e está intimamente correlacionado com a progresso da doença. É, no entanto, um fato, amplamente observado, que, na sua grande maioria, as pacientes linfonodo axilares positivas apresentam uma sobrevida geral menor que a aquelas cujos linfonodos axilares não apresentam envolvimento metastático no momento da cirurgia. O prognóstico torna-se pior à medida que aumenta o número de linfonodos positivos (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989; HODA, 2014). O tamanho do tumor juntamente com a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama, sendo fatores indicadores relevantes referente à sobrevida global. O risco de recorrência da doença aumenta proporcionalmente à medida que o tamanho do tumor aumenta (BLAMEY et al., 2010; IN EDGE et al., 2010). É certo também que o tamanho do tumor está diretamente relacionado ao risco de recidiva, sendo que, nos casos de pacientes com ausência de comprometimento dos linfonodos, o tamanho do tumor torna-se o melhor preditor desta reincidência e quanto maior o seu tamanho, maiores são as chances da existência de comprometimento metastático dos linfonodos loco-regionais (VALAGUSSA; BONADONNA; VERONESI, 1978; PALMER; LYTHGOE; SMITH, 1982).

Os carcinomas de mama invasivos são classificados baseados em suas características morfológicas, como tipo histológico ou grau de diferenciação sendo os dois significativos marcadores prognósticos. Hoje em dia, orienta-se utilizar o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizado em 2012, que reconhece mais de 20 diferentes tipos histológicos (tabela 1) (ELLIS et al., 1992; LAKHANI et al., 2012). O carcinoma ductal infiltrante e o carcinoma lobular infiltrante, são as formas mais comuns de carcinoma de mama. O grau histológico do mesmo modo é um considerável elemento da avaliação patológica e retrata o potencial de malignidade do tumor sinalizando a sua maior ou menor habilidade de metastatização. A graduação histológica de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (1993) conhecida como o Sistema de Classificação de Nottingham é o sistema de gradação largamente adotado nos EUA, na Europa e em diversas partes do mundo (PATHOLOGY TAVASSOLI; DEVILEE, 2003; REPORTING OF BREAST DISEASE, 2005). Tal sistema de categorização fundamenta-se na análise semiquantitativa das qualidades morfológicas do tumor, abrangendo a formação dos túbulos, o pleomorfismo e a contagem mitótica. Toda particularidade é avaliada e conferida um valor de 1 (favorável) a 3 (desfavorável), e as pontuações de todas as três categorias são somadas. Uma pontuação conjugada de 3-5 pontos é denominada como grau 1 (baixo grau), de 6 ou 7 pontos grau 2 (grau intermediário) e de 8 ou 9 pontos grau 3 (alto grau) (ELSTON; ELLIS, 1993). Indicadores prognósticos para câncer de mama que utilizam a combinação de estadiamento da doença e grau histológico são comumente empregados, o que melhora a predição do resultado.

Tabela 1: Tipos de tumores epiteliais segundo a 4ª edição (2012) da Classificação Histológica de Tumores da Mama da OMS.

Tipos de tumores epiteliais
Carcinoma microinvasivo
Carcinoma mamário invasivo
Carcinoma ductal invasivo, SOE
Carcinoma tipo misto
Carcinoma pleomórfico
Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto
Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos
Carcinoma com elementos melanóticos
Carcinoma lobular invasivo

---

Carcinoma lobular clássico

Carcinoma lobular sólido

Carcinoma lobular alveolar

Carcinoma lobular pleomórfico

Carcinoma túbulo-lobular

Carcinoma lobular misto

---

Carcinoma tubular

---

Carcinoma cribriforme invasivo

---

Carcinoma com elementos medulares

Carcinoma medular

Carcinoma medular atípico

Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares

---

Carcinoma mucinoso

---

Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete

---

Carcinoma micropapilar invasivo

---

Carcinoma com diferenciação apócrina

---

Carcinoma metaplásico sem tipo especial

Carcinoma adenoescamoso de baixo grau

Carcinoma metaplásico fibromatose-símile

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal

Diferenciação condroide

Diferenciação óssea

Carcinoma mioepitelial

---

OMS: Organização Mundial da Saúde; SOE: sem outra especificação

Fonte: GOBBI, 2012.

A utilização frequente do estadiamento possibilita a identificação concreta das opções de terapêutica e oferece informações prognósticas de base, podendo ser classificado em grupos prognósticos. No câncer de mama, para o estadiamento da doença, aplica-se a 8ª edição do sistema TNM do *American Joint Committee on Cancer 2018* (Tabela 2) (HORTOBAGYI et al., 2018), que avalia o tamanho e extensão do tumor local (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M), incorporado diretamente aos biomarcadores baseados na imunistoquímica e, eventualmente, nas ferramentas genômicas, demonstrando que o câncer de mama corresponde à várias entidades patológicas com comportamentos biológicos distintos e com curvas de sobrevida diferentes dentro de um mesmo volume de doença anatômica de acordo à biologia tumoral (ANDRADE, 2018). A inclusão dos marcadores biológicos melhora de forma expressiva a discriminação

prognóstica em relação ao estadiamento anatômico. O TNM 8<sup>a</sup>. edição entrou em vigor em 01/01/2018 (AMIN; EDGE; GREENE, 2017; BRIERLEY; GOSPODAROWICZM; WITTEKIND, 2017).

Tabela 2: Resumo da Classificação TNM do *American Joint Committee on Cancer 2018*.

<b>Sistema TNM</b>
<b>Definições do tumor primário (T) – clínico e patológico</b>
T0: Não há evidência de tumor primário
Tis (DCIS): Carcinoma ductal in situ
Tis (Paget): Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama
T1: Tumor ≤ 20 mm
T1mi: Tumor ≤ 1 mm
T1a: Tumor > 1 mm e ≤ 5 mm
T1b: Tumor > 5 mm e ≤ 10 mm
1c: Tumor > 10 mm e ≤ 20 mm
T2: Tumor > 20 mm e ≤ 50 mm
T3: Tumor > 50 mm
T4: Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica e/ou à pele (ulceração ou nódulos macroscópicos)
T4a: Tumor com extensão à parede torácica (costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui invasão do músculo peitoral de forma isolada)
T4b: Nódulos cutâneos satélites macroscópicos e/ou ulceração e/ou edema (inclusive "casca de laranja" /"peau d'orange").
T4c Tumor com presença de ambos acima (T4a e T4b associados)
T4d Carcinoma inflamatório
<b>Definições dos linfonodos regionais – clínico (cN)</b>
cNX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados (p. ex., por terem sido previamente removidos)
cN0: Ausência de metástase em linfonodos regionais
cN1: Metástase em linfonodo(s) axilar(es), nível I/II, móvel(eis)
cN2a: Metástase em linfonodo(s) axilar(es), nível I/II, fixos uns aos outros ou a outras estruturas
cN2b: Metástase apenas em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de metástase em linfonodo(s) axilar(es)
cN3a: Metástase em linfonodo(s) intraclavicular(es), nível III
cN3b: Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilar(es)
cN3c: Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)
<b>Definições dos linfonodos regionais – patológico (pN)</b>
pNX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos)
pN0: Ausência de metástase em linfonodos regionais ou presença de células tumorais isoladas (CTI)
pN0(i+): Células tumorais isoladas (depósito de células neoplásicas < 0,2 mm, < 200 células aproximadamente)
pN0(mol+): Achados moleculares positivo por RT-PCR e ausência de CTI
pN1mi: Micrometástase (depósito de células neoplásicas > 0,2 mm e ≤ 2,0 mm, > 200 células aproximadamente)
pN1a 1-3: linfonodo(s) axilar(es) comprometido(s) em nível I/II (pelo menos uma metástase > 2 mm)

---

pN1b: Metástase microscópica em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente

pN1c: pN1a e pN1b associados

pN2a: 4-9 linfonodos axilares comprometido(s) em nível I/II (pelo menos uma metástase > 2 mm)

pN2b: Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) detectada clinicamente, na ausência de metástase em linfonodos axilares

pN3a: ≥ 10 linfonodos axilares comprometidos em nível I/II (pelo menos uma metástase > 2 mm) ou Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es), nível III

pN3b: pN1a ou pN2a com metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) aos métodos de imagem (cN2b) ou pN2a na presença de linfonodos mamários internos com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente

pN3c: Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)

---

#### **Definições das metástases à distância (M)**

---

cM0: ausência de metástase sistêmica na avaliação pela história clínica e aos métodos de imagem (quando indicados).

cM1: presença de alteração clínica ou imaginológica suspeita de metástase sistêmica.

pM1: Para os casos que são cM1, e no qual a doença de cM1 foi confirmada por biópsia, então pM1 deve ser usado.

---

Fonte: ANDRADE, 2018

Posteriormente a atribuição dessas categorias, o câncer de mama pode ser classificado em cinco estágios (0-IV) (GRADISHAR et al., 2016, MINISTÉRIO DA SAÚDE (2018). O estadiamento anatômico poderá ser utilizado globalmente independentemente de se ter ou não os biomarcadores disponíveis (HORTOBAGYI et al., 2018).

- Estágio 0 - TIS N0 M0
- Estágio IA - T1 N0 M0
- Estágio IB - T0 N1mi M0
- Estágio IB - T1 N1mi M0
- Estágio IIA - T0 N1 M0
- Estágio IIA - T1 N1 M0
- Estágio IIA - T2 N0 M0
- Estágio IIB - T2 N1 M0
- Estágio IIB - T3 N0 M0
- Estágio IIIA - T0 N2 M0
- Estágio IIIA - T1 N2 M0
- Estágio IIIA - T2 N2 M0
- Estágio IIIA - T3 N1 M0

- Estágio IIIA - T3 N2 M0
- Estágio IIIB - T4 N0 M0
- Estágio IIIB - T4 N1 M0
- Estágio IIIB - T4 N2 M0
- Estágio IIIC - Qualquer T N3 M0
- Estágio IV - Qualquer T Qualquer N M1

\*T1 inclui T1mi.

\* Os tumores T0 e T1 com micrometástases linfonodais (N1mi) são definidos como estágio IB.

\* Os tumores T2, T3 e T4 com micrometástases linfonodais (N1mi) são definidos com categoria N1.

\* A designação pM0 não é válida; qualquer M0 é clínico.

\* Se um paciente apresentar doença M1 antes da terapia sistêmica neoadjuvante, o estágio é estágio

\* IV e permanece no estágio IV, independentemente da resposta à terapia neoadjuvante.

\* O estadiamento após a terapia neoadjuvante é indicada com um prefixo "yc" ou "yp" para a classificação T e N. Não há um grupo de estágio anatômico atribuído se houver uma resposta patológica completa (pCR) à terapia neoadjuvante, devendo ser reportado apenas como ypT0 ypN0 cM0.

(ANDRADE, 2018)

O modelo biológico do tumor é um instrumento relevante para o prognóstico e também para definir que modalidade de tratamento é o mais adequado para cada paciente, pois os tumores que exibem as mesmas particularidades patológicas clássicas podem ter condutas distintas manifestadas pela sua biologia (PARKER et al., 2009). A análise desses biomarcadores é uma condição fundamental na avaliação de todo câncer de mama diagnosticado, onde o perfil de expressão gênica teve um impacto considerável na compreensão da biologia do câncer de mama (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). Embora o perfil de expressão gênica seja o teste padrão-ouro para a subtipagem molecular do câncer de mama, no Brasil, a anatomia patológica conta com a imunohistoquímica, técnica tecidual *in situ*, empregada na determinação do tipo de expressão proteica e que é de grande valor para a patologia mamária atual (MARQUEZ et al., 2004; VAN DEN EYNDEN et al., 2006). A imunohistoquímica tem o benefício de analisar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor, podendo ser aplicada a pequenas porções de tecido como biópsias extraídas por agulha fina, com menores custos e com uma maior velocidade de execução (CHEANG et al., 2009).

Durante os últimos 15 anos 5 subtipos moleculares intrínsecos ao câncer de mama foram identificados e estudados intensivamente: Luminal A, Luminal B, HER-2-enriquecido, *Basal-like* e *Claudin-Low* (SORLIE et al., 2001). Estudos apontam um vínculo entre o estado hormonal do tumor e a evolução da doença (PAIK et al., 2004; DOWSETT et al., 2008). De acordo com o *15th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015*, dentre os tumores receptor hormonal positivo e HER-2 negativo, os subtipos Luminal A e B representam a grande maioria dos casos. Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais (SOTIRIOU et al., 2003).

Qualificam-se como luminais A os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER-2 (Figura 3) (PEROU et al., 2000; SOTIRIOU et al., 2003; SØRLIE et al., 2003). Estudos trazem ainda que esse subtipo deve exibir um índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (CHEANG et al., 2009; VODUC et al., 2010; KENNECKE et al., 2010). A expressão de RE indica um tumor indolente e de desenvolvimento lento com baixo percentual de recorrência. Os tumores RE positivo são comumente localizados em pacientes com idade avançada (DIAB; ELLEDGE; CLARK, 2000; ANDERSON et al., 2002) e bem individualizados histologicamente (FISHER et al., 1981). A expressão do RP é condicionada a presença de RE. Tumores expressando RP, mas não o RE são raros e representam 1% de todas as ocorrências de câncer de mama (VIALE et al., 2007). Os tumores do subtipo luminal B também exibem receptores hormonais positivos e não raramente apresentam alto índice proliferativo (Figura 3). São definidos por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de propagação celular, que compreendem a expressão de genes *MKI67* (Ki-67), *CCNB1* e *MYBL2*. Seu maior grau de proliferação celular acarreta um pior prognóstico em comparação com os tumores luminais A (SØRLIE et al., 2003). A expressão de RE, RP, HER-2 e o emprego do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (CHEANG et al., 2009). Comparado aos tumores Luminal A, os tumores Luminal B são caracterizados por uma maior expressão de genes relacionados a proliferação do ciclo celular e menor expressão de vários genes

relacionados ao lúmen, como o receptor de progesterona (RP) (SORLIE et al 2001). Clinicamente, Tumores Luminal B apresentam maiores taxas de resposta patológica após quimioterapia neoadjuvante, menor sobrevida livre de recorrência em 5 e 10 anos, independentemente da terapia sistêmica adjuvante em comparação com tumores Luminal A. A classificação Luminal A vs B, juntamente com o tamanho do tumor e o estado nodal, também prediz recidiva a distância dentro de 5 a 10 anos de seguimento e, portanto, pode informar decisões relativas à duração do tratamento de terapia endócrina (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015)

O subtipo HER-2 apresenta excessiva expressão da oncoproteína HER-2, entretanto mostra-se negativo para receptores hormonais (Figura 3) (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). A amplificação deste gene e a expressão de sua proteína estão presentes em 15 a 30% dos cânceres de mama e estão relacionados com alto grau histológico, RE negativo, taxa de proliferação elevada e evolução clínica agressiva (WOLFF et al., 2007; DENT et al., 2013). O gene *HER-2*, situado no cromossomo 17 que codifica a proteína p185, está implicado em múltiplas vias regulatórias, incluindo mobilidade celular, invasão, apoptose e proliferação celular, com vários efeitos na biologia do câncer de mama (ALMEIDA-FILHO et al., 2017). Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER-2 têm um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. Conseqüentemente, defende-se a inclusão do *status* de HER-2, concomitantemente com o *status* de outros fatores prognósticos, a uma decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica (WOLFF et al., 2007; VODUC et al., 2010); A positividade de HER-2 aparenta estar relacionada à resistência às terapias endócrinas. Assim, a relevância desse subtipo histológico na prática clínica também foi ressaltada pelo desenvolvimento de terapias alvo-específica contra esse receptor (trastuzumabe), melhorando satisfatoriamente o prognóstico dessas pacientes (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010).

O subtipo *basal-like*, na maior parte (80%), são tumores triplo-negativos por reação imuno-histoquímica. Por definição, todo câncer triplo-negativo não tem receptores de estrogênio e progesterona e não amplifica o gene *HER-2* (Figura 3) e também está acompanhado de um pior prognóstico. Ele mostra características histológicas típicas, como padrão de rápido crescimento, presença de áreas de necrose e infiltrado linfocítico denso. Como resultado, o tratamento adjuvante

disponível consiste apenas em quimioterapia (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). Os tumores triplo-negativos são vistos clinicamente como subtipo agressivo, com idade de apresentação mais precoce e requerem quimioterapia adjuvante para melhorar a sobrevida. De fato, os tumores triplo-negativos convencionais são carcinomas de alto grau histológico, com genomas complexos, altos níveis de instabilidade genética, e um alto grau de heterogeneidade intertumoral e intratumoral (GEYER et al, 2017). Quando comparado aos tumores da mama RE positivos, os tumores triplo-negativos têm distintas características genética e transcriptômica (*CANCER GENOME ATLAS NETWORK*, 2012) e estão significativamente associados ao gene *BRCA1*, a mutações germinativas (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010) e caracterizados por níveis de instabilidade genética e rearranjos estruturais (NIK-ZAINAL et al., 2016). Os tumores *Claudin-low*, também são tumores triplo-negativos, com baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e perda de E-caderina (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Sua frequência é estimada em 5% de todos os carcinomas de mama e sua origem está vinculada a células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias (PRAT; PEROU, 2011). Claudinas são proteínas transmembrana envolvidas na adesão entre as células, sendo que a *downregulation* de algumas delas está associada ao câncer de mama (ao que parece, por silenciamento epigenético), promovendo a migração celular e a invasão tecidual (BARROS; LEITE, 2015).

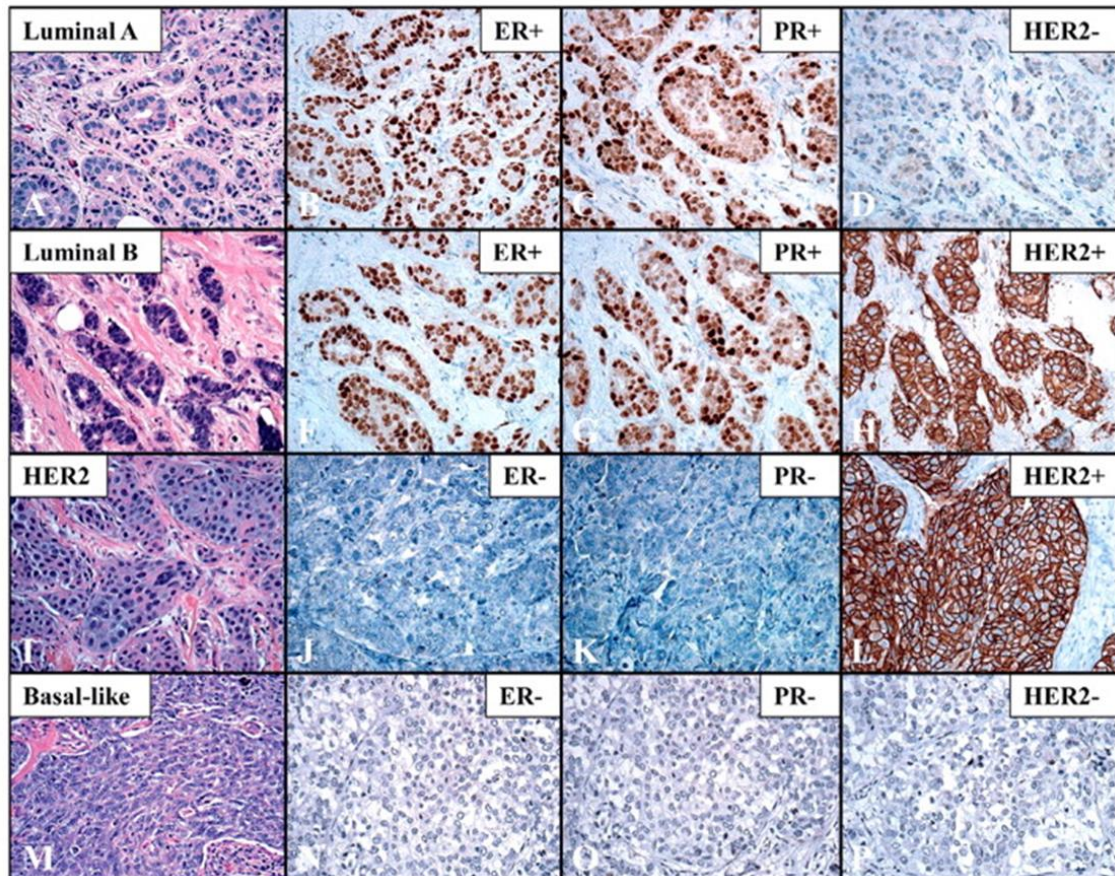


Figura 3: Diferença na expressão do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), entre os subtipos de câncer de mama. (SANDHU et al. 2010).

A taxa proliferativa de tumores é uma das propriedades do câncer de mama e indica uma inconsistência na proliferação e morte celular. O aumento da proliferação é uma característica dos tumores malignos e um parâmetro importante para a previsão da resposta terapêutica (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). O antígeno Ki67 foi detectado por Gerdes e colaboradores (1991) na cidade de Kiel (portanto “Ki”), como uma proteína nuclear não histona, após a imunização de ratos com linfoma de Hodgking da linhagem celular L428 (67 faz referência ao número do clone). A expressão do antígeno Ki67 acontece nas células em todas as fases ativas do ciclo celular e intensifica gradativamente até alcançar sua magnitude durante a mitose (VAN DIERENDONCK et al., 1989). Segundo esses mesmos autores, a falta de expressão de Ki67 em células quiescentes e sua expressão universal em tecidos que estão em divisão causaram um amplo interesse no seu emprego como marcador de proliferação celular. Hoje em dia, este antígeno é avaliado como um importante marcador na identificação do dinamismo proliferativo celular e é apropriado para prognosticar pacientes com câncer de mama. A expressão do Ki67

pode ser identificada por imunohistoquímica a partir de tecido fresco ou fixado e incluído em bloco de parafina. A percentagem de núcleos corados determina a taxa de proliferação celular (URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005). Um índice Ki67 alto ao diagnóstico está, na maioria das vezes, relacionado com desfavorável história natural da doença e pior prognóstico (*EARLY BREAST CANCER TRIALISTS*, 2005). Vários pontos de corte para Ki67 foram relatados como significativos e é muito difícil determinar o ponto de corte “ideal” baseado em evidências (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). Pressupõe-se que o ponto de corte para avaliar o valor prognóstico do Ki67 no carcinoma de mama inicial varie entre 15 a 22% (AHLIN et al., 2007).

Em 2013, a classificação em subtipos clínico-patológicos foi alterada na *13th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*, ponderando-se a avaliação semiquantitativa da expressão dos RP no progresso clínico e a resposta ao tratamento. Prat e colaboradores (2015) avaliaram o valor prognóstico da proporção de células que expressavam os genes e a proteína RP nos tumores classificados como luminais A. Esses mesmos autores mostraram que a baixa positividade dos RP (<20%) pela imunohistoquímica foi considerada um marcador para luminal B (Tabela 3) (PRAT et al., 2013). Deste modo, somente os tumores de melhor prognóstico foram classificados luminais A, restringindo proporcionalmente os cânceres classificados nessa categoria (GOLDHIRSCH et al., 2013).

O subtipo Luminal A está associado a baixo grau histológico e evolução clínica moderadamente lenta, com prognóstico mais satisfatório em comparação aos outros subtipos. Esse tipo de tumor é diagnosticado em 51% dos casos, sendo o de maior frequência (PRAT et al., 2015). O subtipo Luminal B tem menor expressão de genes ligados aos receptores hormonais e expressão mais alta de genes relacionados com a proliferação. Esse subtipo demonstra maior grau histológico e níveis mais baixos de expressão de receptores RE e RP. Cerca de 30% dos tumores luminais B também expressam HER-2 e estão relacionados a evolução clínica de maior agressividade e pior prognóstico que o câncer luminal A e sua incidência é de 29% (HARVEY et al., 1999; ALLRED, 2008).

O câncer HER-2 positivo (não luminal) possui índice proliferativo mais elevado e está associado à menor faixa etária, maior grau histológico, evolução clínica mais

agressiva e são mais predispostos a exibir linfonodos positivos e mau prognóstico (CAAN et al., 2014). O subtipo HER-2 aparece em 12,5% dos casos diagnosticados (PRAT et al., 2015). Apesar desses avanços, as pacientes positivas para HER-2 ainda apresentam recidiva de sua doença, principalmente no estágio metastático. Para este fim, os esforços de investigação atualmente em curso tentam melhorar os resultados clínicos dessas pacientes, enfocando as seguintes áreas: avaliação de diferentes estratégias de bloqueio duplo de HER-2, co-alvejamento de HER-2 com outras moléculas percebidas como mediadores de resistência ao tratamento com anti-HER-2, e identificação de biomarcadores preditivos (ESPOSITO; CRISCITIELLO; CURIGLIANO, 2015). Na era da oncologia personalizada, esforços de colaboração clínica são necessários para avançar ainda mais o campo de tratamento de pacientes com câncer de mama HER-2 positivo. O câncer triplo negativo é responsável por aproximadamente 10–15% de todo o câncer de mama e pode ser atribuído a uma proporção maior de casos em países em desenvolvimento.

Tabela 3: Perfil dos subtipos histológicos para a classificação por imunohistoquímica dos tumores de mama.

<b>Subtipos moleculares</b>	<b>Imunohistoquímica</b>
<b>Luminal A</b>	RE positivo, RP positivo (com expressão >20%), HER-2 negativo, Ki-67 <14%.
<b>Luminal B</b>	HER-2 negativo, RE positivo, RP negativo ou RP < 20% dos núcleos corados e Ki-67 alto (≥14%).
<b>Luminal B HER-2</b>	HER-2 positivo, RE e/ou RP positivo
<b>HER-2</b>	RE negativo, RP negativo e HER-2 positivo.
<b>Triplo-Negativo</b>	RE negativo, RP negativo e HER-2 negativo

Fonte: Prat et al. (2013)

Desde então essa categorização apresentou grande valor na recomendação do tratamento sistêmico do câncer de mama. A categorização dos subtipos moleculares é muito significativa, uma vez que apresenta contrastes expressivos em termos de incidência, fatores de risco, predição de alvos terapêuticos e exibem evolução clínica e de prognóstico únicos (CAAN et al., 2014). Pelo fato do câncer de mama ser uma doença extremamente heterogênea, o reconhecimento de alvos terapêuticos peculiares dentro dos tumores é fundamental para aprimorar suas terapias. Assim sendo, é cada vez mais importante o aperfeiçoamento dessa

classificação para que possa guiar a tomada de decisão terapêutica adequada para cada subtipo.

### **1.3. Marcadores clinicopatológicos emergentes no câncer de mama**

O emprego dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem se concretizado nos últimos anos, pois ajuda tanto na prevenção da neoplasia quanto no prognóstico, na avaliação da agressividade tumoral, bem como na escolha do tratamento. Pesquisas importantes foram realizadas para identificar biomarcadores adequados de câncer, o que levou a avanços na sua detecção (COLE; HE; WANG, 2013).

Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia) da neoplasia, prover subsídios a respeito da sua evolução clínica. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas particularidades biológicas envolvidas na modificação celular neoplásica, no desenvolvimento tumoral ou no processo metastático (SCHMITT et al., 1998). Alguns tumores se caracterizam pela produção de substâncias que podem ser monitoradas através de amostras de tecidos tumorais ou fluidos biológicos, como sangue, urina, soro, plasma, fezes e secreção do mamilo (HASANZADEH et al., 2018). Dessa forma, a busca por marcadores e testes moleculares tumorais vem sendo vastamente estudada na tentativa de reduzir tratamentos agressivos e colaborar para a detecção precoce do câncer de mama. Existe dificuldade na clínica, ainda na exploração de marcadores moleculares capazes de diferenciar lesões benignas, pré-malignas e malignas. Nesse sentido, os testes moleculares têm conseguido responder questões sobre prognóstico, recidivas e outras variáveis do fenótipo tumoral (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015).

Apesar de a proteômica ser uma ciência estudada recentemente, progressos significativos já ocorreram nessa área. Há um crescente interesse na comunidade científica por usar esta tecnologia como uma estratégia inovadora de alto rendimento para a descoberta de biomarcadores no campo da pesquisa do câncer (PANIS; PIZZATTI; ABDELHAY, 2013). A proteômica pode determinar o *status* funcional de classificação de tumores conhecidos e, posteriormente, ser usada para selecionar o tratamento baseado em farmacoproteômica (WULFKUHLE et al., 2006; OVERDEVEST; THEODORESCU; LEE, 2009). Os avanços nessas pesquisas

permitiram a identificação de marcadores promissores para vários aspectos do câncer em diferentes tipos de amostras biológicas (PANIS et al., 2016). Embora essas estratégias sejam úteis na identificação de novas vias associadas a doenças existe a necessidade de traduzir esses métodos e conhecimentos para a prática clínica (OVERDEVEST; THEODORESCU; LEE, 2009; BEBEK et al., 2012)

Devido o câncer de mama ser uma doença complexa e heterogênea, a descoberta de um biomarcador específico continuará a ser um desafio necessário para os estudiosos da área. Nesse contexto, a análise de estudos anteriores mostrou que a vitamina D tem grande potencial como um possível biomarcador para o câncer de mama.

### **1.3.1. Vitamina D como potencial marcador no câncer de mama**

#### **1.3.1.1. Metabolismo da vitamina D**

A vitamina D lipossolúvel é essencial para a manutenção do esqueleto e para absorção de cálcio. Ela foi descrita pela primeira vez, em 1912, por Casimir Funk, e é encontrada em duas formas: ergocalciferol (D2), presente em alimentos de origem vegetal como produto da radiação do ergosterol, e calciferol (D3), sintetizada pela epiderme humana pela radiação ultravioleta B (UVB) e mediante ingestão de alimentos de origem animal (LEE et al., 2008). As células da epiderme contêm 7-deidrocolesterol que, sob radiação de raios UVB, é convertido para pré-vitamina D3 pela clivagem fotolítica seguida por um rearranjo termal espontâneo e se transforma em vitamina D3 que é armazenada e liberada no sangue pelas células de gordura (ROSEN, et al., 2011; MOZOS; MARGINEAN, 2015). Essa forma, a qual a ativação não é metabólica, carece das funções hepáticas e renais conservadas. Entretanto, quando há exposição solar em excesso, a pré-vitamina D3 é convertida por reação reversível em seus metabólitos biologicamente inativos lumisterol e taquisterol; no que lhe concerne, o uso de bloqueador solar, por absorver os raios UVB, diminui a produção de vitamina D3 (MATSUOKA et al., 1987; BIKLE, 2009). A proteína de ligação à vitamina D (VDBP) tem uma afinidade mais elevada para a vitamina D3 que D2 (ARMAS; HOLLIS; HEANEY, 2004) e isto resulta em uma meia vida mais longa da D3, sendo mais potente do que D2 (TRANG et al., 1998).

Tanto a vitamina D proveniente da dieta, via absorção intestinal, quanto a formada a partir da pré-vitamina D3 na epiderme são transportadas pela corrente

sanguínea até o fígado pela VDBP (e em menor quantidade pela albumina) (BHAN, 2014), onde sofre uma hidroxilação no carbono 25, pelo citocromo P450 R21, tornando-se 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol, forma inativa da vitamina D. A 25(OH)D é então hidroxilada novamente, desta vez no carbono 1, ao nível mitocondrial em células dos túbulos proximais renais, bem como em muitos outros tecidos, sob a ação do citocromo 1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1), finalmente produzindo a 1,25-diidroxivitamina D3 [1,25 (OH)2D] ou calcitriol, que é responsável pelos efeitos biológicos da forma ativa da vitamina (DeLUCA, 2004; DAWSON-HUGHES et al., 2005; MANDARINO et al., 2015). A Figura 4 sumariza as vias de síntese da vitamina D.

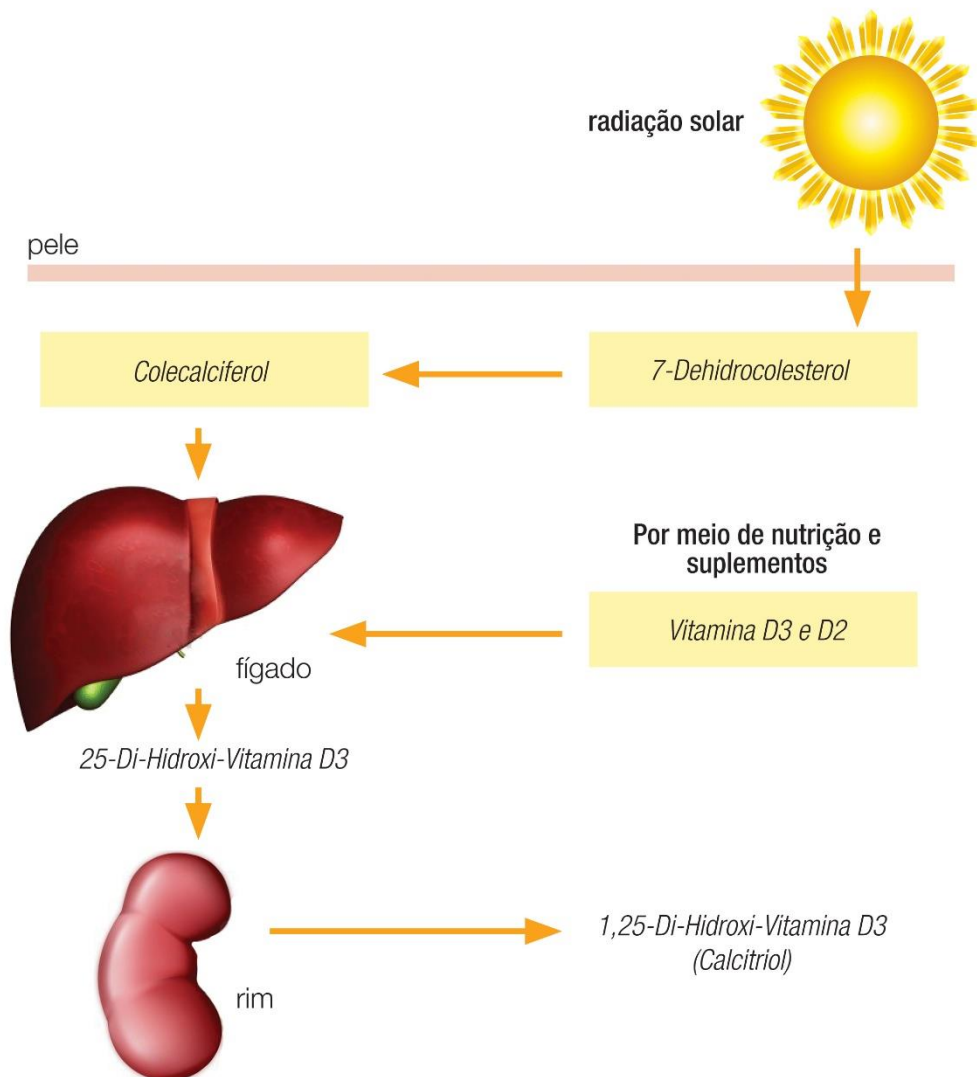


Figura 4: Síntese de Vitamina D.

Fonte: [https://www.scitecnutrition.com/pt/catalog/guide\\_to\\_vitamins/index.php](https://www.scitecnutrition.com/pt/catalog/guide_to_vitamins/index.php)

A 1,25(OH)<sub>2</sub>D, produzida no rim, é secretada na circulação sanguínea, ligada à VDBP e, em seguida, transportada para órgãos-alvo, onde atravessa a membrana celular e se liga ao receptor de vitamina D (VDR) que está presente no citoplasma. Este complexo, 1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR, é submetido a translocação para o núcleo por meio do receptor do ácido retinóico (RXR). Em seguida, o complexo de 1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR-RXR liga-se aos elementos de resposta de vitamina D no DNA aumentando a transcrição dos genes responsáveis pela expressão de proteínas envolvidas nas ações da vitamina D (HOLICK, 2007; PIKE et al., 2007). Esse processo induz respostas genômicas e não-genômicas através da interação com o VDR. Direta ou indiretamente, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D regula mais de 200 genes, incluindo aqueles que estão envolvidos na produção de renina no rim, a produção de insulina no pâncreas, liberação de citocinas pelos leucócitos, a produção de catelicidina em macrófagos e crescimento e proliferação do músculo liso vascular e cardiomiócitos (HOLICK, 2007). 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)<sub>2</sub>D, a forma ativa, possa ocorrer em vários tecidos (HOLICK, 2007), como as células do endotélio, mamas, pâncreas, glândulas paratireoides, placenta e próstata (NORMAN, 2008).

A 25(OH)D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D podem ser metabolicamente inativadas e transformadas em ácido calcitróico pela hidroxilação da 24-hidroxilase (CYP24A1), limitando, assim, a sua disponibilidade (PROSSER; JONES, 2004). A meia vida da vitamina D é diferente dependendo da sua forma, sendo de 60 dias para a vitamina D nutricional, 15 dias para 25(OH)D e em torno de 15 horas para a 1,25(OH)<sub>2</sub>D (JONES, 2008). Embora os níveis séricos de 25(OH)D sejam 1000 vezes mais elevados que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D, a forma ativa da vitamina tem 1000 vezes mais afinidade pelo VDR do que a 25(OH)D (LIPS, 2007).

O nome 'vitamina D' é um equívoco histórico. A forma ativa, o calcitriol, é considerado um hormônio, pois é sintetizado em humanos, e submetido a regulação autócrina e interage com receptor nuclear. A forma ativa da vitamina D regula a transcrição de um número expressivo de genes que codificam proteínas

transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea. A vitamina D 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 vitamina D na reabsorção óssea, no transporte intestinal de cálcio e na pele (ROSEN, 2011).

Ainda não há um consenso internacional sobre os valores de referência deste hormônio bem como dos valores de corte a serem utilizados na definição de suficiência, insuficiência ou deficiência de vitamina D. No entanto, em diretriz clínica da *Task Force* Norte-Americana, a insuficiência de vitamina D foi definida como valores entre 21–29 ng/mL (52,5–72,5 nmol/L) e a deficiência de vitamina D como valores inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/L) (HOLICK, 2007). Número crescente de estudos sugerem que são necessários valores acima de 30ng/ml para garantir melhor disponibilidade de vitamina D (DAWSON-HUGHES et al., 2005; HANLEY et al., 2010). A dosagem de 25(OH)D é adequada para se avaliar e monitorizar o *status* nutricional de vitamina D no organismo humano, pois os valores plasmáticos são os principais indicadores das reservas corporais (DAWSON-HUGHES et al., 2005; HOLICK, 2007) (ROSS et al., 2011; HOLICK et al., 2012; MANGIN; SINHA; FINCHER, 2014).

A hipovitaminose D tem sido analisada em pessoas saudáveis de diversas populações mundiais, particularmente em idosos (MACLAUGHLIN; HOLICK, 1985; MOSEKILDE, 2005; HILGER et al., 2014;), possivelmente como consequência da atrofia cutânea, justificando a maior prevalência da hipovitaminose D nessa população (MOSEKILDE, 2005). Caracterizam-se como hipovitaminose D concentrações plasmáticas de 25(OH)D abaixo do limiar de 30 ng/mL, isto é, do limite considerado satisfatório para conservação da secreção natural de paratormônio pelas paratireoides (HOLICK et al., 2011). Na insuficiência de vitamina D há um aumento nos níveis plasmáticos de paratormônio, o que provoca um hiperparatireoidismo secundário com diminuição da fração ativa de 1,25(OH)<sub>2</sub>D, e aumento da reabsorção óssea (DAWSON-HUGHES et al., 2005; HOLICK et al., 2010). A complementação diária de vitamina D pode reverter esse quadro de hiperparatireoidismo e prevenir a perda óssea em mulheres com idade acima de 50 anos (TANG et al., 2007). Em 2010, a *International Osteoporosis Foundation* divulgou um parecer sobre a vitamina D, fundamentado em dados observacionais,

sugerindo a manutenção de valores séricos de 25(OH)D de 30 ng/mL para pessoas idosas e assegurando que o consumo de vitamina D de até 2000 UI/dia pode ser indispensável para alcançar o valor recomendável em determinados pacientes (DAWSON-HUGHES et al., 2010). Em comparação, o *Institute of Medicine* sustentado por indícios de estudos observacionais e randomizados, recomenda que nível sérico de 20 ng/mL resguardaria 97,5% da população contra consequências adversas na massa óssea, tais como fraturas e quedas (ROSEN et al, 2012). Apesar disso continua indefinida a quantidade adequada de suplementação para alcançar os valores esperados, ainda que se indique dose de 600 UI/dia para mulheres na pós-menopausa e doses superiores a 800 UI/dia para aquelas com idade superior a 70 anos (ROSEN et al, 2012). A suplementação diária de 1000 UI de vitamina D (por um tempo mínimo de seis meses) aumenta os valores séricos em torno de 10ng/mL, dose esta recomendada para pacientes com idade inferior a 65 anos. As mulheres com idade superior deveriam receber dose diária de 2000 UI (MASON, 2011).

Os níveis sérios de vitamina D são influenciados por diversos fatores, por exemplo como sexo, idade, etnia, índice de massa corpórea (IMC), localização geográfica, culturais, exposição solar, hábitos alimentares, além das variantes genéticas, em especial no gene que codifica o VDR. A intensidade da exposição solar, medicações, comorbidades hepáticas e/ou renais e a deficiência de estrogênio também são fatores capazes de alterar a síntese e a ativação da vitamina D (WELSH et al., 2003). Ademais, a deficiência de vitamina D não só gera o raquitismo nas crianças, mas ao mesmo tempo agrava a osteoporose nos adultos e tem sido notada em múltiplas condições abrangendo hipertensão, resistência à insulina, diabetes mellitus, câncer, doenças infecciosas e autoimunes, doença renal crônica e doenças cardiovasculares (revisado por HOLICK, 2007; HOLICK; CHEN, 2008; HEWISON, 2012; PALACIOS; GONZALEZ, 2014). Lips e colaboradores (2006) realizou um estudo epidemiológico em 18 países de latitudes diferentes, onde observou a prevalência de concentrações séricas de 25(OH)D em mulheres na pós-menopausa, e encontraram concentrações ignóbeis em aproximadamente todas as localidades estudadas, onde em média, 64% das participantes exibiam valores inapropriados. Acreditava-se que no Brasil haveria índices baixos de deficiência de vitamina D, por ser um país tropical e ensolarado. Todavia, estudos nacionais têm mostrado dados alarmantes (RUSSO et al., 2009; MAEDA et al., 2013). A condição

de hipovitaminose D é frequentemente deparada em mulheres na pós-menopausa. Entre as possíveis razões apresenta-se baixa exposição solar e capacidade diminuída de produção de vitamina D; atividade renal enfraquecida; menor absorção de vitamina D pelo trato gastrointestinal; uso de diversas drogas que podem intervir na absorção e metabolização da vitamina D; e também o uso de filtro solar, cor da pele, roupa e idade (HOLICK, 2004).

Por regular a transcrição de um número significativo de genes que codificam proteínas transportadoras de cálcio e proteínas da matriz óssea, a forma ativa da vitamina D está intrincada em várias ações biológicas, abrangendo o metabolismo ósseo, a modulação da resposta imune, e a regulação da proliferação e da diferenciação celular (UITTERLINDEN et al., 2004). Compreende-se que os VDR estão presentes em diversos tipos celulares, compreendendo células hematopoiéticas, linfócitos, células epidérmicas, células pancreáticas, miócitos, neurônios, cardiomiócitos, células do músculo liso vascular, células endoteliais e do tecido placentário, além de osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais intestino delgado e células tubulares renais, o que esclarece o grande número de ações não calcêmicas praticadas pela vitamina D para vários tecidos, tais como o sistema nervoso central, sistemas endócrino, cardiovascular e imunológico, assim como as várias implicações da sua deficiência para a saúde (HOLICK, 2007).

#### **1.3.1.2. Vitamina D como fator prognóstico no câncer de mama**

Níveis plasmáticos elevados de vitamina D estão relacionados com um menor risco de desenvolver câncer de mama (CHEN et al., 2010). Um estudo que analisou indivíduos de 175 países verificou menores taxas dessa neoplasia nos locais mais próximos da linha do Equador, onde existe maior grau de insolação e, conseqüentemente, maior produção de vitamina D através da pele (MOHR et al., 2008). Também verificou-se que mulheres com dieta rica em vitamina D e cálcio ou que suplementam esses nutrientes apresentam menor risco de desenvolver câncer de mama ou outra neoplasia (LAPPE et al., 2007; ROSSI et al., 2009). A atuação da vitamina D no epitélio mamário normal está diretamente relacionada à expressão de genes que regulam o ciclo celular (WELSH et al., 2003), controlando o crescimento e a ramificação dos ductos mamários, além de atuar na diferenciação da célula mamária na gestação e lactação. Estudos experimentais têm indicado que a

vitamina D possui efeitos anticarcinogênicos por inibir a proliferação celular pelo bloqueio da progressão do ciclo de crescimento celular neoplásico nos estágios G0/G1; induzir a diferenciação e indução da apoptose de células cancerígenas e inibir a angiogênese na mama normal e no tumor (MANTELL et al., 2000; WANG et al., 2012). A vitamina D age na modulação da transcrição de genes que codificam proteínas reguladoras da multiplicação celular, como os genes supressores de tumor *p21* e *p27* e os proto-oncogenes *c-fos* e *c-myc* (COLSTON; HANSEN, 2002). Assim, considera-se que os polimorfismos do *VDR* estejam relacionados com o surgimento do carcinoma mamário (CHEN et al., 2005).

A vitamina D, através da ligação ao *VDR* expresso no tecido mamário, exerce uma função no desenvolvimento do câncer (MISHRA et al., 2013). A ativação de *VDR* pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tem efeito na diferenciação e crescimento celular, apoptose, inflamação e modulação imune (SCARMO et al., 2013; WELSH et al., 2003). O complexo vitamina D-*VDR* exerce ação antiproliferativa em diversas classes de tumor, da mesma forma como os membros da família p53 ativada, pela da indução do bloqueio do ciclo celular, da senescência, da diferenciação e de apoptose (FELDMAN et al., 2014). Os três membros da família p53, p63, p73 - implicam na ativação do gene *VDR* (MARUYAMA et al., 2006; FELDMAN et al., 2014), à medida que o *VDR* regula diversos genes que do mesmo modo são alvos das proteínas da família p53, incluindo p21, Bax, Bcl-2 e MDM2 (CHEN et al., 2013; FELDMAN et al., 2014). Alguns trabalhos mostraram, por imunohistoquímica, que o *VDR* é expresso em amostras de tecidos normais da mama (BERGER et al., 1988) e em amostras de câncer de mama (FREAKE et al., 1984; AL-AZHRI et al., 2017). Devido ao polimorfismos do gene do *VDR* há uma redução na expressão desse receptor em células de câncer de mama em comparação a células normais (LOPES et al., 2012; ABD-ELSALAM; ISMAEIL; ABD-ALSALAM, 2015). Pacientes portadoras de tumores que são *VDR* positivos possuem uma sobrevida livre de doença maior do que mulheres cujo tumor apresenta baixa expressão desse receptor o que pode variar de 58% a 80% (MISHRA et al., 2013). Um estudo avaliou a expressão do *VDR* em uma coorte de mama normal, lesões mamárias benignas, carcinomas *in situ* e carcinoma invasivo de mama por imunohistoquímica. Nesse trabalho os pesquisadores verificaram que o *VDR* foi expresso nos diversos tecidos mamários, entretanto em quantidades desiguais, aparecendo com maior frequência em lesões benignas

(93,5%) em comparação com os tumores invasivos (56,2%) (LOPES et al., 2012). Os resultados alcançados revelam que existe uma desregulação da sinalização da vitamina D e de suas vias metabólicas o que poderia beneficiar a progressão do tumor no câncer de mama.

Thanasitthichai, Chaiwerawattana e Prasitthipayong (2015) realizaram um estudo em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama e verificaram que 93% tinham níveis de 25(OH)D abaixo de 80 nmol/L e foram nessas pacientes onde existiu pior prognóstico. Esses mesmos autores também verificaram uma maior degradação da vitamina D nas células cancerosas, o que causa maior resistência aos seus efeitos antitumorais. As células tumorais passam por transformações fisiológicas, que diminuem a sua sensibilidade à vitamina D e diminuem também a produção intracelular dessa vitamina. Deste modo, durante a alteração maligna da mama, células tumorais perderiam a habilidade de sintetizar a forma ativa da vitamina D e deixariam de responder aos efeitos dessa vitamina mediado pelo VDR (LOPES et al., 2012). Um estudo que avaliou a expressão de VDR em tecido tumoral da mama em 1.114 pacientes, notou que em 58% dos tumores a expressão de VDR era de moderada a forte. Os autores verificaram que quanto menor a expressão do VDR pior eram as características do câncer, ou seja, a expressão de VDR é inversamente relacionada com agressividade do tumor, como tamanho da massa tumoral, negatividade de receptor hormonal e subtipo triplo negativo (AL-AZHRI et al., 2017). Pesquisas experimentais em camundongos *knockout VDR* analisaram que há uma incidência maior de lesões mamárias pré-neoplásicas induzida por carcinógenos, evidenciando que a deficiência do VDR é um fator relevante na sensibilização da glândula mamaria para a modificação em resposta a um agente carcinogênico (ZINSER; McELENEY; WELSH, 2003; ZINSER; WELSH, 2004)

Apesar das fortes evidências alguns trabalhos epidemiológicos que estudaram a relação entre os níveis plasmáticos de 25(OH)D e o risco de desenvolver câncer de mama são conflitantes. Determinados estudos prospectivos não evidenciaram essa associação (KUHN et al., 2013; McCULLOUGH et al., 2009), ao passo que outros encontraram associação inversa expressiva (TRETLI et al., 2012; BERTONE-JOHNSON et al., 2005). Um estudo prospectivo nos Estados Unidos não verificou associação entre a exposição à radiação solar UV ambiente, o período passado ao ar livre e os fatores de sensibilidade à exposição solar e o risco

de câncer da mama (ZAMOISKI et al., 2016). Um trabalho caso-controle da *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC) do mesmo modo não constatou associações significativas entre os níveis de 25(OH)D e o risco de desenvolver a doença (KUHN et al., 2013). Outro estudo caso-controle foi empreendido com duas coortes prospectivas a *New York University Women's Health Study*, que abrangeu 14.274 mulheres saudáveis, com idades entre 34 a 65, de uma clínica de mamografia da cidade de Nova York e a *Northern Sweden Mammary Screening Cohort* que envolveu 28.800 mulheres Suecas de um programa de rastreamento do câncer de mama. Nesse trabalho não houve associação entre os níveis circulantes de 25(OH) D e risco global do câncer de mama (SCARMO et al., 2013). Em contrapartida, Bertone-Johnson e colaboradores (2005) demonstraram efeito protetor significativo da vitamina D no risco de câncer de mama em mulheres com mais de 60 anos, enquanto que Engel e colaboradores (2012) demonstraram efeito mais proeminente em mulheres com menos de 53 anos de idade. Esse autores propuseram que a vitamina D pode agir bloqueando o fator de crescimento insulino-like (IGF-1), que tem ação proliferativa e decresce com a idade, esperando um efeito anti-carcinogênico maior da vitamina D em mulheres na pré-menopausa. É preciso salientar que alguns estudos que verificaram a relação vitamina D e câncer de mama conseguiram as dosagens dessa vitamina em algum intervalo posterior ao diagnóstico da doença, com potenciais alterações pelo tratamento do câncer (LOWE et al., 2005; ABBAS et al., 2008), tendo como exemplo que, devido ao diagnóstico e tratamento há uma redução significativa da realização da atividade física e sabe-se que a prática de exercícios físicos contribuem com melhores níveis de vitamina D (CHLEBOWSKI, 2011). Entretanto, mais pesquisas clínicas são imprescindíveis, pois as evidências atuais são insatisfatórias para aconselhar a suplementação de vitamina D na prevenção do câncer de mama (IARC, 2008; CHUNG et al., 2011). O relatório do *Institute of Medicine* norte americano concluiu que as provas são contraditórias e inconclusivas quanto à causalidade envolvendo a vitamina D no câncer de mama (ROSS et al., 2011).

Nos tumores RE positivo, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D provoca o bloqueio do ciclo celular nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> pela ampliação da expressão de p21, atenuando a atividade da cinase dependente da ciclina, causando desfosforilação da proteína do

retinoblastoma (KRISHNAN; SWAMI; FELDMAN, 2010). Esses mesmos autores mostraram que o calcitriol e os seus análogos induzem alterações morfológicas e bioquímicas relacionadas com a regulação da expressão de genes da família *bcl-2*, resultando na diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (*bcl-2* e *bcl-XL*) para pró-apoptóticas (*bax*, *bak*). Pesquisadores evidenciaram que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> impede o desenvolvimento das células MCF-7 de câncer de mama pela sub-regulação do RE, o que diminui o efeito estimulante de crescimento do 17β-estradiol (SWAMI et al., 2000). Nas células RE negativo o calcitriol incita a expressão de E-caderina, reduz a ação das metaloproteinases da matriz (MMP) e do ativador do plasminogênio tipo urocinase (uPA), e intensifica a expressão do inibidor do PA1 e inibidor do MMP1, que compõem os mecanismos de supressão do calcitriol na angiogênese, invasão e metastização do tumor (KRISHNAN; SWAMI; FELDMAN, 2010). A vitamina D também apresenta implicações anti-inflamatórias nos tumores RE positivo e RE negativo pela sub-regulação da expressão da COX-2, o que restringe a síntese e a atividade biológica da prostaglandinas nas células de câncer de mama (KRISHNAN; SWAMI; FELDMAN, 2010). No entanto, algumas pesquisas não notaram relação entre a vitamina D com a presença do RE positivo ou negativo no câncer de mama (McCULLOUGH et al., 2009; AGBORSANGAYA et al., 2010).

Ao investigar a eficácia da ingestão de vitamina D e cálcio sobre os subtipos histológico de 713 casos de câncer de mama quanto aos marcadores RE, RP e HER-2, Kawase e colaboradores (2010) observaram que tumores RE e RP positivo e HER-2 negativo relacionaram-se com a ingestão de vitamina D entre pacientes na pré-menopausa. Já a associação entre os valores plasmáticos de vitamina D e o prognóstico do câncer de mama conforme o *status* do receptor tumoral em 310 mulheres, mostrou que em 54,8% os níveis dessa vitamina eram menores que 30 ng/mL. Assim a concentração de vitamina D foi inversamente relacionada com o prognóstico de pacientes com câncer RE positivo e HER-2 negativo, mas não com os subtipos HER-2 positivo ou triplo negativo (KIM et al. 2011). Uma metanálise observou uma relação inversa expressiva entre a ingestão de vitamina D e o risco de desenvolver câncer de mama, com risco relativo (RR) de 0,91 (IC 95% = 0,85-0,97). Estes resultados sugerem grandes evidências de que a vitamina D têm efeito quimiopreventivo sobre o câncer de mama (CHEN et al., 2010). Com suporte nesses achados, têm-se recomendado o acompanhamento dos níveis de 25(OH)D e a

suplementação para os ocorrências de hipovitaminose D (PALMIERI et al., 2006; CREW et al., 2009).

### **1.3.2. Marcadores de toxicidade ao tratamento quimioterápico**

#### **1.3.2.1. Tratamento do câncer de mama**

A quimioterapia é uma alternativa de tratamento para os pacientes diagnosticados com câncer cuja finalidade é a remissão do tumor maligno. Segundo Bonassa (1992), a quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar os pacientes com neoplasias malignas atuando em nível celular, interferindo no processo de crescimento e divisão, contudo sem especificidade, não destruindo seletiva ou exclusivamente as células tumorais.

O diagnóstico precoce do tumor (que por base possui aproximadamente o equivalente a  $10^9$  e  $10^{12}$  células, ou seja, inferior a 1 cm de tamanho) é de suma relevância para se obter êxito na quimioterapia. Considerando que a cada ciclo do tratamento eliminasse, aproximadamente, 99% das células e que, por conseguinte, deve-se repetir os ciclos para se efetivar a morte em todas as células do tumor, quanto maior o tumor, mais células malignas para se destruir, diminuindo a eficiência do tratamento (ALMEIDA et al., 2005).

O uso da quimioterapia adjuvante é responsável, pelo menos em parte, pela redução da mortalidade por câncer de mama, vista em quase todos os países ocidentais (WOLTERS et al., 2012). Os benefícios relacionados ao tratamento adjuvante são maiores para sobrevida livre de doença, em comparação aos dados de mortalidade, sendo observado benefício tanto para sobrevida em 5 anos como em 15 anos, e espera-se que maiores benefícios sejam alcançados no futuro com o desenvolvimento de novos fármacos. (*EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP*, 2012).

Para o tratamento do câncer de mama, diferentes drogas quimioterápicas são utilizadas e agrupadas em classes, dependendo do mecanismo de ação. A quimioterapia pode ser administrada como agente antineoplásico único (monoquimioterapia): paclitaxel e docetaxel (agem nos microtúbulos); doxorubicina e epirrubicina (antraciclinas); 5-fluorouracil [5-FU], capecitabina e gemcitabina

(antimetabólitos); ciclofosfamida (agentes alquilantes), cisplatina e carboplatina (platinas) ou em combinação (poliquimioterapia): docetaxel, doxorubicina e ciclofosfamida (TAC); ciclofosfamida, metotrexato e 5- fluorouracil (CMF); doxorubicina e ciclofosfamida (AC); doxorubicina e ciclofosfamida, seguido de paclitaxel ou docetaxel (ACT) (GONZÁLES-NEIRA, 2012). Quando comparados, em revisão sistemática publicada em 2005, a combinação de agentes quimioterápicos foi associada a um aumento da taxa de resposta, aumento do tempo para progressão da doença e um pequeno benefício de sobrevida global. Mas apesar de mostrar maior eficácia ao tratamento, a poliquimioterapia apresentou um aumento expressivo da toxicidade relacionada aos fármacos utilizados (CARRICK et al., 2005). Para o ano de 2018 o Ministério da Saúde divulgou as novas diretrizes para o tratamento do câncer de mama no Brasil (Tabela 4).

Tabela 4– Esquemas de tratamento quimioterápicos sugeridos pelo Ministério da Saúde para câncer de mama de acordo com o risco.

RISCO/STATUS HORMONAL	PRÉ-MENOPAUSA	PÓS-MENOPAUSA
<b>Baixo Risco</b>	Tamoxifeno - se RH positivo – por 5 anos. Casos individuais podem ser selecionados para quimioterapia: AC por 4 ciclos, TC por 4 ciclos ou CMF por 6 ciclos.	Tamoxifeno ou inibidor da aromatase <i>upfront*</i> , ou <i>switch**</i> - se RH positivo. Casos individuais podem ser selecionados para quimioterapia: AC por 4 ciclos, TC por 4 ciclos ou CMF por 6 ciclos.
<b>Risco Intermediário</b>	Tamoxifeno se RH positivo – por 5 anos. AC ou FAC ou FEC ou TC ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup> semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup> semanal por 8 ciclos.	Tamoxifeno ou inibidor da aromatase <i>upfront*</i> ou <i>switch**</i> - se RH positivo. AC ou FAC ou FEC ou TC ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup> semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup> semanal por 8 ciclos.
<b>Alto Risco</b>	FAC ou FEC por 6 ciclos ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup>	FAC ou FEC por 6 ciclos ou AC por 4 ciclos seguido por 4 ciclos de docetaxel 100 mg/m <sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m <sup>2</sup>

	<p>semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> semanal por 8 ciclos; Se HER-2 positivo adicionar trastuzumabe. *** Se RH positivo – tamoxifeno por 5 anos, caso paciente em pós-menopausa. Ao fim deste período, considerar 5 anos de inibidor de aromatase como adjuvância estendida. Caso em pré-menopausa, considerar terapia estendida por 10 anos com TMX.</p>	<p>semanal por 12 ciclos; ou FEC por 3 ciclos seguido por 3 ciclos de docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias ou paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> semanal por 8 ciclos; Se HER-2 positivo adicionar trastuzumabe. *** Se RH positivo – tamoxifeno ou inibidor de aromatase upfront, ou switch.</p>
--	--	--

Esquemas quimioterápicos: AC–doxorrubicina 60 mg/m<sup>2</sup> mais ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> ; FAC– 5- fluorouracila 500 mg/m<sup>2</sup> mais doxorrubicina 50 mg/m<sup>2</sup> mais ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup>; FEC – 5- fluorouracila 500 mg/m<sup>2</sup> mais epirrubicina 100 mg/m<sup>2</sup> mais ciclofosfamida 500 mg/m<sup>2</sup>; TC – docetaxel (taxotere) 75 mg/m<sup>2</sup> mais ciclofosfamida 600mg/m<sup>2</sup>.

\*iniciar hormonioterapia com um inibidor de aromatase por cinco anos.

\*\* Iniciar hormonioterapia com um inibidor de aromatase ou com o tamoxifeno por dois ou três anos e depois trocar pelo tamoxifeno ou por um inibidor de aromatase, respectivamente, até completar cinco anos.

\*\*\*ADJUVANTE (profilática, pós-operatória): Esquema abreviado (concomitante à quimioterapia com docetaxel ou vinorelbina): dose inicial de 4 mg/Kg, IV, em 1 hora e doses subsequentes de 2 mg//Kg, IV, em 30 minutos, semanalmente durante 8 semanas, total de 9 semanas de tratamento. Esquema estendido de 26 semanas (início concomitante à quimioterapia com taxano): dose inicial de 8 mg/Kg, IV, em 1 hora e 8 doses subsequentes de 6 mg//Kg, IV, em 30 minutos, a cada 3 semanas. Esquema estendido de 52 semanas (12 meses): dose Inicial de 8 mg/Kg, IV, em 1 hora e 16 doses subsequentes de 6 mg//Kg, IV, em 30 minutos, a cada 3 semanas. PRÉVIA (neoadjuvante ou citorrredutora, pré-operatória - início concomitante à quimioterapia com antraciclina ou taxano): dose Inicial de 4 mg/Kg, IV, em 1 hora e 23 doses subsequentes de 2 mg/Kg, IV, em 30 minutos, semanalmente. Note-se que a quimioterapia adjuvante com trastuzumabe do carcinoma de mama HER-2 positivo pode ser classificada como poliquimioterapia (quimioterapia com trastuzumabe) e monoquimioterapia (uso exclusivo de trastuzumabe após a poliquimioterapia com trastuzumabe).

Fonte: Ministério da Saúde (2018).

As drogas utilizadas no tratamento de câncer no Brasil, no que se refere ao Sistema Único de Saúde (SUS), são baseadas em antraciclinas, taxanos e anticorpo monoclonal humanizado. As antraciclinas como a doxorrubicina são os quimioterápicos mais usados na terapêutica farmacológica do câncer e a estrutura química destes compostos vai ser a responsável pela sua atividade antineoplásica mas também pela sua elevada toxicidade (RAJ et al., 2014). A doxorrubicina se liga ao DNA, intercalando entre bases específicas impedindo dessa forma a síntese de

DNA, RNA ou de ambos. Conseqüentemente, provoca a cisão das cadeias de DNA e interfere com os processos de replicação e transcrição pela inibição da enzima topoisomerase II que é uma enzima chave na replicação do DNA (BURGESS et al., 2008). O efeito citotóxico da doxorrubicina também está associado à formação de radicais livres responsáveis por fenômenos de estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Esta antraciclina pode ainda ligar-se às membranas celulares alterando a sua fluidez e capacidade de transporte de íons (RAJ et al., 2014). Todos estes efeitos irão culminar na ativação da maquinaria apoptótica e na morte das células tumorais. Contudo, não se pode rejeitar o fato de estes processos ocorrerem ao nível dos cardiomiócitos, o que justifica a elevada cardiotoxicidade da doxorrubicina (TAKEMURA et al., 2007; PEREIRA et al., 2011).

Dois taxanos muito utilizados para o tratamento do câncer de mama são o paclitaxel (Taxol ®, Bristol- Meyers Squibb) e o docetaxel (Taxotere ®, Sanofi-Aventis). O paclitaxel foi originalmente extraído de uma árvore teixo (*Taxus spp.*, *Taxaceae*), conífera de desenvolvimento lento. Devido à carência inicial de paclitaxel, o docetaxel, um análogo semisintético do paclitaxel produzido a partir das agulhas do teixo europeu *Taxus baccata*, foi desenvolvido (YARED; TKACZUK, 2012). Atualmente os taxanos são utilizados para conter e impedir o crescimento celular, a diferenciação e proliferação das células de câncer. Eles são usualmente conhecidos como inibidores de mitose ou inibidores de microtúbulos. Os taxanos estabilizam os microtúbulos que se formam no início da divisão celular, impedindo que se quebrem. Assim as células do tumor param de se dividir durante a mitose, o que retarda o crescimento do tumor ao matar suas células (FERGUSON et al., 2007). Dessa maneira, os taxanos induzem apoptoses programadas. Além do mais, também dão início a uma cascata de vias de morte celular ao atingir um amplo espectro de proteínas "indutoras de morte" que são muito importantes no sucesso do tratamento do câncer. Finalmente, a ação de taxanos nas células pode induzir uma gama de genes, citocinas e interleucinas que comprometem a proliferação, conseqüentemente, levando à inibição do crescimento celular e apoptose (FAUZEE; DONG; WANG, 2011).

A incorporação do medicamento trastuzumabe ao SUS foi realizada com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento do câncer de mama para mulheres hormônio irresponsivas. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado

recombinante, do tipo IgG<sub>1</sub>, que se liga com alta afinidade ao domínio extracelular do receptor HER-2 (MORROW; ZAMBRANA; ESTEVA, 2009). A adição de trastuzumabe à quimioterapia, na primeira linha de tratamento do câncer de mama metastático, resulta numa significativa melhora da resposta objetiva, tempo de progressão e sobrevida global. Combinações de trastuzumabe com taxanos, sais de platina, vinorelbina e capecitabina promovem benefícios no tratamento do câncer de mama metastático (MORROW; ZAMBRANA; ESTEVA, 2009). O seu mecanismo de ação no tratamento de câncer de mama HER-2 positivo é multifacetado e ainda não foi completamente elucidado, mas sabe-se que este medicamento, a partir da sua ligação ao domínio extracelular do receptor, atua inibindo a via de sinalização intracelular, suprime a angiogênese para o tumor e aumenta a resposta imune contra as células neoplásicas (JUNTILA et al., 2009; SCHEUER et al., 2009). Sabe-se que o trastuzumabe interage com os agentes citotóxicos, aumentando a sua capacidade de induzir morte em células tumorais. Sua interação se dá de forma aditiva com a doxorrubicina, a epirrubicina e o paclitaxel; e de forma sinérgica com a carboplatina, a ciclofosfamida, o docetaxel e a vinorelbina (LOPEZ et al., 1999; PEGRAM et al., 2004).

O benefício do trastuzumabe na quimioterapia prévia foi demonstrado por uma análise combinada de dois estudos clínicos aleatorizados, em que os pacientes foram submetidos a tratamento com quimioterapia isolada ou quimioterapia associada ao trastuzumabe. Foi demonstrado um ganho estatisticamente significativo na taxa de resposta patológica completa - 43% *versus* 20% -, redução na taxa de recorrência de doença (26% *versus* 39%) e uma tendência para redução de mortalidade (13% *versus* 20%), para a combinação de quimioterapia com trastuzumabe (PETRELLI et al., 2011). Além disso, o trastuzumabe também sagrou-se como tratamento padrão, associado à quimioterapia citotóxica, nos cenários adjuvante e neoadjuvante, demonstrando redução de 50% no risco de recorrência após 1 ano e aumento de sobrevida global (PICCART-GEBHART et al., 2005; ROMOND et al., 2005; SMITH et al., 2007; MOJA et al., 2012). Todavia, sabe-se que este tratamento apresenta cardiotoxicidade, que costuma ser reversível com a suspensão do tratamento, sendo raros agravos importantes a longo prazo na função cardíaca das pacientes tratadas com trastuzumabe (EWER et al., 1999; ZAGAR; CARDINALE; MARKS, 2015). Esse efeito colateral gera precaução em pacientes

que já receberam alta dose cumulativa de antraciclina, que também são drogas cardiotoxícas (ROCHÉ; VAHDAT, 2011).

O efeito terapêutico e tóxico dos quimioterápicos depende da concentração plasmática da droga e do tempo de sua exposição. Sua toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga que é utilizada (INCA, 2014). Nas últimas décadas, os progressos no tratamento oncológico resultaram também na maior exposição dos pacientes a fatores de risco cardiovasculares e à quimioterapia com potencial de cardiotoxicidade (WU, 2008; MONSUEZ et al., 2010). Assim, uma definição padronizada de cardiotoxicidade é essencial para fins assistenciais e de pesquisa (KALIL et al., 2011). As definições de cardiotoxicidade dos ensaios clínicos de oncologia são baseadas nas medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). O Instituto Nacional de Saúde (NIH) define cardiotoxicidade segundo a FEVE (ALBINI et al., 2009):

- **Grau I:** redução assintomática da FEVE entre 10% e 20%
- **Grau II:** redução da FEVE abaixo de 20% ou abaixo do normal
- **Grau III:** insuficiência cardíaca sintomática

A cardiotoxicidade apresenta-se de forma aguda, subaguda ou crônica (ALBINI et al., 2009). A cardiotoxicidade aguda ou subaguda caracteriza-se por alterações súbitas na repolarização ventricular, alterações no intervalo Q-T, arritmias supraventriculares e ventriculares, síndromes coronarianas agudas, pericardite e miocardite, geralmente observadas desde o início até 14 dias após o término do tratamento (ALBINI et al., 2009). A cardiotoxicidade crônica pode ser diferenciada em dois tipos, de acordo com o início dos sintomas clínicos. O primeiro subtipo ocorre dentro de um ano após o término da quimioterapia, e o segundo ocorre geralmente após um ano do término da quimioterapia. A manifestação mais típica de cardiotoxicidade crônica é a disfunção ventricular sistólica ou diastólica que pode levar a insuficiência cardíaca congestiva até a morte cardiovascular (DOLCI et al., 2008).

A cardiotoxicidade pode determinar a interrupção do tratamento quimioterápico e comprometer a cura ou o adequado controle do câncer (YEH et al., 2004; YEH; BICKFORD, 2009). É válido ressaltar que a insuficiência cardíaca tem pior prognóstico que muitas neoplasias e pode comprometer seriamente a evolução do paciente em tratamento (STEWART et al., 2001). A ocorrência da disfunção

ventricular sistólica e diastólica assintomática ou sintomática varia nas séries clínicas entre 5% e 30%, sendo mais frequente em pacientes que se apresentam com os clássicos fatores de risco como idade avançada, disfunção ventricular prévia, hipertensão arterial, diabetes, uso de associação de quimioterápicos, radioterapia mediastinal e suscetibilidade genética (SINGAL; ILISKOVIC, 1998; SENGUPTA et al., 2008). Na Tabela 3 estão listados os quimioterápicos mais utilizados e com maior potencial para causar cardiotoxicidade.

A cardiotoxicidade das antraciclina (doxorubicina, epirubicina e idarrubicina) caracteriza-se por queda na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, ocorre em 5% a 35% dos casos, inicia-se nas primeiras doses, e está relacionada à dose cumulativa, especialmente com doses acima de 400 mg/m<sup>2</sup> de superfície corpórea (Tabela 5) (KALIL et al., 2011). Nessa, observa-se dano permanente do miocárdico, caracterizado por apoptose dos miócitos, resultando em fibrose e perda da função cardíaca (MONSUEZ et al., 2010). A toxicidade relacionada à ciclofosfamida geralmente é aguda ou subaguda, e tem relação com a dose, e é irreversível na maioria dos casos. A ciclofosfamida e a ifosfamida estão relacionadas à disfunção ventricular em até 10% a 20% dos casos (YEH et al., 2004; YEH; BICKFORD, 2009). O segundo grupo em importância como causa de toxicidade tem como representantes o trastuzumabe e o bevacizumabe. O trastuzumabe causa disfunção ventricular em até 28% dos casos (Tabela 5). Nessa, ocorre disfunção transitória reversível dos miócitos, sem que haja relação com a dose, resultando em melhor prognóstico (SEIDMAN et al., 2002; WELLS; LENIHAN, 2010)

Tabela 5: Principais agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer e a incidência de cardiotoxicidade (redução da fração de ejeção e/ou insuficiência cardíaca).

<b>Agente quimioterápico</b>	<b>Incidência (%) de disfunção ventricular ou insuficiência cardíaca</b>	<b>Frequência de uso</b>
Antraciclina (doxorubicina, epirubicina, idarrubicina)	5% a 35% dos casos (dose acima de 400 mg/m <sup>2</sup> )	++++
Agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida)	5% a 25% dos casos	++++
Agentes antimicrotúbulos (docetaxel, paclitaxel)	2% a 10% dos casos	+++

---

**Anticorpos monoclonais e inibidores da tirosina-quinase**


---

Trastuzumabe	2% a 28% dos casos	++
Bevacizumabe	2% a 10% dos casos	++
Sunitinibe	3% a 10% dos casos	++

---

Fonte: KALIL et al. (2011).

O monitoramento de sinais e sintomas de insuficiência cardíaca é aspecto fundamental do manejo de pacientes que se submetem a terapia oncológica cardiotoxica. Atenção especial deve ser dada às manifestações clínicas precoces de toxicidade, que embora ocorram raramente, podem se apresentar como quadro clínico de miocardite aguda fulminante e/ou arritmias ventriculares graves (CARDINALE et al., 2002; EWER; EWER, 2010). Como a toxicidade pode se manifestar em qualquer momento após o uso de quimioterápicos, até mesmo vários anos após a finalização do tratamento, faz-se necessária vigilância contínua das manifestações clínicas da síndrome, com avaliação de sintomas pouco específicos como cansaço, fadiga e limitação funcional para as atividades do dia a dia (CARDINALE et al., 2000).

Nesse sentido o uso de biomarcadores cardioespecíficos vem sendo apontado como ferramenta útil na identificação precoce de lesão cardíaca por quimioterápicos e seguimento dos pacientes oncológicos (CARDINALE; SANDRI, 2010), pois permite identificar o dano cardíaco antecipadamente, proporcionando uma rápida resposta terapêutica e uso de medidas potencialmente cardioprotetoras, além de acompanhamento clínico intensivo, incluindo rastreamento ativo de disfunção ventricular. Essas medidas são essenciais e visam reduzir o risco de mortalidade e melhorar a qualidade de vida da paciente com câncer de mama, sem interferir, se possível, no tratamento específico da doença.

### **1.3.2.2. Marcadores de toxicidade**

A quimioterapia, por si só, é um tratamento tóxico. Sendo assim, esta é uma toxicidade considerada “desejável”. Apesar da constante evolução dos fármacos quimioterápicos, estas drogas ainda representam um dos mais graves efeitos colaterais dentre os grupos farmacológicos conhecidos. A elas são implicadas lesões estruturais e modificações da fisiologia e bioquímica normal do ser humano,

algumas irreversíveis, que até podem se tornar o fator limitante do próprio tratamento (ROBINSON, 1996). Sabe-se que a maioria das drogas são metabolizadas no organismo e os eventos bioquímicos que acompanham esse processo determinam, em grande parte, a duração de ação desses fármacos, a sua eliminação e possível toxicidade associada (SCHONBORN; GWINNUTT, 2010).

Os efeitos colaterais ou as toxicidades decorrentes da quimioterapia relacionam-se à não-especificidade, ou seja, essas drogas não comprometem unicamente as células tumorais, mas também, aquelas normais que têm propriedades semelhantes. Tais efeitos remetem à toxicidade hematológica, toxicidade gastrintestinal, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, disfunção reprodutiva, toxicidade vesical e renal, alterações metabólicas, toxicidade dermatológica, reações alérgicas, anafilaxias e fadiga (BONASSA; GATO, 2012).

Marcadores laboratoriais de toxicidade na quimioterapia são utilizados para verificar o dano tecidual. A toxicidade hematológica decorrente da quimioterapia relaciona-se ao fato de ser a hematopoiese um processo caracterizado por alta atividade mitótica e rápida proliferação celular que produz células de curto ciclo (FONSECA; ALMEIDA; MASSUNAGA, 2000). Esta característica, comum à do crescimento tumoral, faz com que a medula óssea seja extremamente susceptível aos efeitos destas drogas. Nesse sentido, a análise dos parâmetros hematológicos sanguíneos é relevante para a avaliação de risco, pois sugerem a probabilidade de ocorrerem alterações do sistema hematológico em pacientes tratados com drogas quimioterápicas, fornecendo um valor preditivo importante da toxicidade (OLSON et al., 2008). A toxicidade hematológica pode ser rastreada pelas alterações nos resultados do hemograma como leucopenia, neutropenia, trombocitopenia/plaquetopenia, anemia e depressão da medula óssea (GOZZO et al., 2011; BONASSA; GATO, 2012).

A hemólise (anemia) associada à quimioterapia é um problema muito comum nos doentes em tratamento para o câncer de mama e está associada a um aumento da necessidade de transfusões de eritrócitos, assim como uma diminuição da qualidade de vida (SPIVAK, 2005). Segundo a *National Comprehensive Cancer Networks®*, nos doentes oncológicos um valor de hemoglobina de 11 g/dL ou inferior deve ser imediatamente avaliado. Contudo, nos doentes que apresentem valores de

base mais elevados, uma diminuição do valor de hemoglobina superior ou igual a 2 g/dL deve também ser sujeita a uma avaliação cuidadosa no sentido da caracterização da anemia e identificação de alguma comorbilidade passível de ser corrigida (RODGERS et al., 2011).

O efeito nefrotóxico da quimioterapia verifica-se especialmente em esquemas quimioterápicos que contêm cisplatina (WILSON et al., 2007). A nefrotoxicidade causada por esse medicamento atinge principalmente os túbulos renais proximais (PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2003), levando à insuficiência renal aguda e dano irreversível aos rins com proteinúria discreta (típica de lesão tubular) e por excreção aumentada de magnésio (SANTOS, 2006). Na nefrotoxicidade causada pela quimioterapia, as avaliações dos marcadores laboratoriais mais utilizadas são a creatinina sérica, ureia, excreção fracionada de sódio, proteinúria e o declínio da taxa de filtração glomerular (RONCO et al., 2010). Um biomarcador de lesão renal ideal seria aquele que fosse facilmente mensurável, sem interferência de outras variáveis biológicas e capaz tanto de detectar precocemente uma lesão renal, quanto de estratificar seu risco (CULLEN; MURRAY; FITZGIBBON, 2012). Dentre os biomarcadores emergentes mais estudados estão: NGAL, interleucina-18, KIM-1, cistatina-C, L-FABP, NAG, netrina-1, vanina-1 e MCP-1 (TESCH, 2010; SLOCUM; HEUNG; PENNATHUR, 2012).

A hepatotoxicidade induzida por fármacos constitui um problema grave a ser considerado durante o tratamento quimioterápico. O fígado compõe o tecido com maior atividade metabólica onde há elevada concentração enzimática. A hepatotoxicidade é caracterizada por resultados anormais em testes bioquímicos hepáticos ou por presença de disfunção hepática. As características ideais de um marcador de toxicidade hepática incluem especificidade para o tecido hepático e forte correlação com alterações histomorfológicas hepáticas bem definidas (OZER et al., 2008). Atualmente, a análise bioquímica para verificar hepatotoxicidade devido ao tratamento quimioterápico inclui a medição dos biomarcadores mais comuns como a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a fosfatase alcalina (ALP), a gama glutamiltransferase (GGT) e a bilirrubina (FONTANA et al., 2010). Os microRNA (miRNA) têm sido descritos como potenciais biomarcadores de lesão hepática aguda. No fígado, o miRNA com maior expressão é o miRNA-122, seguido do miRNA-192. Alguns fatores de transcrição específicos

do tecido hepático (HNF1 $\alpha$ , HNF3 $\alpha$  e HNF3 $\beta$ ) foram associados à função regulatória do miRNA-122 (LEWIS et al., 2011). Estes apresentam maior especificidade e sensibilidade comparativamente à ALT, sendo que, entre eles, o miRNA-122 apresenta maior especificidade do que o miRNA-192 para a lesão hepática aguda (WANG et al., 2009; LEWIS et al., 2011).

Durante o tratamento oncológico, a paciente pode apresentar cardiotoxicidade devido as drogas utilizadas para conter o avanço do tumor. E quanto antes se detectar a lesão cardíaca melhor é o prognóstico dessas mulheres. Alguns marcadores bioquímicos são indicados como bons preditores precoces da cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos. Estudos demonstram que a troponina pode representar um marcador sensível e específico de injúria miocárdica nos pacientes em uso de doses elevadas de quimioterápicos cardiotoxícos (CARDINALE et al., 2004; LENIHAN; MASSEY; BAYSINGER, 2007). Ela mostrou-se capaz de prever o desenvolvimento de disfunção ventricular, pois, nessa situação, seu nível sérico pode manter-se elevado após um mês do uso de antraciclina (LENIHAN; MASSEY; BAYSINGER, 2007; EIDEM, 2008). O peptídeo natriurético do tipo B (BNP), liberado em resposta à sobrecarga de pressão, volume e aumento da tensão parietal do ventrículo esquerdo, também é preditor da gravidade da lesão miocárdica (CARDINALE; SANDRI, 2010). Aumenta mesmo sem sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, o que demonstra alta sensibilidade do BNP em prever cardiotoxicidade (DOLCI et al., 2008; SALVATICI et al., 2009).

Outros marcadores cardíacos séricos têm sido investigados para monitorar a cardiomiopatia relacionada à quimioterapia. A creatinaquinase (CK) e a creatinofosfo-quinase isoenzima MB (CK-MB) são enzimas citoplasmáticas que agem como reguladoras da produção de fosfatos de alta energia e como reguladoras da utilização destes em tecidos contráteis, motivo pelo qual são encontradas em tecidos de alto consumo de energia, como as fibras musculares e os túbulos distais do rim (WANG et al., 2011). Quando ocorre cardiotoxicidade, há liberação da isoenzima CK-MB para o meio extracelular e sua dosagem representa um recurso importante para a detecção de lesão cardíaca (DINIZ; SCHWARTZ; COLLICCHIO-ZUANAZE, 2007).

Os progressos da terapêutica antineoplásica e sua maior acessibilidade necessitam que os fatores de risco que acompanham esse tratamento sejam

levados em consideração. Isso seguramente contribuirá para que haja uma maior expectativa de vida com qualidade e autonomia e os efeitos tóxicos da quimioterapia sejam minimizados e prevenidos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Diante da importância de se diagnosticar precocemente mulheres com câncer de mama e de se obter um prognóstico adequado no início do tratamento, bem como identificar antecipadamente os efeitos tóxicos dos medicamentos utilizados para conter o avanço da doença, o presente estudo visa avaliar os efeitos das concentrações plasmáticas da vitamina D como um marcador prognóstico de malignidade, e também avaliar marcadores de citotoxicidade relacionados ao tratamento quimioterápico, já que as drogas utilizadas possuem efeitos colaterais graves, como a cardiotoxicidade, que é responsável pela maioria dos óbitos relacionados ao câncer de mama.

### 3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a 25(OH)D como um potencial marcador prognóstico, além de marcadores circulantes de toxicidade ao tratamento quimioterápico em mulheres diagnosticadas com câncer de mama.

#### 3.1. Objetivos específicos

- ✓ Categorizar os níveis plasmáticos da 25(OH)D de acordo com as características clínicas e histopatológicas do câncer de mama: grau histológico, invasão linfonodal, estadiamento TNM e presença do tumor primário no momento da coleta de sangue.
- ✓ Analisar o nível da 25(OH)D de acordo com o regime quimioterápico, perfil de resposta terapêutica, disseminação da doença e idade ao diagnóstico.
- ✓ Avaliar os níveis circulantes de 25(OH)D de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama, sobrevivência após 5 anos de acompanhamento e prognóstico da doença.
- ✓ Analisar os níveis circulantes de marcadores cardíacos: creatina-quinase total (CK-Total), na fração B da creatina-quinase B (CKMB) e proteína C reativa (PCR) em pacientes com câncer de mama em uso de doxorrubicina, paclitaxel ou trastuzumabe,
- ✓ Analisar o perfil lipídico das pacientes como colesterol total e os níveis de triglicerídeos e sua ocorrência em associação com outros possíveis marcadores de lesão cardíaca.
- ✓ Verificar se há associação entre inflamação e dano cardíaco em pacientes assintomáticos que iniciaram o tratamento quimioterápico através de marcadores proinflamatórios circulantes como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), homocisteína plasmática e ferro livre.

## **4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento**

Para a análise das propriedades da vitamina D foi realizado um estudo prospectivo. E no trabalho da cardiotoxicidade foi realizado um estudo observacional em drogas quimioterápicas.

### **4.2. Aspectos éticos**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê Institucional de Ética (CAAE 35524814.4.0000.0107), seguindo os princípios para pesquisa médica envolvendo seres humanos da Declaração de Helsinki (ANEXO). Todos os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa, e informados sobre o estudo a ser desenvolvido e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **4.3. População**

Este estudo envolveu pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal infiltrativo da mama atendidos em dois Hospitais Públicos de Oncologia (Instituto do Câncer de Londrina, Londrina, Paraná e Hospital do Câncer Francisco Beltrão, Ceonc, Francisco Beltrão, Paraná). No mesmo período, foram convidadas mulheres saudáveis da população geral para constituir o grupo controle.

### **4.4. Amostra**

Trata-se de uma amostra consecutiva, de conveniência de tempo e local, com a inclusão, prospectivamente, de pacientes com carcinoma ductal infiltrativo da mama. Para o estudo da vitamina D foram incluídas 147 mulheres com câncer de mama e para o estudo da cardiotoxicidade o n foi de 120 pacientes com câncer de mama e 50 mulheres saudáveis para o grupo controle. Foram coletadas amostras de sangue e as pacientes foram submetidas a procedimentos cirúrgicos para coleta do tumor ao diagnóstico, antes de iniciar o tratamento quimioterápico. As amostras foram coletadas de janeiro de 2014 a janeiro de 2017. As biópsias de tumor foram classificadas por imunohistoquímica e categorizadas em 4 subtipos histológicos:

Luminal A (apresentando estrogênio - ER e ou receptores de progesterona - PR), Luminal B (também com expressão de ER e / ou RP associada a coloração nuclear para ki67 > 14% ), HER 2 positivo (ER e PR negativo, superexpressando o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 - HER2) e triplo negativo (ER, PR e HER2 negativo) (28). As amostras de sangue foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e o plasma congelado a - 20 0C até a análise. Registros clínicos foram avaliados para obtenção de dados clínico-patológicos.

As pacientes com câncer de mama também foram divididas de acordo com o tratamento quimioterápico: grupo doxorrubicina (DOX), grupo paclitaxel (PTX) e grupo trastuzumab (TZ). A coleta de sangue nos grupos DOX e PTX foi realizada após o primeiro ciclo de quimioterapia, enquanto a coleta de amostras de sangue no grupo TZ foi realizada após o oitavo ciclo, garantindo níveis estáveis de concentração plasmática de trastuzumabe. Amostras de sangue periférico foram coletadas de todos os grupos por punção venosa (10 mL), centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e o plasma obtido congelado a -200 ° C até a análise. Os marcadores escolhidos para avaliar a toxicidade cardíaca foram creatina-quinase total (CK total), fração MB (CK-MB) e proteína C-reativa de alta sensibilidade (hsPCR). Os marcadores pró-inflamatórios foram: ferro livre (Fe), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e homocisteína. O perfil lipídico também foi incluído (colesterol total e níveis de triglicerídeos). As medições foram comparadas com amostras de controles saudáveis.

#### **4.5. Critérios de Exclusão**

Os critérios de exclusão foram mulheres com outros tipos histológicos de câncer de mama, pacientes submetidos à reposição de vitamina D e a presença de comorbidades secundárias que poderiam influenciar a investigação de vitamina D, pacientes que foram submetidos a quimioterapia prévia, pacientes com morbidades crônicas e fumantes, e pacientes com qualquer patologia cardíaca ou condições que pudessem afetar o metabolismo da homocisteína.

#### **4.6 Exames Laboratoriais**

##### **4.6.1 Vitamina D**

A vitamina D (25(OH)D) foi avaliada em amostras de plasma usando um kit comercial à base de quimioluminescência (Architet™, Abbot). O limite de detecção do kit é 8 ng / mL. O ponto de corte foi deficiência < 20 ng/mL.

#### **4.6.2 Marcadores de toxicidade cardíaca**

Creatina-quinase total (CK total) e a fração MB (CK-MB) foram avaliados por um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR; Dade Behring, USA), utilizando métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente. Foram considerados os valores de referências estabelecidos pelos fabricantes dos reagentes utilizados. Os níveis séricos de hsPCR foram avaliados por imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

#### **4.6.3 Marcadores inflamatórios**

A dosagem dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  foi realizada por método imunoenzimático (ELISA, eBioscience, San Diego, Califórnia, USA). Ferro livre (Fe) foi avaliado por um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR; Dade Behring), utilizando métodos padronizados e reagentes disponíveis comercialmente. Foram considerados os valores de referências estabelecidos pelos fabricantes dos reagentes utilizados. Os níveis séricos de homocisteína foram analisados por imunoensaio de micropartícula com quimioluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

#### **4.7 Análise Estatística**

Os experimentos foram realizados em duplicata, e os dados expressos em mediana (para dados não paramétricos) ou médias (para dados paramétricos)  $\pm$  erros padrão. Os resultados foram analisados usando o teste de Grubbs para detecção de outliers e nenhum outlier foi detectado neste estudo. Os resultados foram comparados pelo teste t de Student ou pelo teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição das variâncias. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos submetidos às revistas:

- Artigo 1 - *Hormones and Cancer*, com fator de impacto 2.581.
- Artigo 2 - *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, com fator de impacto 2.808.

**ARTIGO 1**

**Lower plasmatic 25-hydroxyvitamin D at diagnosis is associated with clinical poor prognosis parameters in Brazilian women with breast cancer.**

Micheletti P. L.; Silva, A. P. B. C.; Rech, D.; Victorino, V. J.; Souza, J. A. O; Herrera A.C.S.A.; Simão, A. N.C.; Panis, C\* and Dichi I\*.

*\* These authors equally contributed to the study.*

**Corresponding Author:**

Carolina Panis, Ph.D

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Centro de Ciências da Saúde

Rua Maringá 1200

Francisco Beltrão, Paraná

Brazil

Phone +55 46 35204886

Email: [carolpanis@hotmail.com](mailto:carolpanis@hotmail.com)

## Abstract

Vitamin D (Vit D) has emerged as a substance with multiple functions in health and disease. It is well known that when vit D levels fall, a wide of pathologies can rise in human body, including breast cancer. In this study we investigated the circulating levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in Brazilian women with breast cancer at diagnosis, and correlated such findings with clinicopathological parameters relevant to disease prognosis. This study involved a total of 147 women with infiltrative ductal carcinoma of the breast. Blood samples were collected and the patients underwent surgical procedures to collect the tumor. Tumor biopsies were subtyped by immunohistochemistry in 4 molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER 2 positive and triple negative. Vitamin D (25-OHD) was measured on plasma samples using a commercial kit. Our findings indicated that circulating vit D levels at diagnosis was insufficient in patients with breast cancer (the median of the group was 22 ng/mL). Further, reduced plasmatic levels at diagnosis correlated significantly with poor prognosis parameters, including axilla positivity (23.69±0.94 ng/mL in lymphonodes negative and 20.34±1.3 ng/mL in lymphonodes positive,  $p = 0.0390$ ), chemoresistance (20.45±1.32 ng/mL in chemoresistant and 23.54±0.83 ng/mL in chemosensitive,  $p = 0.0454$ ) and metastasis (20.58±1.18 ng/mL in metastatic patients and 23.61±0.94 ng/mL in those without metastasis,  $p = 0.05$ ). Patients bearing triple negative tumors also presented reduced vit D in plasma at diagnosis when compared to those who carried Luminal tumors (23.42±0.99 ng/mL in triple negatives and 17.17±2.89 ng/mL in luminal A tumors,  $p = 0.0409$ ). Our data suggested the existence of relevant correlations when vit D is reduced in plasma at diagnosis, such as advanced disease with axilla positivity, chemoresistance with advanced disease, early age at diagnosis with high histological grade and dead with axilla positivity. Altogether, these findings reinforce that vit D reduction can be a plausible marker of disease prognosis in breast cancer.

Keywords: breast cancer, diagnosis, prognosis, vitamin D.

## Introduction

Vitamin D (vit D) deficiency is a common problem in population worldwide [1], and has been linked to a number of diseases spanning from type 1 diabetes [2], over multiple sclerosis [3], rheumatoid arthritis [4], and inflammatory bowel disease [5], to overall cancer mortality [6, 7]. Current guidelines recommend the measurement of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in blood as the gold standard for the assessment of vit D status [8, 9] under physiological and pathological conditions.

In spite of most of research regarding vit D have focused on its cancer-preventing role [10, 11], several studies have highlighted vit D profile as a putative predictor of cancer prognosis for haematological malignancies [12] and solid tumors, including breast cancer [13, 14, 15, 16, 17, 18].

Breast cancer is a heterogeneous disease with different gene expression profiles that translate into various clinical outcomes [19, 20]. Vit D has been extensively reported by *in vitro* studies as an important mediator of major cellular processes in breast cancer cells. Vit D binding to its receptor (VDR) controls the expression of genes that regulate cell proliferation, differentiation, and apoptosis [21, 22]. On the other hand, these cells can undergo physiological changes, decreasing their susceptibility to vit D and becoming resistance to its antitumor effects [23].

Although several studies have analysed physiopathological mechanisms by which breast cancer may change vit D metabolism [24, 25], few data about its clinical meaning in women carrying breast cancer have been reported [26, 27]. In this context, the present study aimed to investigate the prognostic value of vit D in plasma samples collected from women diagnosed with breast cancer at diagnosis (after starting pharmacological or surgical intervention) and its correlation with the main clinical parameters that determine disease aggressiveness.

## Methods

### 1. Study design and sample collection

This prospective study was conducted from February 2016 to May 2017 and enrolled a total of 147 women diagnosed with infiltrative ductal carcinoma of the breast. All participants signed consent forms and the research was approved by the Ethics Institutional Committee (Number CAAE 35524814.4.0000.0107), following the principles for medical research involving human subjects from the Declaration of Helsinki. Inclusion criteria were women carrying unilateral infiltrative carcinoma of the breast. Exclusion criteria were women with other histological types of breast cancer, patients undergoing vit D replacement and the presence of secondary comorbidities that could bias vit D investigation.

Patients were submitted to surgical procedures for tumor and blood sampling. Tumor biopsies were subtyped by immunohistochemistry and categorized into 4 molecular subtypes: Luminal A (presenting estrogen - ER and or progesterone - PR receptors), Luminal B (also with ER and/or PR expression, in association with nuclear staining for ki67 > 14%), HER 2 positive (ER and PR negative, overexpressing the receptor of the human epidermal growth factor 2 – HER2) and triple negative (ER, PR and HER2 negative) [28]. Blood samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes and plasma frozen at – 20 °C until analyses.

Clinical records were assessed to obtain clinical-pathologic data.

### 2. Vitamin D measurement

The 25-OHD was measured in plasma samples by using a chemiluminescence-based commercial kit (Architet™, Abbot, USA). The detection limit of the kit is 8 ng/mL.

### 3. Statistical analyses

Experiments were carried out in duplicate, and data expressed as median (for non-parametric data) or means (for parametric data) ± standard errors. Results were analyzed by using the Grubbs test for outlier detection, and no outliers were detected in this study. The results were compared by Student's t-test or the Mann-Whitney test, accordingly to variances distribution. A p-value < 0.05 was considered significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

Clinical-pathologic characteristics are shown in Table 1. The mean age at diagnosis was 56.1 years (ranging from 32 to 88 years), and most of patients presented high-grade tumors. Luminal tumors were predominant in the present cohort, and an equal distribution of disease staging was found. Figure 1 shows the distribution of 25-OHD levels in all patients enrolled in the study, which ranged from 4.05 to 29.10 ng/mL (min-max values). The median value was 22.0 ng/mL. Vit D values under the limit of detection of the kit were discarded (n=2).

Regarding the distribution of vit D and the clinical-pathologic parameters, it was observed that histological grade, Tumor, nodes, metastasis (TNM) staging and the occurrence of surgery do not affect its circulating levels (Figure 2 A, 2C and 2D). Patients in which tumor cells invaded the lymphonodal (LN) chains presented lower vit D levels in plasma when compared to those without lymphonodal invasion at diagnosis (Figure 2B,  $23.69 \pm 0.94$  ng/mL in LN negative and  $20.34 \pm 1.3$  ng/mL in LN positive,  $p = 0.0390$ ). Menopausal status at diagnosis did not affect vit D levels.

The chemotherapeutic schedule chosen for treating patients after sample collecting, as well as their age at diagnosis did not affect circulating vit D (Figures 3A and 3D). Patients who developed chemoresistance 6 months after chemotherapy exhibited reduced vit D in plasma at diagnosis (Figure 3B,  $20.45 \pm 1.32$  ng/mL in chemoresistant and  $23.54 \pm 0.83$  ng/mL in chemosensitive,  $p = 0.0454$ ). In the same way, patients who developed distant metastasis along disease follow-up (2 years) also presented reduced circulating levels of vit D at diagnosis (Figure 3C,  $20.58 \pm 1.18$  ng/mL in metastatic patients and  $23.61 \pm 0.94$  ng/mL in those without metastasis,  $p = 0.05$ ).

In relation to breast cancer molecular subtypes (Figure 4A), only patients bearing triple negative tumors presented significantly different levels of vit D at diagnosis when compared to those carrying luminal A tumors ( $23.42 \pm 0.99$  ng/mL in luminal A and  $17.17 \pm 2.89$  ng/mL in triple negatives tumors,  $p = 0.0409$ ), whereas, when compared altogether, the other subtypes were not different. We further examined if disease overcome was related with plasmatic vit D at diagnosis, and observed that patients that were alive 2 years after diagnosis showed higher levels when compared to those who died (Figure 4B,  $23.62 \pm 0.80$  ng/mL and  $19.71 \pm 1.54$  ng/mL, respectively,

$p = 0.0197$ ). Finally, patients were categorized according to good (age > 45 years, luminal A/low grade tumors, with negative lymph nodes, those who were alive 2 years after diagnosis) or poor prognosis (age < 45 years, triple negative/high grade tumors, with positive lymph nodes, those who died until 2 years after diagnosis) combined parameters. This categorization showed that patients with poor prognosis presented lower levels of vit D at diagnosis in relation to those with good prognosis (Figure 4C,  $20.46 \pm 1.03$  ng/mL and  $24.03 \pm 1.08$  ng/mL, respectively,  $p = 0.0349$ ). Spearman's correlations reinforced the relationship between low plasmatic levels of vit D at diagnosis and poor prognosis parameters (Table 2), and the significant ones were advanced disease vs positive axilla ( $p = 0.0006$ ,  $R = 0.73070$ ), chemoresistance vs advanced disease ( $p = 0.0154$ ,  $R = 0.5467$ ) and positive axilla and dead of patients ( $p = 0.0440$ ,  $R = 0.6256$ ).

## Discussion

Few studies have focused on the meaning of circulating mediators in samples collected from women with breast cancer at diagnosis. This approach seems advantageous, since allows a prognostic value of putative biomarkers without any interference of treatment. In the present study, we showed that lower plasmatic levels of vit D at diagnosis are straightly associated with clinical markers of poor prognosis in breast cancer.

Vit D deficiency is currently known as a common medical condition worldwide [29] and have been reported as clinically relevant [30, 31]. Its active form regulates the transcription of several genes that encode proteins involved in many biological processes, including bone metabolism, modulation of the immune response, cell proliferation and differentiation [32]. According to clinical guidelines, vit D insufficiency can be defined as values between 21-29 ng/mL, and its deficiency is diagnosed when the values are below 20 ng/mL [33].

Although several studies have highlighted the importance of vit D in breast cancer risk [34, 35, 36], few studies have focused on understanding its clinical relevance in patients diagnosed with breast cancer. In the present study, we have shown that reduced levels of circulating vit D is a common finding at diagnosis, since only 1 patient from the entire cohort presented sufficient levels of vitamin D. A growing body of evidence indicate that vit D may prevent the development of breast

cancer [37, 38], suggesting that reduced levels may occur before and during breast cancer development. Lower rates of breast cancer are reported in localities closest to the Equator, where there is a higher degree of insolation and, therefore, a higher production of vit D through the skin [39].

Disease spreading is undoubtedly the worst prognostic factor in breast cancer patients. Our data indicated that reduced vit D at diagnosis in plasma are significantly associated with lymph nodal invasion and metastasis. Lymph node invasion was positive when patients had vit D circulating levels at diagnosis equal to or lower than 22.0 ng/mL. Our data are in agreement with a recent study performed with 1295 patients with postmenopausal breast cancer also showed that patients with low levels of vit D had a higher proportion of positive lymph nodes and metastasis [40].

Several *in vitro* and *in vivo* studies suggest that vit D may prevent metastasis of cancer cells, and most of evidence is based on reports with vit D supplementation. Experimental data [41] demonstrated that the administration of vit D in rats significantly decreased the size and number of breast cancer metastasis to the lungs. Other studies demonstrated that synthetic analogs of vit D can inhibit breast cancer cells metastasis both *in vitro* and *in vivo* [39, 42]. Further, it was demonstrated that vit D was able to significantly inhibit the metastatic capacity of breast cancer cells to the bone in a three-dimensional model that recapitulates the major steps of this process [43]. These studies are in consonance with our findings, and suggest that sufficient levels of vit D may be necessary to prevent disease spreading in breast cancer.

Another relevant point of our study was to identify reduced vit D in plasma at diagnosis in chemoresistant patients. Tumors are highly adaptable and the activation of pro-survival signaling pathways and/or inactivation of the death-inducing pathway are intrinsically related to chemoresistance [44]. Sufficient levels of vitamin D are known to have additive or synergistic effects with classical cytotoxic agents, thus supporting their use in cancer therapy [45]. Some studies report improved cytotoxic effects following the combination of vit D with different taxanes, when compared to single drug-based treatments [37]. Pretreatment of breast cancer cells with vit D followed by paclitaxel significantly reduced its dose-response curve (38). Further, vit D treatment can decrease the expression of several RNA associated with drug

resistance [46]. This body of evidences suggests that lower levels of vit D may favor chemoresistance development in cancer cells.

When considering the molecular aspects of breast cancer, we noted that circulating vit D levels at diagnosis patients bearing luminal tumors were completely different from those carrying triple negative cancers. Breast cancer is known as a heterogeneous disease, covering a wide spectrum of different morphological subtypes, which result in biological behaviors with different outcomes [47, 48]. Low levels of circulating vit D are reported in woman who developed estrogen negative tumors [49]. In triple negative breast cancers, vit D suppresses several proteins enrolled in cell survival, invasion and metastasis [50], suggesting that its downregulation may be a necessary condition to ensure a “friendly” environment for cancer cells. In triple negative breast cancer stem cells, vit D supplementation is able to reduce its adhesive properties, as well as decrease its stem cell phenotype [51]. These studies suggest that restoring vit D may change the differentiation of such cells into a less aggressive phenotype, which may help to understand why we found higher levels of vit D in women bearing the less aggressive subtypes.

Finally, we found an association between reduced levels of circulating vit D at diagnosis and patients’ death. It was further related with disease prognosis, since patients grouped according to worst clinical-pathologic also exhibited reduced vit D in plasma. Reduced vit D at diagnosis was associated with worse overall survival in women with breast cancer worldwide [13,19, 52], and was well demonstrated in a recent large-cohort study conducted in the USA [53]. Although our relative modest cohort, our data are similar to the results from other studies, which strongly relate low circulating vit D levels with positive axillary lymph nodes [40], reduced overall survival and the occurrence of triple negative cancers. Another limitation of the study would be the uncontrolled factors that may influence results such as diet, sunscreen use and the period of the year the samples were collected. In conclusion, reduced vit D levels in plasma at breast cancer diagnosis may be a reliable plausible marker of disease poor prognosis.

## REFERENCES

[1] Lips P. 2010. Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 297–300.

- [2] Staples A Judith, Ponsonby Anne-Louise, Lim Lynette L-Y, and McMichael J Anthony. 2003. Ecologic analysis of some human-related disorders, including type 1 diabetes, in Australia: latitude, regional ultraviolet radiation, and disease prevalence, *Environ. Health Perspect.* 111: 518–523.
- [3] van der Mei IAF, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T. 2001. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology* 20: 165–167.
- [4] Cantorna MT. 2000. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 230–233.
- [5] Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. 1991. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States, *Gastroenterology* 100: 143–149.
- [6] Grant WB. 2002. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation, *Cancer* 94: 1867–1875.
- [7] Grant WB. 2003. Ecologic studies of solar UV-B radiation and cancer mortality rates, *Recent Results Cancer Res.* 164: 371–377.
- [8] Holick MF. 2001. Sunlight “D”ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. *Lancet* 357:4–6.
- [9] Nowson CA, McGrath JJ, Ebeling PR, Haikerwal A, Daly RM, Sanders KM, et al. 2012. Vitamin D and health in adults in Australia and New Zealand: a position statement. *Med J Aust* 196:686–7.
- [10] O'Sullivan F, van Geffen J, van Weele M, Zgaga L. 2018. Annual Ambient UVB at Wavelengths that Induce Vitamin D Synthesis is Associated with Reduced Oesophageal and Gastric Cancer Risk: a Nested Case-Control Study. *Photochem Photobiol.*
- [11] Cheney CP, Thorand B, Huth C, Berger K, Peters A, Seifert-Klauss V, Kiechle M, Strauch K, Quante AS. 2018. The Association between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Cancer Risk: Results from the Prospective KORA F4 Study. *Oncol Res Treat* 41(3):117-121.
- [12] Djurasinović VT, Mihaljević BS, Šipetić Grujičić SB, Ignjatović SD, Trajković G, Todorović-Balint MR, Antić DA, Bila JS, Andjelić BM, Jeličić JJ, Vuković VM, Nikolic AM, Klek S. 2018. 25(OH) vitamin D deficiency in lymphoid malignancies, its prevalence and significance. Are we fully aware of it? *Support Care Cancer.*
- [13] Ismail A, El-Awady R, Mohamed G, Hussein M, Ramadan SS. 2018. Prognostic Significance of Serum Vitamin D Levels in Egyptian Females with Breast Cancer. *Send to Asian Pac J Cancer Prev* 19(2):571-576.
- [14] Baumann M, Dani SU, Dietrich D, Hochstrasser A, Klingbiel D, Mark MT, Riesen WF, Ruhstaller T, Templeton AJ, Thürlimann B. 2018. Vitamin D levels in Swiss breast cancer survivors. *Swiss Med Wkly* 148:w14576.

- [15] Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, et al. 2005. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1991–1997.
- [16] Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, et al. 2010. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121, 469–477.
- [17] Holick MF. 2006. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog. Biophys. Mol Biol* 92: 49-59.
- [18] Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chen Z, Shang X, Ong M, Heber D, Koeffler HP, Vadgama JV. 2013. Vitamin D receptor gene polymorphisms and prognosis of breast cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE* 8 e57967.
- [19] Almeida-Filho BS, Vespoli HL, Pessoa EC, Machado M, Nahas-Neto J, Nahas EAP. 2017. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*.
- [20] Lam SW, Jimenez CR, Boven E. 2014. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat Rev* 40:129-38.
- [21] Welsh J. 2004. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr* 80:1721S-1724S.
- [22] Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. 2003. Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 133:2425S-2433S.
- [23] Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. 2015. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 16 (12), 4881-4883
- [24] Thanasitthichai S, Chaiwerawattana A, Prasitthipayong A. 2015. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 16: 4881-3.
- [25] Larriba MJ and Munoz A. 2010. Mechanisms of resistance to vitamin D action in human cancer cells. In: Holick MF, editor. *Vitamin D physiology, molecular biology, and clinical applications*. New York: Humana Press. pp. 325-33.
- [26] Neuhouser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambs A, Ulrich CM, McTiernan A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner K, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. 2008. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am. J. Clin. Nutr.* 88: 133-9.
- [27] Mohr SB, Gorham ED, Kim J, Hofflich H, Garland CF. 2014. Meta-analysis of vitamin D sufficiency for improving survival of patients with breast cancer. *Anticancer. Res.* 34: 1163-6.
- [28] Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. 2017. St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of

Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care (Basel)*. 12(2):102-107. doi: 10.1159/000475698.

[29] Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, et al. 2014. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *The British journal of nutrition* 111(1):23-45.

[30] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. 2011. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(7):1911-30.

[31] Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, et al. 2005. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 16:713–716.

[32] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338(2):143-56.

[33] Holick MF. 2007. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266–81.

[34] Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, Sarkissyan S, Chen Z, Shang X, et al. 2013. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. *PLoS ONE* 8(3): e57967.

[35] Zhang X, Harbeck N, Jeschke U, Doisneau-Sixou S. 2017. Influence of vitamin D signaling on hormone receptor status and HER2 expression in breast cancer. *Send to J Cancer Res Clin Oncol* 143(7):1107-1122. doi: 10.1007/s00432-016-2325-y.

[36] Alco G, Igdem S, Dincer M, Ozmen V, Saglam S, Selamoglu D, Erdogan Z, Ordu C, Pilanci KN, Bozdogan A, Yenice S, Tecimer C, Demir G, Koksall G, Okkan S. 2014. Vitamin D levels in patients with breast cancer: importance of dressing style. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(3):1357-62.

[37] Hershberger, PA, Yu, WD, Modzelewski, RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL. 2001. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 7: 1043–1051.

[38] Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Wieder R. 2000. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 60: 2040–2048.

[39] Chiang KC, Yeh CN, Hsu JT, Jan YY, Chen LW, et al. 2014. The vitamin D analog, MART-10, represses metastasis potential via downregulation of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 354, 235–244.

[40] Vrieling A, Hein R, Abbas S, Schneeweiss A & Flesch-Janys D, Chang-Claude J. 2011. Serum 25-hydroxyvitamin D and postmenopausal breast cancer survival: a prospective patient cohort study. *Breast Cancer Research*.

[41] Rossdeutscher L, Li J, Luco AL, Fadhil I, Ochietti B, et al. 2014. Chemoprevention activity of 25-hydroxyvitamin D in the MMTV-PyMT mouse model of breast cancer. *Cancer Prev Res* 8, 120–128.

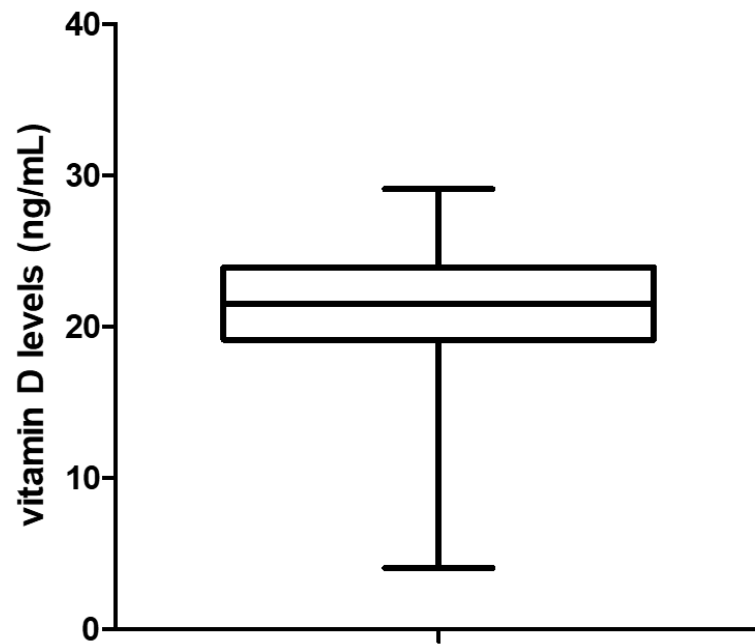
- [42] El Abdaimi K, Dion N, Papavasiliou V, Cardinal PE, Binderup L, et al. 2000. The vitamin D analogue EB 1089 prevents skeletal metastasis and prolongs survival time in nude mice transplanted with human breast cancer cells. *Cancer Res* 60, 4412–4418.
- [43] Parikh MR, Minser KE, Rank LM, Glackin CA, and Kirshner J. 2014. A reconstructed metastasis model to recapitulate the metastatic spread in vitro. *Biotechnol J* 9, 1129–1139.
- [44] Debatin K-M, Krammer PH. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23(16):2950-66.
- [45] Mohamed A. Abu el Maaty and Stefan Wölfl. 2017. Effects of 1,25(OH)2D3 on Cancer Cells and Potential Applications in Combination with Established and Putative Anti-Cancer Agents. *Nutrients* 9, 87; doi:10.3390/nu9010087.
- [46] Ting HJ, Hsu J, Bao BY, Lee YF. 2007. Docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in androgen independent prostate cancer cells are enhanced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 . *Cancer Lett* 247: 122–129.
- [47] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, Panel members. 2011. Strategies for subtypes– dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* 22: 1736–47.
- [48] Weigel MT, Dowsett M. 2010. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr. Relat. Cancer.* 17: R545–R262.
- [49] Yao S, Ambrosone CB. 2013. Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:337-41. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.09.010.
- [50] LaPorta E, Welsh J. 2014. Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144 Pt A:65-73. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.10.022.
- [51] Shan NL, Wahler J, Lee HJ, Bak MJ, Gupta SD, Maehr H, Suh N. 2017. Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 173:122-129. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.12.001. Epub 2016 Dec 5.
- [52] Wu Y, Sarkissyan M, Clayton S, Chlebowski R, Vadgama JV7. 2017. Association of Vitamin D3 Level with Breast Cancer Risk and Prognosis in African-American and Hispanic Women. *Cancers (Basel)* 24;9(10). pii: E144. doi: 10.3390/cancers9100144.
- [53] Yao S, Kwan ML, Ergas IJ, Roh JM, Cheng TD, Hong CC, McCann SE, Tang L, Davis W, Liu S, Quesenberry CP Jr, Lee MM, Ambrosone CB, Kushi LH. 2017. Association of Serum Level of Vitamin D at Diagnosis With Breast Cancer Survival: A Case-Cohort Analysis in the Pathways Study. *JAMA Oncol* 1;3(3):351-357. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4188.

**Table 1** – Clinicopathological characterization of patients.

<b>Number of patients</b>	<b>96</b>
Mean age at diagnosis (range, years)	56,1
<b>Histological type</b>	
Ductal infiltrative carcinoma	100%
<b>Histological grade</b>	
1 or 2	32
3	64
<b>Molecular subtype</b>	
Luminal A	40%
Luminal B	20%
HER-2/neu enriched	19%
Triple negative	11%
<b>Disease staging (TNM)</b>	
Early disease (I/II)	50%
Advanced disease (III/IV)	50%

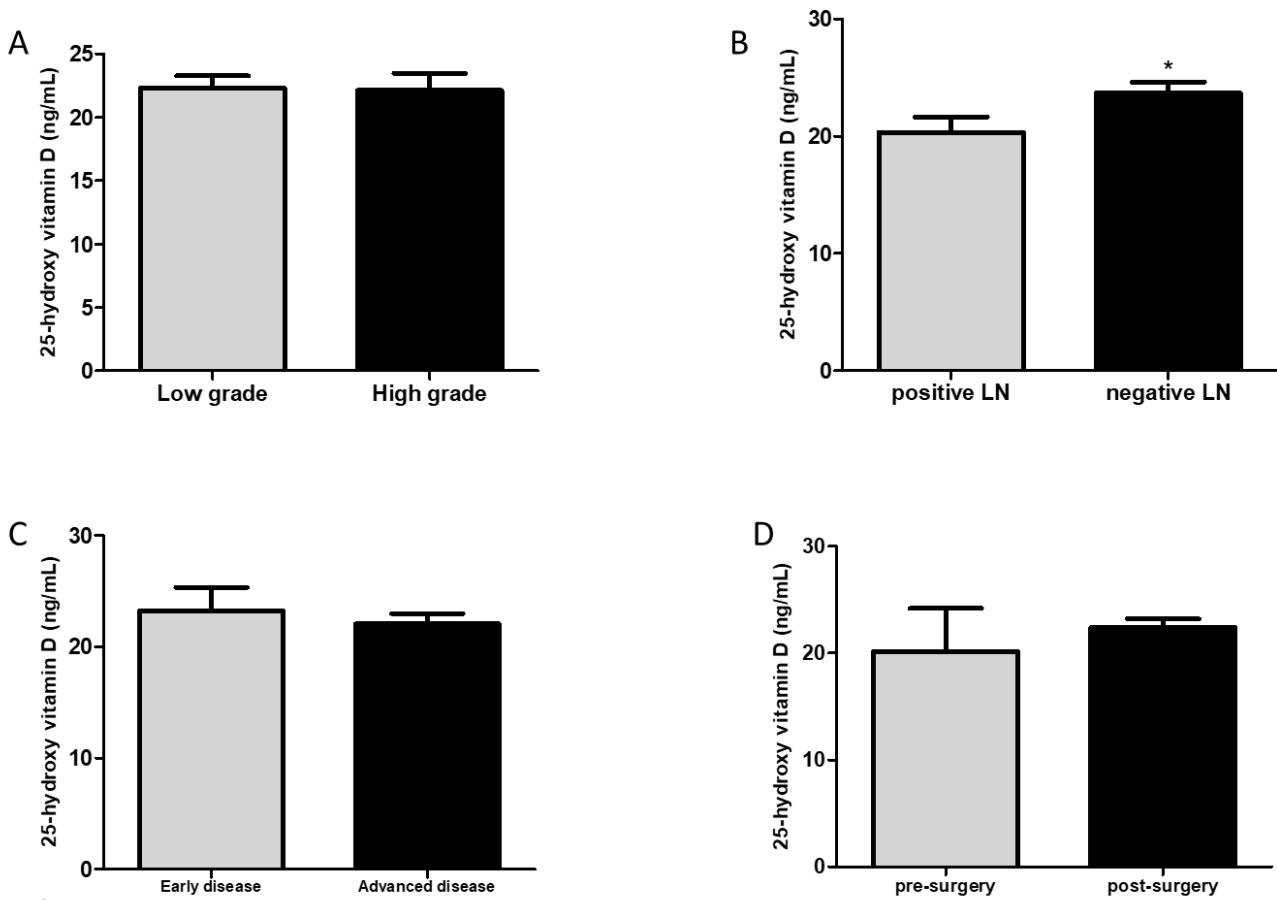
Legend: HER-2= human epidermal growth factor receptor 2, TNM = tumor –node- metastasis classification

1



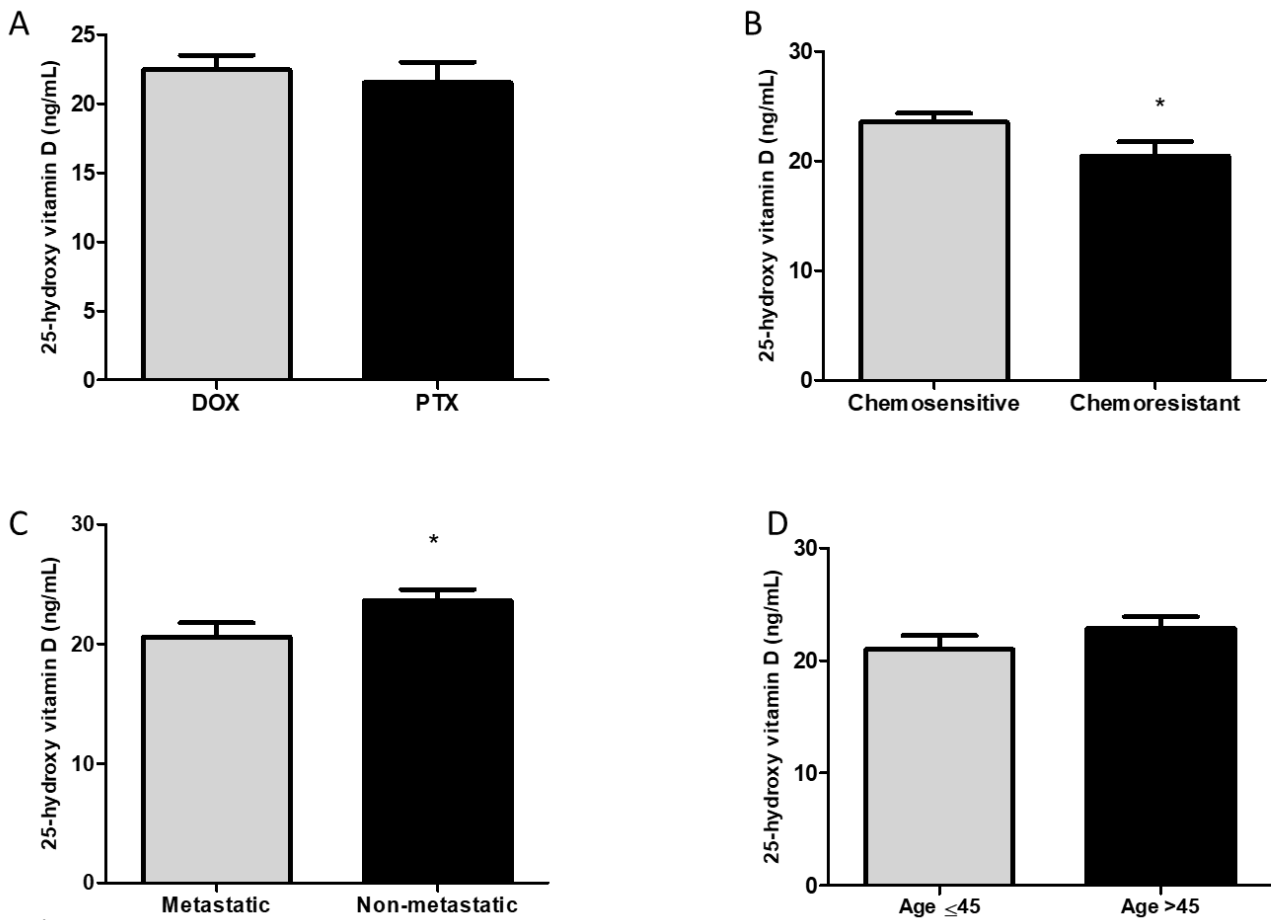
2

3 **Figure 1** – Overview of circulating levels of 25-hydroxyvitamin D in patients with  
4 breast cancer. The box represents the min-max values (4.05-29.10 ng/mL) and the  
5 median of the group (22 ng/mL).



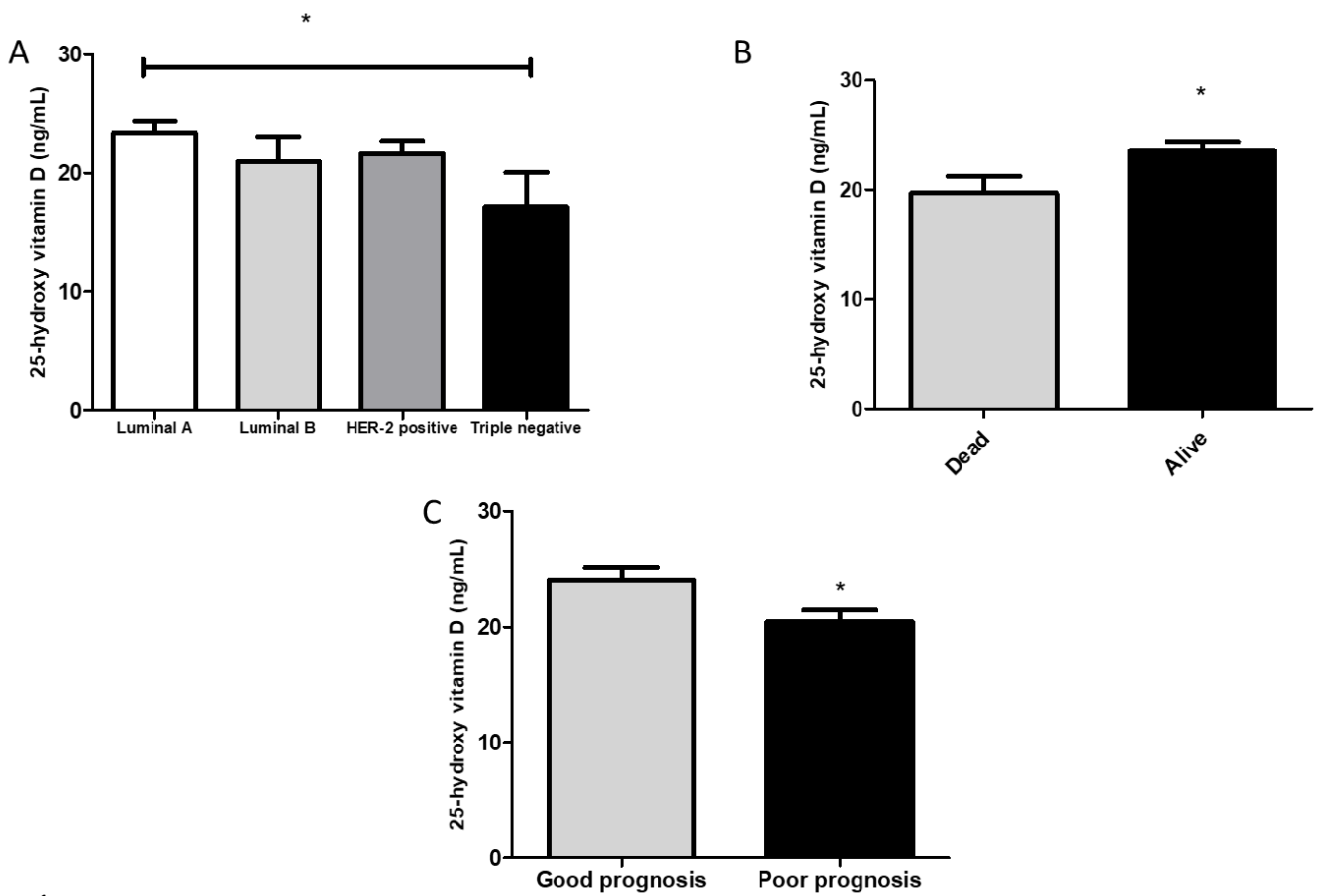
1

2 **Figure 2-** Categorization of circulating 25-hydroxyvitamin D according to the clinical and  
 3 histopathological features of breast cancer. (A) Histological grade, (B) lymphnodal  
 4 invasion, (C) TNM staging and (D) presence of the primary tumor at the time of blood  
 5 collection. \* indicates significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). LN = lymphnodes.



1

2 Figure 3- 25-hydroxyvitamin D distribution according to chemotherapeutic regimen and  
 3 response, disease spreading and age at diagnosis. (A) Chemotherapeutic regimen, (B)  
 4 profiling of treatment response, (C) metastatic status and (D) age at diagnosis. \* indicates  
 5 significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). DOX = doxorubicin, PTX = paclitaxel.



1

2 **Figure 4** – Evaluation of 25-hydroxyvitamin D circulating levels according to breast  
 3 cancer molecular subtypes and disease prognosis. (A) molecular subtypes of breast  
 4 cancer, (B) Survival status after 5 years follow-up and (C) disease prognostic. \*  
 5 indicates significant difference between groups ( $p < 0.05$ ). HER2 = epidermal growth  
 6 factor receptor 2 overexpression.

**ARTIGO 2**

1

2 **Proinflammatory circulating markers: new players for evaluating asymptomatic**  
3 **acute cardiovascular toxicity in breast cancer treatment.**

4 Micheletti P. L.<sup>1</sup>; Alves V. D.<sup>2</sup>; Malanowski J.<sup>2</sup>, Victorino, V. J.<sup>3</sup>; Herrera A.C.S.A.<sup>4</sup>;  
5 Rech D.<sup>2,5</sup>; Souza J. A. O.<sup>5</sup>; Simão, A. N.C.<sup>1</sup>; Panis, C.<sup>2\*</sup> and Dichi I.<sup>1\*</sup>.

6 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de  
7 Londrina, Paraná, Brazil.

8 <sup>2</sup> Laboratório de Biologia de Tumores, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,  
9 Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

10 <sup>3</sup> Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Engenheiro Paulo de Frontin, Rio de  
11 Janeiro, Brazil.

12 <sup>4</sup> Pontifícia Universidade Católica de Londrina, Paraná, Brazil.

13 <sup>5</sup> Hospital de Câncer de Francisco Beltrão, Ceonc, Paraná, Brazil.

14 \* *These authors equally contributed to the study.*

15

**Corresponding Author:**

16 Carolina Panis, Ph.D

17 Universidade Estadual do Oeste do Paraná

18 Centro de Ciências da Saúde

19 Rodovia Vitório Traiano Km2

20 Francisco Beltrão, Paraná, Brazil

21 Phone +55 46 35200715

22 Email: [carolpanis@hotmail.com](mailto:carolpanis@hotmail.com)

23

## ABSTRACT

**Purpose:** The aimed at evaluating markers of cardiac damage (total CK, CKMB and CRP), inflammatory markers (free iron, homocysteine and TNF- $\alpha$ ) as well as lipidogram in breast cancer patients undergoing acute cycles of doxorubicin (DOX), paclitaxel (PTX) or trastuzumab (TZ) and to verify if there is an association between these markers and the toxicity to the chemotherapeutic treatment.

**Methods:** Included in the study were 120 breast cancer patients and 50 healthy controls. All analyzes were performed on automated systems. For the statistical analyzes, each group was compared with the controls according to their normality by Student's t-test and Mann-Whitney test.

**Results:** Our results showed that DOX treatment led to increased hsCRP ( $4.80 \pm 1.23$  mg/dL,  $p = 0.0005$ ), tryglycerides ( $187.6 \pm 25.06$ ,  $p = 0.0231$ ), TNF- $\alpha$  ( $42.31 \pm 17.96$  pg / mL,  $p = 0.01$ ) and Fe levels ( $138.8 \pm 18.6$   $\mu$ g / dL,  $p = 0.0193$ ). PTX induced changes in CK-MB ( $8.78 \pm 4.2$  U / L,  $p = 0.0361$ ), hsCRP ( $7.12 \pm 1.87$  mg / dL,  $p = 0.0006$ ), cholesterol ( $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.05$ ), triglyceride ( $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.0277$ ), TNF- $\alpha$  ( $38.27 \pm 9.12$  pg / mL,  $p = 0.023$ ), homocysteine ( $10.95 \pm 0, 86$   $\mu$ mol / L,  $p = 0.005$ ), free iron ( $113 \pm 18 6$   $\mu$ g / dL,  $p = 0.045$ ) while TZ augmented CK-MB ( $6.9 \pm 1.97$  U / L,  $p < 0.00$ ), hsPCR ( $3.12 \pm 0.68$  mg / dL,  $p = 0.095$ ), cholesterol ( $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0317$ ), triglyceride ( $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0127$ ), TNF- $\alpha$  ( $89.6 \pm 12.11$ ,  $p = 0.032$ ), homocysteine ( $9.95 \pm 1.15$   $\mu$ mol / L,  $p = 0.0396$ ), free iron ( $120.5 \pm 4.64$   $\mu$ g / dl,  $p = 0.0058$ ).

**Conclusions:** Our data demonstrated the existence of a proinflammatory net triggered by breast cancer chemotherapy that could increase cardiomyocytes permeability and allow the leakage of circulating proteins as hsCRP and CKMB.

**Keywords:** breast cancer; chemotherapy; proinflammatory markers; cardiac toxicity.

## INTRODUCTION

Although breast cancer treatment has experienced significant progress in recent years, chemotherapy remains the main modality for treating patients with disseminated disease. The main drugs used for treating breast cancer are associated with numerous side effects, and cardiotoxicity is one of the most significant [1]. Cardiotoxicity can appear as acute or subacute events [2] and patients may have a variety of clinical forms of heart disease, including congestive heart failure (CHF), decreased left ventricular ejection fraction (LVEF), hypertension, arrhythmias and acute myocardial ischemia with or without ST elevation [3].

Chemotherapy and radiotherapy may cause premature cardiac disease that may be asymptomatic or symptomatic [4]. One of the challenges of modern oncology is to be able to tailor a patient's treatment by administering the drugs most adapted to the molecular characteristics of the disease while simultaneously preventing or reducing side effects [5]. Therefore, an important aspect is the detection of cardiovascular conditions that predispose cardiotoxicity in patient [5]. On the other hand, there are no tools to date to establish whether or when patients will develop such condition. Routinely, cardiac damage can be assessed in blood by measuring classical circulating markers as troponins, creatine-kinase and lactate dehydrogenase, since these proteins leak from cardiomyocytes due to the increase of membrane permeability as consequence of proinflammatory conditions or cell death [6, 7].

Studies have described wide modifications in genes and proteins acutely induced by chemotherapeutic regimens at subclinical levels, suggesting that cardiac damage is an earlier event prior to clinical symptoms in breast cancer patients [8, 9]. Thus, new markers associated with cardiac injury are rising. A recent proteomic study conducted by our group has shown that a single dose of paclitaxel can change the circulating proteomic profile in breast cancer patients, appointing acute cholesterol deregulation as a putative pathway associated with chemotherapy infusion [10]. Further, we verified that doxorubicin also modifies circulating proteins one hour after infusion in women with breast cancer, downregulating some acute phase proteins in relation to untreated patients [11]. Other proteins like natriuretic peptides [12], troponin T [13] and nitric oxide-arginine metabolites have been implicated in initial

cardiotoxicity of trastuzumab-based regimens during breast cancer treatment [14]. These data reinforce the need for early monitoring cardiac damage in breast cancer patients ongoing chemotherapy, and highlight that non-conventional circulating markers can be useful tools for quickly detecting both subclinical and clinical cardiotoxicity when associated with routine circulating markers. In this context, we compared routine circulating markers of cardiac damage (total creatine-kinase, high-sensitivity C-reactive protein, as well as concentrations of circulating lipids (cholesterol and tryglicerides) and its concomitant occurrence with other putative markers of heart injury (tumor necrosis factor alpha, free iron and homocysteine) in breast cancer patients ongoing doxorubicin, paclitaxel or trastuzumab-based treatments, aiming to assess the possible association between inflammation and cardiac damage in asymptomatic patients.

## PATIENTS AND METHODS

This study enrolled patients diagnosed with breast cancer attended in two public Oncology Hospitals (Londrina Cancer Institute, Londrina, Paraná and Francisco Beltrão Cancer Hospital, Ceonc, Francisco Beltrão, Paraná). All patients were informed about the study and signed consent forms. This study was approved by Institutional Ethics board (CAAE 35524814.4.0000.0107).

A total of 120 breast cancer patients and 50 healthy controls were included in the study, and categorized as control group (CTR group,  $n = 50$ , healthy individuals without any previous chemotherapeutic treatment). The patients with breast cancer were assigned into one of the following groups: doxorubicin group (DOX group,  $n = 33$ , doxorubicin  $60 \text{ mg/m}^2$ ), paclitaxel group (PTX group,  $n = 35$ , paclitaxel  $175 \text{ mg/m}^2$ ), and trastuzumab group (TZ group,  $n = 52$ , submitted to 8 cycles of trastuzumab, starting with  $8 \text{ mg/kg}$  for 1 cycle and following with  $6 \text{ mg/kg}$  for 7 cycles). The blood collection in DOX and PTX groups was performed after the first cycle of chemotherapy, while collecting blood samples in the TZ group was performed after the eighth cycle, ensuring plasma trastuzumab concentration stable levels [15].

Peripheral blood samples were collected from all groups by venous puncture (10 mL), centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes and the obtained plasma frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$

until analyses. Exclusion criteria in all groups were patients who underwent prior chemotherapy, patients with chronic morbidities and smokers, and patients with any cardiac pathology or conditions which could affect homocysteine metabolism. The markers chosen for evaluating cardiac toxicity were total creatine-kinase (total CK), its MB fraction (CK-MB) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP). The proinflammatory markers were: free iron (Fe), tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and homocysteine. Lipidic profile was also included (total cholesterol and tryglycerides levels). The measurements were compared with samples from healthy controls.

All analyzes were conducted in automatized systems, and TNF-  $\alpha$  was measured by a commercial ELISA kit (e-Biosciences, USA). For statistical analyzes, all data were evaluated by the Grubbs test for detection of outliers. Data distributions were also performed, and each group was compared with controls according its normality by Student t test (parametric data) and Mann-Whitney test (non-parametric data). DOX, PTX and TZ groups were not compared among them. Significant results were considered when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Clinical-pathologic characteristics of patients are shown in Table 1. Control group (CTR group,  $n = 50$ ) consisted of healthy women with average age of 55.2 years (range 30-77 years); Doxorubicin group (DOX group,  $n = 33$ ), comprising women with a mean age of 51.35 years (range 33-72 years), the paclitaxel group (PTX group,  $n = 35$ ), comprising women with a mean age of 51.06 years (range 35-63 years), and the trastuzumab group (TZ group,  $n = 52$ ), consisted of women with a mean age of 53.4 (range 36-77 years). All patients included in the study were diagnosed with infiltrative ductal carcinoma of the breast. DOX and PTX patients presented predominantly Luminal A tumors, while TZ had exclusively HER2-amplified/hormonal receptors negative tumors.

Figure 1 shows the circulating levels of routine cardiac markers. Total CK did not change after any treatment when compared to controls (CTR  $68,33 \pm 6,5$  U/L; DOX  $51,65 \pm 7,73$  U/L; PTX  $63,24 \pm 8,6$  U/L; and TZ  $81,65 \pm 6,4$  U/L, Figure 1A). Increased CK-MB levels were found in the group treated with trastuzumab ( $p < 0.001$ ) and in those treated with paclitaxel ( $p = 0.0361$ ) when compared to healthy controls

(CTR  $1,26 \pm 0,338$  U/L; DOX  $5,208 \pm 2,73$  U/L; PTX  $8,78 \pm 4,2$  U/L, TZ  $6,9 \pm 1,97$  U/L Figure 1B). Plasma levels of hs C-reactive protein were significantly higher in the three groups after treatment (CTR  $0,66 \pm 0,18$  mg/dL; DOX  $4,80 \pm 1,23$  mg/dL,  $p=0.0005$ ; PTX  $7,12 \pm 1,87$  mg/dL,  $p=0.0006$ ; TZ  $3,12 \pm 0,68$  mg/dL,  $p=0.095$ ; Figure 1C).

Lipidic profile showed a significant increase in total cholesterol levels in patients treated with paclitaxel and trastuzumab (PTX  $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.05$ , TZ  $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0317$ , Figure 2A), in relation to the healthy controls (CTR Cholesterol  $167.1 \pm 7.85$ ); and in triglycerides levels (DOX  $187.6 \pm 25.06$ ,  $p = 0.0231$ , PTX  $201.7 \pm 19.54$ ,  $p = 0.0277$ , TZ  $218.3 \pm 16.79$ ,  $p = 0.0127$ ), regarding control data (CTR Triglycerides  $137.9 \pm 5.24$ , Figure 2B).

Analysis of circulating TNF- $\alpha$  showed an increase in this cytokine in all treated groups when compared to controls (CTR  $9,47 \pm 1,56$  pg/mL; DOX  $42,31 \pm 17,96$  pg/mL,  $p=0,01$ ; PTX  $38,27 \pm 9,12$  pg/mL,  $p=0,023$ ; and TZ  $89,6 \pm 12,11$ ,  $p=0,032$ , Figure 3A). Plasma homocysteine levels were significantly augmented in DOX, PTX and TZ groups in relation to healthy controls (CTR  $7,80 \pm 0,397$   $\mu$ mol/L; DOX  $9,11 \pm 0,83$   $\mu$ mol/L,  $p=0.021$ ; PTX  $10,95 \pm 0,86$   $\mu$ mol/L,  $p=0.005$ ; and TZ  $9,95 \pm 1,15$   $\mu$ mol/L,  $p=0.0396$ , Figure 3B). Free iron was found significantly elevated in DOX, PTX and TZ groups (CTR  $89,17 \pm 9,5$  ug/dL; DOX  $138,8 \pm 18,6$  ug/dL,  $p=0,0193$ ; PTX  $113 \pm 18,6$  ug/dL,  $p=0.045$ ; and TZ  $120,5 \pm 4,64$  ug/dL,  $p=0.0058$ , Figure 3C).

## DISCUSSION

Measuring circulating markers of cardiac damage will not replace the clinical diagnosis of heart pathology, but may predict the earlier occurrence of cardiomyocytes damage and the need for patient monitoring. In the present study, we show that routine markers of cardiac damage evaluation as CKMB and hs C-reactive protein are altered in blood after acute treatment in breast cancer patients. Other pro-inflammatory mediators as TNF- $\alpha$ , homocysteine, and free iron were concomitantly augmented in the same plasma samples from all treated patients, suggesting a possible interplay among them and their relationship with cardiac damage.

CKMB is a faithful marker for cardiac injury [16]; thus, its elevation in plasma of breast cancer patients after the eight cycle of trastuzumab treatment may be suggestive of subclinical cardiac damage in our study. The drugs used in breast cancer chemotherapy have considerable side effects, and cardiovascular injury is one of the most frequent. When we analyzed creatine kinase fraction B (CKMB), a significant increase was found in patients treated with trastuzumab. Trastuzumab therapy has dramatically improved the clinical outcome of patients with breast cancer that overexpress human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2), and treatment-induced cardiotoxicity has been emerged as a relevant clinical problem [17]. This toxicity increases when trastuzumab is administered with anthracyclins, which is a current protocol in breast cancer treatment [17, 18]. Similarly, PTX treatment produced significant increases in serum CKMB. A study conducted by [19] showed that mice treated with PTX alone also showed an increase in CKMB levels evidencing heart injury, where the PTX produced significant depletion of cardiac GSH and GSH-Px and increases in MDA production level and NOx levels in a lower magnitude than those changes produced by DOX alone.

Another circulating marker analyzed in the present study was C-reactive protein, an acute phase protein synthesized by the liver associated with systemic pro-inflammatory conditions. C-reactive protein levels enhanced significantly in all groups undergoing chemotherapy. CRP is routinely known as a cardiovascular risk marker, associated with heart damage induced- inflammation [20]. CRP binds to specific ligands exposed in the damaged tissue and can increase heart damage extent boosting proinflammatory related-processes [21]. Therefore, the augmented levels of circulating hsCRP found in the current study may potentiate the output of other markers of cardiac lesion also found altered in the set of parameters evaluated for some drugs, such as CK-MB in trastuzumab-treated patients. Although, its prime role is in the pathogenesis of coronary heart disease, researchers have associated plasma/serum lipids and lipoproteins with different cancers [22, 23, 24, 25]. Alterations in the circulatory cholesterol levels have been associated with the etiology of breast cancer [26]. Moreover, there are reports regarding elevated plasma lipid levels, such as total lipids, phospholipids, triglycerides, total-cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol and free fatty acids, in pre and post-menopausal breast cancer [27]. Anticancer treatment, especially cytotoxic chemotherapy, is associated

with immediate, as well as long-term toxicities [28], and some of them are associated with metabolic changes that could lead to increased cardiovascular risk [29, 30]. A report on Italian pre- and post-menopausal patients with early breast cancer showed increased cholesterol levels in patients who received cytotoxic chemotherapy, but not in those who also received endocrine therapy [30]. Further, a recent study from our group demonstrated that lipid metabolism is acutely deregulated in breast cancer after paclitaxel treatment [10]. Our findings are in agreement with this information, and showed a significant increase in plasma levels of total cholesterol after paclitaxel and trastuzumab treatment, and triglycerides in all treated groups. Considering the pro-inflammatory environment detected in such patients after treatment, high lipids may represent a real factor for cardiovascular risk, since inflammation can promote the formation of potent reactive molecules as oxidized cholesterol [31, 32].

Considering that breast cancer is under systemic oxidative stress, and that chemotherapy enhances this situation, we also investigated if the levels of homocysteine were altered in patients after treatment altogether with the routine markers of cardiac damage. Homocysteine is as an intermediate metabolite formed under prooxidant conditions, by cysteine and methionine oxidation, which is straightly associated with endothelial dysfunction [33] cardiovascular damage [34] and high risk of venous thromboembolism [35]. We found that homocysteine levels were significantly higher in both PTX and TZ groups, suggesting that our patients were under cardiovascular risk. Some evidences have confirmed that elevated plasma levels of homocysteine as an independent risk factor may induce endothelial dysfunction through oxidative stress and apoptosis [36] Thus, high levels of plasma homocysteine, as an independent risk factor, contribute to the occurrence and development of cardiovascular diseases [37, 38]. These findings of hyperhomocysteinemia in breast cancer women after treatment are new in the literature, and from the best of our knowledge, were never previously reported.

We further found that, together with systemic proinflammatory status, the patients also presented high levels of circulating free iron. In our study, circulating free iron was significantly higher in the group treated with DOX. Free iron is extremely toxic due to the induction of lipid peroxidation by Fenton's reaction [39] a mechanism intimately associated with DOX-induced cardiotoxicity [40].

Taking into account the proinflammatory milieu found after cytotoxic chemotherapy and the concomitant rising of cardiovascular risk shown by increases in CKMB, hs C-reactive protein and homocysteine levels, we may establish some considerations in relation to the altered TNF- $\alpha$  levels. TNF-alpha is a mediator of interest for understanding the systemic proinflammatory milieu of breast cancer. This cytokine is secreted primarily by macrophages, and has a range of pro-inflammatory functions. Several studies indicate that TNF-alpha levels are especially high in plasma of patients with advanced breast cancer, [41, 42], and were also found increased in the present study. Unfortunately, most of patients with breast cancer have been diagnosed with advanced disease in Brazil [43], as it was also verified in our study since most of patients (80%) were undergoing adjuvant chemotherapy. As shown in our results, serum concentrations of this cytokine varied significantly in all groups after chemotherapy, and data showed a wide variation among them. In TZ group, the average was roughly nine times higher than the controls. Therefore, an active proinflammatory state was triggered in such patients after chemotherapy when compared to healthy controls. It is possible that cancer itself has some contribution to this finding, as we have previously demonstrated that patients submitted to DOX treatment can reduce TNF- $\alpha$  levels [11]. It is feasible to suggest that an immune activation also occurred after tumor destruction by chemotherapy with PTX and TZ considering the significant high levels found in TNF- $\alpha$  levels. It is known that tumors can mask its antigens aiming to self-protect from immunological-driven responses [44]. Cytotoxic chemotherapy acts by inducing tumor death by several mechanisms, and the intense cellular lysis releases several new proteins that will be recognized by immune cells as foreign. In our study, we have a set of pro-inflammatory mediators that not necessarily target heart proteins as antigens, but affects cardiac cells in a not-selectively way, augmenting its permeability to leak some intracellular enzymes as CKMB. Moreover, Serbanescu et al. (2017) [45] have also demonstrated that cytotoxic chemotherapy is associated with enhanced oxidative stress after DOX, PTX and TZ treatments, leading to systemic lipid peroxidation. Lipid peroxidation can compromise the integrity of cell membrane, thus, it is possible to hypothesize that this way of injury can also affect the cardiomyocytes, augmenting membrane permeability and allowing protein leaking. In this way, we measured the levels of lactate dehydrogenase in such patients (data not shown), but due to the wide range of variation among samples this analysis did not vary significantly in compared groups.

Our study has some limitations (modest sample size, need for long-term follow-up, measurement of other circulating markers). However, this is the first study to show that routine circulating markers of cardiac injury can be used as possible predictors of drug-induced cardiotoxicity used in chemotherapy (doxorubicin, paclitaxel and trastuzumab) as early as the first cycles of treatment of patients diagnosed with cancer of breast. Further studies are needed to analyze the role of circulating markers as a putative concomitant marker of cardiovascular risk in asymptomatic chemotherapeutic patients with ongoing breast cancer.

**CONFLICT OF INTEREST:** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval:** All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed consent:** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Financial Support:** This research was granted by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 444830-2014/6 awarded by Dr. Carolina Panis.

## REFERENCES

- [1] Martel S, Maurer C, Lambertini M, Pondé N, De Azambuja E (2017) Breast cancer treatment-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 16(9):1021-1038. doi: 10.1080/14740338.2017.1351541.
- [2] Kalil Filho R et al (2011) I Brazilian Guideline on Cardio-Oncology of the Brazilian Society of Cardiology. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo , v. 96, n. 2, supl. 1, p. 01-52.
- [3] ADES F, et al. *The Breast*, 2013.

- [4] Carver JR, Szaldac D, Kya B (2013) Asymptomatic Cardiac Toxicity in Long-Term Cancer Survivors: Defining the Population and Recommendations for Surveillance. *Semin Oncol* 40(2): 229–238.
- [5] Ades F, Zardavas D, Pinto AC, Criscitiello C, Aftimos P, de Azambuja E (2014) Cardiotoxicity of systemic agents used in breast cancer. *Breast* 23(4):317-28. doi: 10.1016/j.breast.2014.04.002.
- [6] Danese E, Montagnana M (2016) An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Transl Med* 4(10):194. doi: 10.21037/atm.2016.05.19.
- [7] Kragten JA, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP (1996) Cardiac troponin T release into plasma after acute myocardial infarction: only fractional recovery compared with enzymes. *Ann Clin Biochem* 33 ( Pt 4):314-23.
- [8] Nordgren KKS, Hampton M, Wallace KB (2017) Editor's Highlight: The Altered DNA Methylome of Chronic Doxorubicin Exposure in Sprague Dawley Rats. *Toxicol Sci* 1;159(2):470-479. doi: 10.1093/toxsci/kfx150.
- [9] Carvalho RA, Sousa R P, Cadete V J, Lopaschuk G D, Palmeira C M, Bjork J A and Wallace K B (2010) Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology* 270, 92–98.
- [10] Panis C, Binato R, Correa S, Victorino VJ, Dias-Alves V, Herrera ACSA, Cecchini R, Simão ANC, Barbosa DS, Pizzatti L, Abdelhay E (2017) Short infusion of paclitaxel imbalances plasmatic lipid metabolism and correlates with cardiac markers of acute damage in patients with breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 80(3):469-478. doi: 10.1007/s00280-017-3384-8. Epub 2017 Jul 8.
- [11] Panis C, Pizzatti L, Bufalo AC, Herrera AC, Victorino VJ, Cecchini R, Abdelhay E (2016) Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. *Tumour Biol* 37(3):3775-83. doi: 10.1007/s13277-015-4203-7.
- [12] Ürun Y, Utkan G, Yalcin B, Akbulut H, Onur H, Oztuna DG, Şenler FC, Demirkazık A, İçli F (2015) The role of cardiac biomarkers as predictors of trastuzumab cardiotoxicity in patients with breast cancer. *Exp Oncol* 37(1):53-7.
- [13] Ponde N, Bradbury I, Lambertini M, et al (2018) Cardiac biomarkers for early detection and prediction of trastuzumab and/or lapatinib-induced cardiotoxicity in patients with HER2-positive early-stage breast cancer: a NeoALTTO sub-study (BIG 1-06). *Breast Cancer Res Treat* 168(3):631-638. doi: 10.1007/s10549-017-4628-3.
- [14] Finkelman BS, Putt M1, Wang T, et al (2017) Arginine-Nitric Oxide Metabolites and Cardiac Dysfunction in Patients With Breast Cancer. *J Am Coll Cardiol*. 11;70(2):152-162. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.019.
- [15] Lemos LG, Victorino VJ, Herrera AC, Aranome AM, Cecchini AL, Simão AN, Panis C, Cecchini R (2015) Trastuzumab-based chemotherapy modulates systemic redox homeostasis in women with HER2-positive breast cancer. *Int Immunopharmacol* 27(1):8-14. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.037.

- [16] Hurst J W, Ilogue R B, Walter P F (1978) The Clinical Recognition and Management of Coronary Atherosclerotic Heart Disease. in Hurst. J. W. (ed.): The Heart (New York: McGraw-Hill Book Co.).
- [17] Yu AF, Yadav NU, Lung BY, Eaton AA, Thaler HT, Hudis CA, Dang CT, Steingart RM (2015) Trastuzumab interruption and treatment-induced cardiotoxicity in early HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 149(2):489-95. doi: 10.1007/s10549-014-3253-7.
- [18] Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A et al (2015) Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 36:326–48. doi:10.1016/j.tips.2015.03.005.
- [19] Saad SY, Najjar TA, Alashari M (2004) Cardiotoxicity of doxorubicin/paclitaxel combination in rats: effect of sequence and timing of administration. *J Biochem Mol Toxicol* 18(2):78-86.
- [20] Torzewski J, Hombach V, Nienhaus GU (2008) C-reactive protein and atherosclerosis: an update. *Vasc Dis Prev* 5:178–182
- [21] Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, Pepys MB (1999) C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 190:1733–1739
- [22] Schatzkin A, Hoover RN, Taylor PR, et al (1988) Site-specific analysis of total serum cholesterol and incident cancer in the national health and nutrition examination survey I epidemiologic follow-up study. *Cancer Res* 48:452–8.
- [23] Gerber M, Richardson S, Crastes de Paulet P, Pujol H, Crastes de Paulet A (1989) Relationship between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in breast cancer. Nutritional and metabolic aspects. *Cancer* 64:2347–53.
- [24] Chyou PH, Nomura AM, Stemmermann GN, Kato I (1992) Prospective study of serum cholesterol and site-specific cancers. *J Clin Epidemiol* 45:287–92.
- [25] Forones NM, Falcao JB, Mattos D, Barone B (1998) Cholesterolemia in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 45:1531–4.
- [26] Laisupasin P, Thompat W, Sukarayodhin S, Sornprom A, Sudjaroen Y (2013) Comparison of Serum Lipid Profiles between Normal Controls and Breast Cancer Patients. *J Lab Physicians* 5(1):38-41. doi: 10.4103/0974-2727.115934.
- [27] Bani IA, Williams CM, Boulter PS, Dickerson JW (1986) Plasma lipids and prolactin in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 54:439–46.
- [28] Rosenberg SM, Partridge AH (2013) Premature menopause in young breast cancer: effects on quality of life and treatment interventions. *J Thorac Dis* 5:S55–61.
- [29] Freedman RJ, Aziz N, Albanes D, et al (2004) Weight and body composition changes during and after adjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2248–53.

- [30] Arpino G, De Angelis C, Buono G, et al (2015) Metabolic and anthropometric changes in early breast cancer patients receiving adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 154:127–32.
- [31] Sharma M, Tuaine J, McLaren B, Waters DL, Black K, Jones LM, McCormick SP (2016) Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. *PLoS One* 25;11(1):e0148049. doi: 10.1371/journal.pone.0148049.
- [32] Alexopoulos CG, Pournaras S, Vaslamatzis M, Avgerinos A, Raptis S (1992) Changes in serum lipids and lipoproteins in cancer patients during chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 412–6. PMID: 1505080.
- [33] Fan CD, Sun JY, Fu XT, Hou YJ, Li Y, Yang MF, Fu XY, Sun BL (2017) Astaxanthin Attenuates Homocysteine-Induced Cardiotoxicity in Vitro and in Vivo by Inhibiting Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage. *Front Physiol* 12;8:1041. doi: 10.3389/fphys.2017.01041.
- [34] Vannucchi H, Melo SS (2009) Hyperhomocysteinemia and cardiometabolic risk. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(5):540-9. Review.
- [35] Yamashita EK et al (2014) *Journal of Clinical Laboratory Analysis*: v.28, p. 157-162.
- [36] Almashhadany A, Shackebaei D, Van der Touw T, Jones GL, Suleiman MS, King N (2015) Homocysteine exposure impairs myocardial resistance to ischaemia reperfusion and oxidative stress. *Cell. Physiol. Biochem.* 37, 2265–2274. doi: 10.1159/000438582.
- [37] Feng X and Xu Y (2017) Hyperhomocysteinemia as a metabolic risk factor for glucose intolerance among high-risk groups of chinese adults. *Med. Sci. Monit.*23, 2775–2781. doi: 10.12659/MSM.905002.
- [38] Markisic M, Pavlovic AM, Pavlovic DM (2017) The impact of homocysteine, vitamin b12, and vitamin d levels on functional outcome after first-ever ischaemic stroke. *Biomed Res. Int.* 5489057. doi: 10.1155/2017/5489057.
- [39] Corna G, Santambrogio P, Minotti G, Cairo G (2004) Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen species and ferritin. *J Biol Chem* 2;279(14):13738-45.
- [40] Minotti G, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G, Cairo G (2004) Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* 378:340-61. Review.
- [41] Panis C, Pizzatti L, Herrera AC, Cecchini R, Abdelhay E (2013) Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. *Cancer Lett* 1;330(1):57-66. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.020. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23200674.

- [42] Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12: 298–306.
- [43] Suleiman NN, Nascimento N, Botelho JMS, Coelho RC (2017) Overview of female breast cancer in northern Tocantins - Brazil. *Rev Col Bras Cir* 44(4):316-322. doi: 10.1590/0100-69912017004001.
- [44] Donnenberg VS, Landreneau RJ, Donnenberg AD (2007) Tumorigenic stem and progenitor cells: implications for the therapeutic index of anti-cancer agents. *J Control Release* 122(3):385-91.
- [45] Serbanescu GL, Gruia MI, Bara M, Anghel RM (2017) The evaluation of the oxidative stress for patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *J Med Life* 10(1):99-103.

Table 1 – Clinicopathological characteristics of patients.

	<b>Healthy controls</b>	<b>DOX</b>	<b>PTX</b>	<b>TZ</b>
Number of patients	50	33	35	52
Age at diagnosis	55,2	51,35	51,06	53,4
(range)	(30 – 77 )	(33-72)	(35-63)	(36-77)
Histological type	----	100% ductal	100% ductal	100% ductal
Chemotherapeutic regimen	----	60 mg/m <sup>2</sup>	175 mg/m <sup>2</sup>	6 mg/m <sup>2</sup>
Blood collection	----	End of the cycle 1	End of the cycle 1	End of the cycle 8
Hormonal and HER2 status	----	ER: 85% PR : 79% HER-2: 29%	ER:72% PR : 72% HER-2: 35%	HER-2: 100%

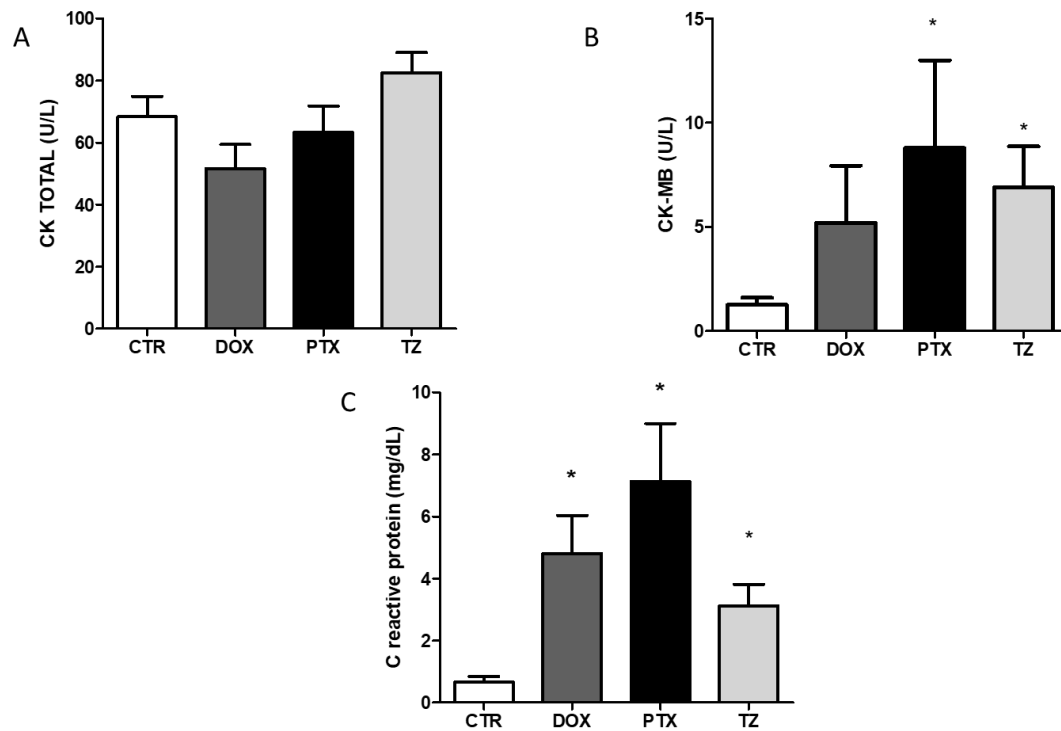


Figure 1 – Circulating levels of cardiac markers. In A, total creatine-kinase (CK-Total), in B creatine-kinase fraction B (CKMB) and in C, C reactive protein. Data are presented as means and the errors of the means. \* indicates significant difference in comparison to healthy controls (CTR). DOX = patients diagnosed with breast cancer treated with doxorubicin; PTX= patients diagnosed with breast cancer treated with paclitaxel, and TZ = = patients diagnosed with breast cancer treated with trastuzumab.

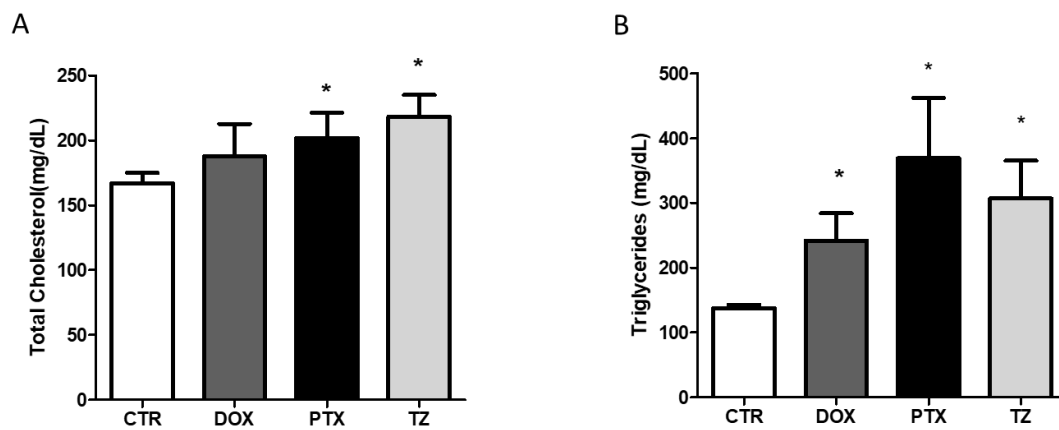


Figure 2 – Lipidic profiling. In A, total cholesterol and in B triglycerides levels. Data are presented as means and the errors of the means. \* indicates significant difference in comparison to healthy controls (CTR). DOX = patients diagnosed with breast cancer treated with doxorubicin; PTX = patients diagnosed with breast cancer treated with paclitaxel, and TZ = patients diagnosed with breast cancer treated with trastuzumab.

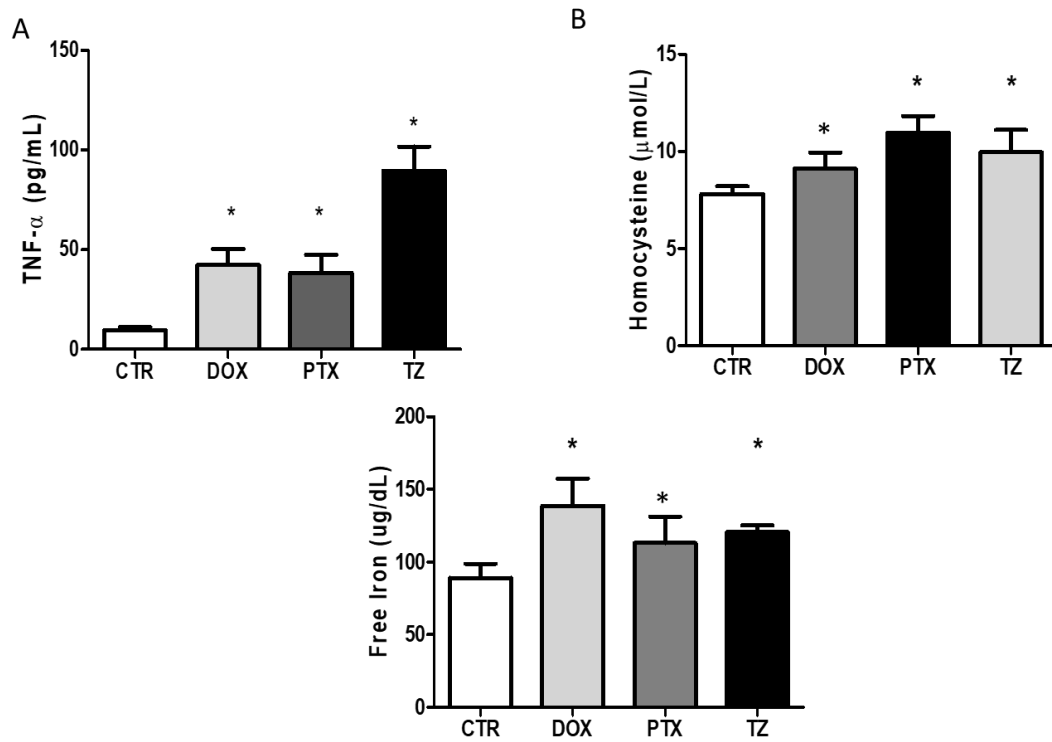


Figure 3 – Circulating proinflammatory markers. In A, plasmatic levels of tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ), in B plasmatic homocysteine, and in C circulating free iron. Data are presented as means and the errors of the means. \* indicates significant difference in comparison to healthy controls (CTR). DOX = patients diagnosed with breast cancer treated with doxorubicin; PTX = = patients diagnosed with breast cancer treated with paclitaxel, and TZ = = patients diagnosed with breast cancer treated with trastuzumab.

## 6. CONCLUSÃO

- Níveis plasmáticos mais baixos de vitamina D no momento do diagnóstico estão diretamente associados a marcadores clínicos de mau prognóstico em câncer de mama. Este trabalho mostra-se relevante, pois poucos estudos mostraram a importância de se detectar precocemente mediadores circulantes em amostras coletadas de mulheres diagnosticadas com a doença.
- Marcadores de rotina de lesão cardíaca podem ser utilizados como possíveis preditores de cardiotoxicidade induzida pelas drogas utilizadas na quimioterapia de pacientes com câncer de mama. No presente estudo mostramos que os marcadores circulantes de avaliação do dano cardíaco e os mediadores pró-inflamatórios são alterados no sangue após o tratamento agudo das pacientes, sugerindo uma possível interação entre eles e sua relação com o dano cardíaco.
- Fica cada vez mais evidente a necessidade de se diagnosticar precocemente o tumor de mama e de prever os efeitos colaterais da quimioterapia. Por isso a busca por novos marcadores que predizem os desfechos clínicos da doença são cada vez mais utilizados a fim de que se possa intervir de forma satisfatória sem prejudicar o tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer: results of a large case–control study. **Carcinogenesis**, 29:93-99. 2008.
- ABD-ELSALAM, E.A.; ISMAEIL, N.A.; ABD-ALSALAM, H.S. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women. **Tumor Biol**;36:6425–31. 2015.
- AGBORSANGAYA, C.B. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D at pregnancy and risk of breast cancer in a prospective study. **Eur J Cancer**;46(3):467-70. Feb 2010.
- AHLIN, C. et al. Ki67 and cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values? **Histopathology**; 51(4):491-498. 2007.
- AL-AZHRI, J. et al. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. **Clin Cancer Res**;23(1):97-103. 2017.
- ALBINI, A. et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. **J Natl Cancer Inst**;102(1):14-25. 2009.
- ALMEIDA, VL. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**; 28(1):118-129. 2005.
- ALMEIDA-FILHO B. de S. et al. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 2017.
- AMIN, M.B.; EDGE, S.B.; GREENE, F.L. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer staging manual. 8th ed. Chicago: **Springer**; 2017.
- ANDERSON, W.F. et al. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. **Breast Cancer Res Treat**;76:27–36. 2002.
- ANDRADE, W.P. Cancer de mama: TNM 8a. Edição: principais mudanças e implicações na prática diária. **Braz J Oncol** 14(48):1-13. 2018.
- ALLEMANI, C. et al. 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**; 385(9972):977-1010. 2015.
- ALLRED CD. Commentary: hormone receptor testing in breast cancer: a distress signal from Canada. **Oncologist**;13:1134–6. 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: **American Cancer Society, Inc.** 2018.
- ANOTHASINTAWEE, T. et al. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Asia Pac J Public Health**. 25(5):368-87. doi: 10.1177/1010539513488795. Epub May 2013.

- ARMAS, L. A. G.; HOLLIS, B. W.; HEANEY, R. P. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5387–91, Nov. 2004.
- BAGNARDI, V. et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. **Br. J. Cancer** 112:580–593. 2015.
- BARROS, A.C.S.D.; LEITE, K.R.M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Rev Bras Mastologia** 25(4):146-55. 2015.
- BEBEK, G. et al., Network biology methods integrating biological data for translational science, **Brief. Bioinform.** 13 (4) 446–459. 2012.
- BERGER, U. et al. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. **J Clin Endocrinol Metab**;67(3):607-613. 1988.
- BERTONE-JOHNSON, E.R. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**;14:1991-1997. 2005.
- BHAN, I. Vitamin D Binding Protein and Bone Health. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–5, Jan. 2014.
- BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26–34, Jan. 2009.
- BLAMEY, R.W. et al. ONCOPOOL: a European database for 16,944 cases of breast cancer. **Eur J Cancer**; 46:56–71. 2010.
- BOFF, R.A.; WISINTAINER, F. Mastologia moderna: abordagem multidisciplinar. Caxias do Sul: **Mesa Redonda**; p. 409-22. 2006.
- BONASSA, E.M.A. Enfermagem em quimioterapia. São Paulo: **Atheneu**;:277. 1992.
- BONASSA, E.M.A.; GATO, M.I.R. Esquemas antineoplásicos. In: Bonassa EMA, Gato MIR. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. 4ª ed. São Paulo: **Atheneu**; p. 531-624. 2012.
- BRAVI, F.; DECARLI, A.; RUSSO, A.G. Risk factors for breast cancer in a cohort of mammographic screening program: a nested case-control study within the FRiCaM study. **Cancer Med**. Apr 2018.
- BRIERLEY, J.D.; GOSPODAROWICZ, M.K.; WITTEKIND, C. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. New Jersey: **Wiley-Blackwell**; 2017.
- BURGESS, D. J. et al. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**. 105:9053-9058. 2008.
- CAAN, B.J. et al. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: prognostication of short- and long-term outcomes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**;23(5):725-34. 2014.
- Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 490:61e70. 2012.

- CARDINALE, D. et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. **J Am Coll Cardiol**;36(2):517-22. 2000.
- CARDINALE, D. et al. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. **Ann Oncol**;13(5):710-5. 2002.
- CARDINALE, D. et al. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. **Circulation**;109(22):2749-54. 2004.
- CARDINALE, D.; SANDRI, M.T. Role of biomarkers in chemotherapy-induced cardiotoxicity. **Prog Cardiovasc Dis**;53(2):121-9. 2010.
- CARRICK, S. et al. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. **Cochrane Database Syst Rev**. 2005.
- CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. **Cancer**; 63:181-7. 1989.
- CASTERA, L. et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. **European Journal of Human Genetics**, 22(11), 1305–1313. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.16>. 2014.
- CECILIO, A.P.; TAKAKURA, E.T.; JUMES, J.J.; DOS SANTOS, J.W.; HERRERA, A.C.; VICTORINO, V.J.; PANIS, C. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer** (Dove Med Press). 29: 43-9.2015.
- CHEANG, M.C.U. et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**;101(10):736-50. 2009.
- CHEN, W.Y. et al. Associations Between Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**;14(10):2335-9. 2005.
- CHEN, P. et al. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**;121:469-77. 2010.
- CHEN, H. et al. Vitamin D directly regulates Mdm2 gene expression in osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**; 430(1):370–4. 2013.
- CHLEBOWSKI, R.T. Vitamin D and breast cancer: interpreting current Evidence. **Breast Cancer Research**;13:217. 2011.
- CHUNG, M. et al. 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**, 155:827-838. 2011.
- CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L.J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**;9(6):606-16. 2004.
- CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editors. **Diseases of breast**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p. 461-70. 1996.

COLDITZ, G. A.; BAER, H. J.; TAMINI, R. M. **Breast Cancer**. Pp. 995–1012 in D. Schottenfeld and J. F. Fraumeni Jr, eds. *Cancer epidemiology and prevention*, 3rd ed. Oxford Univ. Press, New York, NY. 2006.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet** 358:1389–1399. 2001

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol.** 13:1141–1151. 2012.

COLE, K.D.; HE, H.J.; WANG, L. **Proteomics Clin Appl** 7. 17-29. 2013.

COLSTON, K.W.; HANSEN, C.M. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**;9(1):45-59. 2002.

CREW, K.D. et al. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. **Cancer Prev Res (Phila)**;2(6):598-604. Jun 2009.

CULLEN, M.R.; MURRAY, P.T.; FITZGIBBON, M.C. Establishment of a reference interval for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin. **Ann Clin Biochem**;49:190-3. 2012.

DAWSON-HUGHES, B. et al. Estimates of optimal vitamin D status. **Osteoporos Int**;16:713–716. 2005.

Dawson-Hughes, B. et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. **Osteoporos Int.** Jul;21(7):1151-4. 2010.

DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Hupe**, v.14, n.1 p.59-65, 2015.

DeLUCA HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **Am J Clin Nutr**;80(6 Suppl):1689S-96S. 2004.

DENT, S. et al. HER2-targeted therapy in breast cancer: a systematic review of neoadjuvant trials. **Cancer Treat Rev**;39(6):622–31. 2013.

DHINGRA K, HORTOBAGYI GN. Critical evaluation of prognostic factors. **Semin Oncol**; 23:436-45. 1996.

DIAB, S.G.; ELLEDGE, R.M.; CLARK, G.M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. **J Natl Cancer Inst**;92:550–6. 2000.

DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; COLLICCHIO-ZUANAZE, R.C. Cardiac trauma confirmed by cardiac markers in dogs: two case reports. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2007;59(1):85-89.

DOLCI, A. et al. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. **Am J Clin Pathol**;130(5):688-95. 2008.

DONEGAN WL. Staging methods, primary treatment options and results In: Donegan WL, Spratt JS, editors. **Cancer of the breast**. 2th ed. Philadelphia: Saunders; p. 221. 1979.

DOWSETT, M. et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) estado with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. **J Clin Oncol**; 26 1059–1065. 2008.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP(EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonaltherapy for early breast cancer on recurrence and15-year survival: an overview of the randomized trials.**Lancet**;365(9472):1687–717. 2005.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials; **Lancet** Feb; 379 (9814) 423-44. 2012.

EIDEM, B.W. Identification of anthracycline cardiotoxicity: left ventricular ejection fraction is not enough. **J Am Soc Echocardiogr**;21(12):1290-2. 2008.

ELLIS, I.O. et al. Pathological prognostic factors inbreast cancer. II, Histological type. Relationshipwith survival in a large study with long-term followup.**Histopathology**; 20:479–89. 1992.

ELSTON, E.W.; ELLIS, I.O. Method for grading breast cancer. **J Clin Pathol**; 46:189-90. 1993.

ENGEL, L.S.et al. Vitamin D receptor gene haplotypes and polymorphisms and risk of breast cancer: A nested case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**;21(10):1856–67. 2012.

ESPOSITO, A.; CRISCITIELLO, C.; CURIGLIANO, G. Highlights from the 14th St Gallen International Breast Cancer Conference 2015 in Vienna: Dealing with classification, prognostication, and prediction refinement to personalize the treatment of patients with early breast câncer. **ecancer**, 9:518 DOI: 10.3332/ecancer.2015.518. 2015.

EWER, M.S. et al. Cardiotoxicity in patients receiving transtuzumab (Herceptin): primary toxicity, synergistic or sequential stress, or surveillance artifact? **Semin Oncol**;26:96– 101. 1999.

EWER, M.S.; EWER, S.M. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. **Nat Rev Cardiol**;7(10):564-75. 2010.

FAUZEE, N. J. S.; DONG, Z.; WANG, Y. Taxanes: Promising Anti-Cancer Drugs. **Asian Pacific J Cancer Prev**, 12, 837-851. 2011.

FELDMAN, D. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat Rev Cancer**; 14(5):342–57. 2014.

FERGUSON, T. et al. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. **Cochrane Data base of Systematic Reviews**, Issue 4. Art. No.: CD004421. DOI: 10.1002/14651858.CD004421. 2007.

FISHER, E.R. et al. Knight 3rd WA, Fisher B, et al. Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. **Breast Cancer Res Treat**;1:37–41. 1981.

FONSECA, S.M.; ALMEIDA, E.P.M.; MASSUNAGA, V.M. Protocolo de intervenções de enfermagem frente às reações adversas aos quimioterápicos antineoplásicos. In: Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, et al. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ): Reichmann & Affonso; 2000. p. 28-54. 2000.

FONTANA, R.J. et al. Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop. **Hepatology**;52(2):730–42. 2010.

FOULKES, W.D.; SMITH, I.E.; REIS-FILHO, J.S. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 363:1938e1948. 2010.

FREAKE, H.C. et al. Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. **Cancer Res**;44(4):1677-1681. 1984.

GERDES, J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol**. Apr;138(4):867-73. 1991.

Geyer, F.C.; Pareja, F.; Weigelt, B.; Rakha, E.; Ellis, I.O.; Schnitt, S.J.; Reis-Filho, J.S. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease High- and Low-Grade Lesions. **The American Journal of Pathology**, Vol. 187, No. 10. 2017.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012 • **J Bras Patol Med Lab** v. 48 n. 6 p. 463-474. Dez 2012.

GOLDHIRSCH, A. 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**;24(9):2206-23. 2013.

GONZÁLES-NEIRA, A. Pharmacogenetics of chemotherapy efficacy in breast cancer. **Pharmacogenomics**; 13(6): 677-690. 2012.

GOZZO, T.O. et al. Ocorrência de neutropenia em mulheres com câncer de mama durante tratamento quimioterápico. **Acta Paul Enferm**; 24(6):810-4. 2011.

GRADISHAR, W.J. et al. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**;14(3):324-54. Mar 2016.

HANKINSON, S.; TAMIMI, R.; HUNTER D. Breast cancer. Pp. 403–445 in H.-O. Adami, D. Hunter and D. Trichopoulos, eds. **Cancer epidemiology**, 2nd ed. Oxford Univ. Press, New York, NY. 2008

HANLEY, D.A. et al. Vitamin D in adult health and disease: a review and guideline statement from Osteoporosis Canada. *CMAJ : Canadian Medical Association journal*;182(12):E610-8. 2010.

HARVEY, J.M. et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*;17:1474–81. 1999.

HASANZADEH, M. et al. An innovative immunosensor for ultrasensitive detection of breast cancer specific carbohydrate (CA 15-3) in unprocessed human plasma and MCF-7 breast cancer cell lysates using gold nanoparticle electrochemically assembled onto thiolated graphene quantum dots. *Int J Biol Macromol*. Apr 3;114:1008-1017. 2018.

HERSCHKOWITZ, J.I., et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 8:R76. 2007.

HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. *Clinical endocrinology*, v. 76, n. 3, p. 315–25, Mar. 2012.

HILGER, J. et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *The British journal of nutrition*;111(1):23-45. 2014.

HODA SA. Invasive ductal carcinoma: assessment of prognosis with morphologic and biologic markers. In: Rosen's breast pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; p. 413–68. 2014.

HOLICK MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*;80(6 Suppl):1678S-88S. 2004.

HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*; 357:266–81. 2007

HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*, v. 87, n. 4, p. 1080S–6S, Apr. 2008.

HOLICK MF. The D-lemma: to screen or not to screen for 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Clinical chemistry*;56(5):729-31. 2010.

HOLICK, M F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*;96(7):1911-30. 2011.

HOLICK, M. F. et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 97, n. 4, p. 1153–8, Apr. 2012.

HOLMBERG, L.; ANDERSON, H. Habits steering and data monitoring committees. HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer – is it safe?), a randomised comparison: trial stopped. *Lancet*; 363(9407);453-5. 2004.

HORTOBAGYI, G.; CONNOLLY, J.L.; D'ORSI, C.J.; EDGE, S.B.; MITTENDORF, E.A. et al. Updated breast Chapter for 8th Edition. November 10th, 2017. Chicago: American Joint Committee on Cancer; c2018.

IARC- International Agency for Research on Cancer: Vitamin D and cancer. In IARC Working Group Reports. Volume 5. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**;143-148. 2008.

IN EDGE, S.B. et al. AJCC cancer staging manual. 7th ed. **New York: Springer**; 2010.

INCA 2014. Instituto Nacional de Câncer - Quimioterapia [online]. Disponível em <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=101](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101)>. Acesso em: 21 abr 2018.

INCA 2018. Instituto Nacional do Câncer Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acesso em: 17 Abr. 2018.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 2, p. 582S–586S, Aug. 2008.

JUNTTILA, T.T. et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by PI3K inhibitor GDC-0941. **Cancer Cell**;15(5):429-40. 2009.

KALIL FILHO, R. et al. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**; 96(2 supl.1): 1-52. 2011.

KAWASE, T. et al. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. **Cancer Sci**;101(5):1234-40. May 2010.

KENNECKE, H. et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **J Clin Oncol**;28(20):3271-7. 2010.

KERLIKOWSKE, K. Epidemiology of Ductal Carcinoma In Situ. **J Natl Cancer Inst**. 2010.

Kim, M.G. et al. Kaposiform hemangioendothelioma of the breast in an adult female. **Clin Breast Cancer**;11(2):135-7. Apr 2011.

KRAINER, M. et al. Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, 336(20), 1416–1421. 1997.

KRISHNAN, A.V.; SWAMI, S.; FELDMAN, D. Vitamin D and breast cancer: inhibition of estrogen synthesis and signaling. **J Steroid Biochem Mol Biol**;121(1-2):343-8. Jul 2010.

KUHN, T. 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**; 133(7):1689–700. 2013.

LAKHANI, S.R. et al. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. 4th ed. **Lyon: IARC Press**; 2012.

LAPPE, J.M. et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. **Am J of Clin Nutr**;85(6):1586-91. 2007.

LEE, J. H. et al. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 24, p. 1949–56, 9 Dec. 2008.

LENIHAN, D.; MASSEY, M.R.; BAYSINGER, K.B. Superior detection of cardiotoxicity during chemotherapy using biomarkers. **J Cardiac Fail**;13[( Suppl.2):S151. 2007.

LEWIS, P.J.S. et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. **Hepatology**;54(5):1767–76. 2011.

LIPS, P. et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. **Journal of internal medicine**;260(3):245-54. 2006.

LIPS, P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D measurements. *Journal of bone and mineral research* : **the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 11, p. 1668–71, Nov. 2007.

LOPES, N. et al. Alterations in VitaminD signaling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. **BMC Cancer**; 10:483. 2012.

LOPEZ, A.M. et al. A model-based approach for assessing in vivo combination therapy interactions. **Proceedings of National Academy of Sciences**; 96(23): 13023- 8. 1999.

LOWE, L.C. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. **Eur J Cancer**;41:1164-1196. 2005.

MACLAUGHLIN, J.; HOLICK, M. F. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D<sub>3</sub>. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 4, p. 1536–1538, 1 Oct. 1985.

MAEDA, S.S. 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**;13(1):14. 2013.

MANDARINO, N. R. et al. Is vitamin d deficiency a new risk factor for cardiovascular disease? **The open cardiovascular medicine journal**, v. 9, p. 40–9, Jan. 2015.

MANGIN, M.; SINHA, R.; FINCHER, K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflammation research* : official **journal of the European Histamine Research Society** ... [et al.], v. 63, n. 10, p. 803–19, Oct. 2014.

MANTELL, D.J. et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Circ Res**; 87: 214–20. 2000.

- MARQUEZ, A. et al. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by chromogenic in situ: Hybridization [CISH (TM)] and Immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. **Diagn Mol Pathol**;13(1):1-8. 2004.
- MARTIN, A.M.; WEBER, B.L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. **J Natl Cancer Inst**; 92: 1126–35. 2000.
- MARUYAMA, R. et al. Comparative genome analysis identifies the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. **Cancer Res**; 66(9):4574–83. 2006.
- MASALA, G. et al. Mammographic breast density and breast cancer risk in a Mediterranean population: a nested case-control study in the EPIC Florence cohort. **Breast Cancer Res. Treat.** 164:467–473. 2017.
- MASON RS. Vitamin D: a hormone for all seasons. **Climacteric**;14(2):197-203. 2011.
- MATSUOKA, L. Y. et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 64, p. 1165–1168, 1987.
- McCULLOUGH, M.L. et al. 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**, 11:R64. 2009.
- McPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ** 321:624–628. 2000.
- MILLER, K.; BEN-AHARON, I.; HAINES, L. Seasons of survival: redefining the paradigm for cancer survivorship for 2012. **J Oncol Navig Surviv**;2(5):12–5. 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Portaria Conjunta Nº 04, de 23 de Janeiro de 2018. Aprova As Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama. <<http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>>. Acesso em: 21 abr 2018.
- MISHRA, D.K. et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer among African-American and Hispanic Women. **PLoS ONE**;8(3): e57967. 2013.
- MITTENDORF, E.A. et al. Evaluation of the stageI B designation of the American Joint Committee on Cancer staging system in breast cancer. **J Clin Oncol**.;32:1–10. 2014.
- MOHR, S.B. et al. Relationship between Low Ultraviolet B Irradiance and Higher Breast Cancer Risk in 107 Countries. **The Breast Journal**;14(3):255-60. 2008.
- MOJA, L. et al. Trastuzumab containing regimens for early stage breast cancer. **The Cochrane Library**, Issue 4. 2012.
- MONSUEZ, J.J. et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **Int J Cardiol**;144(1):3-15. 2010.

MØRCH, L.S. et al. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **N Engl J Med** 377:2228-39. 2017.

MORROW, P. K.H.; ZAMBRANA, F.; ESTEVA, F.J. Advances in systemic therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 4, jul. 2009.

MOSEKILDE, L. Vitamin D and the elderly. **Clinical Endocrinology**, v. 62, n. 3, p. 265–281, Mar. 2005.

MOZOS, I.; MARGINEAN, O. Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. v. 2015, 2015.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH NIH CONSENSUS CONFERENCE. TREATMENT OF EARLY-STAGE BREAST CANCER. **JAMA**;265:391–5. 1991.

Nik-Zainal, S.; Davies, H.; Staaf, J.; Ramakrishna, M.; Glodzik, D.; Zou, X. et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer wholegenome sequences. **Nature** 534:47e54. 2016.

NORMAN AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr**;88(Suppl):491S-9S. 2008.

NUNES, R.D. Estudo de sobrevivência 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.

OLSON, H. et al. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniariaglabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.378–386, 2008.

OVERDEVEST, J.B.; THEODORESCU, D.; LEE, J.K. Utilizing the molecular gateway: the path to personalized cancer management, **Clin. Chem.** 55 (4) 684–697. 2009.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**;245(3):194–205. 2008.

PAIK, S. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**; 351 2817–2826. 2004.

PALACIOS, C.; GONZALEZ, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 144 Pt A, p. 138–45, Oct. 2014.

PALMER, M.K.; LYTHGOE, J.P.; SMITH, A. Prognostic factors in breast cancer. **Br J Surg**; 69:697-8 24. 1982.

PALMIERI, C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. **J Clin Pathol**;59(12):1334-6. Dec 2006.

PANIS, C.; PIZZATTI, L.; ABDELHAY, E. How can Proteomics Reach Cancer Biomarkers? **Current Proteomics**. Volume 10 , Issue 2. 2013.

PANIS, C. et al. Clinical proteomics in cancer: Where we are. **Cancer Lett**. Nov 28;382(2):231-239. 2016.

PARKER, J.S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**;27(8):1160-7. 2009.

PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. 2005.

PEGRAM, M.D. et al. Rational Combinations of Trastuzumab With Chemotherapeutic Drugs Used in Treatment of Breast Cancer. **Journal of The National Cancer Institute**;96(10):739-49. 2004.

PEREIRA, G. et al. Drug-induced Cardiac Mitochondrial Toxicity and Protection: From Doxorubicin to Carvedilol, *Current Pharmaceutical Design*, 2011, 17, 2113-2129. 2011.

PETRELLI, F. et al. Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. **Anticancer Drugs**;22(2):128. 2011.

PICCART-GEBHART M.J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **N Engl J Med** 2005;353:1659-72.

PIKE, J. W. et al. Molecular actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 22 Suppl 2, p. V16–9, Dec. 2007.

PROSSER, D. E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends in biochemical sciences**, v. 29, n. 12, p. 664–73, Dec. 2004.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**;406(6797):747-52. 2000.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**. Nov;24 Suppl 2:S26-35. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub Aug 2015.

PRAT, A. et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. **J Clin Oncol**;31(2):203-9. 2013.

PRAT, A.; PEROU, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 5:5-23. 2011.

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J. Physiol Renal Physiol*, Arkansas, v. 286, n. 2, p. 378- 384, 2003.

RAJ, S. et al. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment, Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine 16:315. 2014.

RAKHA, E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*;120(2):293-308. 2010.

ROBINSON, P.N. Chemotherapy and Anaesthesia, em: Filshie J, Robbie DS - Anaesthesia and Malignant Disease, 1st Ed, London, **Edward-Arnold**;19-22. 1996.

ROCHÉ, H.H.; VAHDAT, L.T. Treatment of metastatic breast cancer: second line and beyond. *Annals of Oncology*, v. 22, n. 5, p. 1000-10, may. 2011.

RODGERS, G.M. et al. Cancer and Chemotherapy induced Anemia. Version 2.2012 NCCN. **Clinical practice guidelines in oncology**. Available at: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/anemia.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/anemia.pdf) on September 28, 2011.

ROMOND, E.H. et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*;353:1673-84. 2005.

RONCO, C. et al. Oliguria, creatinine and other biomarkers of acute kidney injury. *Contrib Nephrol*;164:118-27. PMID: 20427998. 2010.

ROSEN, C.J. Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *The New England journal of medicine*;364(3):248-54. 2011.

ROSEN, C.J. et al. IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *J Clin Endocrinol Metab*;97(4):1146-52. 2012.

ROSS, A. C. et al. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. 2011.

ROSS, C.A. 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*, 96:53-58. 2011.

ROSSI, M. et al. Vitamin D intake and breast cancer risk: a casecontrol study in Italy. *Ann Oncol*;20(2):374-8. 2009.

RUSSO, L.A. et al. [Concentration of 25-hydroxyvitamin D in postmenopausal women with low bone mineral density]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*;53(9):1079-87. 2009.

SALVATICI, M. et al. Atrial fibrillation after thoracic surgery for lung cancer: use of a single cut-off value of N-terminal pro-B type natriuretic peptide to identify patients at risk. *Biomarkers*;15(3):259-65. 2009.

SANDHU, R. et al. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Laboratory Medicine*, Volume 41, Issue 6, 1, Pages 364–372. 2010.

SANTOS, N. A. G. Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiluréia. 2006, p. 205. TESE (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. São Paulo, 2006.

SCARMO, S. et al. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study. **Breast Cancer Res**; 15(1):R15. 2013.

SCHEUER, W. et al. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. **Cancer Research**;69(24):9330- 6. 2009.

SCHMITT, F.C. et al. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathol Res Pract**;194(12):815-9. 1998.

SCHONBORN, J.L.; GWINNUTT, C. The role of the liver in drug metabolism [tutorial]. **Anaesthesia**. 2010.

SEIDMAN, A. et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. **J Clin Oncol**;20(5):1215-21. 2002.

SHANTAKUMAR, S. et al. Age and menopausal effects of hormonal birth control and hormone replacement therapy in relation to breast cancer risk. **Am J Epidemiol**;165(10):1187-98. Epub Mar 2007.

SINGAL, P.K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **N Engl J Med**;339(13):900-5. 1998.

SENGUPTA, P.P. et al. Trastuzumab-induced cardiotoxicity: heart failure at the crossroads. **Mayo Clin Proc**;83(2):197-203. 2008.

SLOCUM, J.L.; HEUNG, M.; PENNATHUR, S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine? **Transl Res**;159:277-89. 2012.

SMITH, R.A. et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. **CA Cancer J Clin**;53(3):141-69. 2003.

SMITH, I. et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant 83 chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. **Lancet**.;369: 29–36. 2007.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 98 10869–10874. 2001.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**;100(18):10393-8. 2003.

SPIVAK, J.L., The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. **Nat Rev Cancer**. 5(7): p. 543-55. 2005.

STEWART, S. et al. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. **Eur J Heart Fail**;3(3):315-22. 2001.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report**: 2014. Lyon: IARC, 2014.

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**;100(14):8418-23. 2003.

SWAMI, S.; KRISHNAN, A.V.; FELDMAN, D. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. **Clin Cancer Res**;6(8):3371-9. Aug 2000.

TAKEMURA, G. et al. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy From the Cardiotoxic Mechanisms to Management, *Progress in Cardiovascular Diseases*, Vol. 49, No. 5: 330-352. 2007.

TANG, B.M. et al. 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**;370(9588):657-66. 2007.

TAVASSOLI, F.A. DEVILEE, P. World Health Organization classification of tumours. In *Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. **Lyon: IARC Press**;19-23. 2003.

TESCH, G.H. Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective. **Nephrology** (Carlton);15:609-16. 2010.

THANASITTHICHAI, S.; CHAIWERAWATTANA, A.; PRASITTHIPAYONG, A. Association of Vitamin D Level with Clinicopathological Features in Breast Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**;16 (12), 4881-4883. 2015.

TORIOLO, A.T.; COLDITZ, G.A. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. **Breast Cancer Res Treat**. Apr;138(3):665-73. doi: 10.1007/s10549-013-2500-7. Epub 2013 Apr 2. 2013.

TORRE, L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, 2015. 65: 87-108.2012.

TRANG, H. M. et al. Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. **The American journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 4, p. 854–8, Oct. 1998.

TRETLI, S. et al. 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**;23:363–70. 2012.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**;338(2):143-56. 2004.

URRUTICOECHEA A, SMITH IE, DOWSETT M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **J Clin Oncol**; 23(28):7212-7220. 2005.

VALAGUSSA, P.; BONADONNA, G.; VERONESI, U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. **Cancer**;41:1170-8. 1978.

VAN DEN EYNDEN, G.G. et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study. **Br J Cancer**;94:1643–9. 2006.

VAN DIERENDONCK, J.H. et al. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. **Cancer Res**; 49(11):2999-3006. 1989.

VIALE, G. et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **J Clin Oncol**; 25 3846–3852. 2007.

VODUC, K.D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**;28(10):1684-91. 2010.

WANG, K. et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;106(11):4402–7. 2009.

WANG, Y.; WANG, S.; GAO, Y. S.; CHEN, Z.; ZHOU, H. M.; YAN, Y. B. Dissimilarity in the Folding of Human Cytosolic Creatine Kinase Isoenzymes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24681, 9 set. 2011.

WANG, J. et al. 20-hydroxyvitamin D inhibits proliferation of cancer cells with high efficacy while being non-toxic. **Anticancer Res**;32(3):739-46. 2012.

WELLS, Q.S.; LENIHAN, D.J. Reversibility of left ventricular dysfunction resulting from chemotherapy: can this be expected? **Prog Cardiovasc Dis**;53(2):140-8. 2010.

WELSH J. et al. Vitamin D-3 Receptor as a Target for Breast Cancer Prevention. **J Nutri**;133(7 Suppl):2425S-2433S. 2003.

WILSON, J., et al., A systematic review and economic evaluation of epoetin alpha, epoetin beta and darbepoetin alpha in anaemia associated with cancer, especially that attributable to cancer treatment. **Health Technol Assess**. 11(13): p. 1- 202, iii-iv. 2007.

WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**;25:1–28. 2007.

WOLTERS, R. et al. A comparison of international breast cancer guidelines – Do the national guidelines differ in treatment recommendations? **European Journal Of Cancer** 48:1–11. 2012.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. **World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research**, Washington, DC. 2007.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**; 288(3):321-33. 2002.

WU, A.H. Cardiotoxic drugs: clinical monitoring and decision making. **Heart**;94(11):1503-9. 2008.

WULFKUHLE, J. et al., Technology insight: pharmacoproteomics for cancer – promises of patient-tailored medicine using protein microarrays. **Nat. Clin. Pract. Oncol.** 3, 256–268. 2006.

YARED, J.A.; TKACZUK, K. H. Atualização sobre desenvolvimento taxanos: novos análogos e novas formulações. **Drogas em desenvolvimento. Res.** 6:371-84 . doi: 10.2147/DDDT.S28997. 2012.

YEH, E.T. et al. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. **Circulation**;109(25):3122-31. 2004.

YEH. E.T.; BICKFORD, C.L. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. **J Am Coll Cardiol**;53(24):2231-47. 2009.

ZAGAR, T.M.; CARDINALE, D.M.; MARKS, L.B. Breast cancer therapy associated cardiovascular disease. **Nat Rev Clin Oncol.** (published online). 2015.

ZAMOISKI, R.D. et al. Prospective study of ultraviolet radiation exposure and risk of breast cancer in the United States. **Environ Res.**; 151:419-27. 2016.

ZINSER, G. M.; McELENEY, K.; WELSH, J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. **Mol Cell Endocrinol**;200(1-2):67-80. 2003.

ZINSER, G.M., WELSH, J.E. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed post-lactational involution in vitamin D3 receptor null mice. **Mol Endocrinol**;18:2208–2223. 2004.

**ANEXO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
OESTE DO PARANÁ/



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

**Pesquisador:** CAROLINA PANIS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 35524814.4.0000.0107

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 810.501

**Data da Relatoria:** 25/09/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Relevante para a área de oncologia.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos apresentados.

**Endereço:** UNIVERSITARIA

**Bairro:** UNIVERSITARIO

**UF:** PR

**Telefone:** (45)3220-3272

**Município:** CASCAVEL

**CEP:** 85.819-110

**E-mail:** cep.prppg@unioeste.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
OESTE DO PARANÁ/



Continuação do Parecer: 810.501

**Recomendações:**

Não há recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado. O projeto não necessita adequações.

CASCADEL, 29 de Setembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**João Fernando Christofolletti**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** UNIVERSITARIA

**Bairro:** UNIVERSITARIO

**UF:** PR

**Telefone:** (45)3220-3272

**CEP:** 85.819-110

**Município:** CASCAVEL

**E-mail:** cep.prppg@unioeste.br