
Paula Sónia da Fonseca Serrano Braga

**Correlação entre os Níveis Séricos da
Vitamina D e os Diferentes Subtipos de
Tumores Mamários**

Coimbra
2010

Paula Sónia da Fonseca Serrano Braga

**Correlação entre os Níveis Séricos da
Vitamina D e os Diferentes Subtipos de
Tumores Mamários**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra para obtenção do
grau de Mestre em Ginecologia Oncológica

Orientador: Prof. Doutor Carlos Oliveira
Co-orientador: Prof. Doutor Fernando Schmitt

Coimbra
2010

“It is to the nucleus of the cell, however, that the investigator of the cancer problem eventually turns. Here one enters an area that is mysterious, perhaps even a little mystical, and quickly meets the problem of the two nucleic acids”

Taylor, 1959

Dedico este trabalho à minha família
(ao meu pai, pelo modelo,
à minha mãe, pelo estímulo,
à minha irmã, pela confiança,
ao meu marido e filho, pelo apoio e
compreensão)
e às minhas doentes

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Doutor Carlos Oliveira, pela oportunidade e pelo incentivo, o meu muito obrigada.

Ao Prof. Doutor Fernando Schmitt, do IPATIMUP, meu co-orientador, agradeço todos os esclarecimentos de dúvidas, a disponibilidade e a pronta resolução de problemas pontuais que foram surgindo.

Aos colegas e amigos da Unidade de Senologia e da Consulta de Grupo de Mama do Hospital de São Marcos, Braga, Dr. Arlindo Ferreira, Dra. Maria José Rocha, Dr. Rui Nabiço, Dra. Catarina Portela, pela disponibilidade imediata em colaborar na selecção das doentes.

Aos colegas do Serviço de Patologia Clínica, Dr. Mota Garcia e Dra. Alexandra Estrada pela colaboração imprescindível na execução deste trabalho.

À colega e amiga, Dra. Cristina Nogueira da Silva, e ao Dr. Miguel Maia pela colaboração na análise estatística dos dados.

Ao Doutor José Luís Costa do IPATIMUP por algumas sugestões na elaboração do trabalho.

Ao técnico do laboratório do Serviço de Patologia Clínica Sr. Lima pela colaboração na execução da técnica de doseamento da vitamina D.

Às enfermeiras do Serviço de Ginecologia, pela colheita de todas as amostras.

Uma palavra especial de apreço ao Director do Serviço de Ginecologia, Dr. Jardim da Pena, por facilitar a execução deste trabalho e pela confiança manifestada em como chegaria ao fim, apesar das dificuldades que surgiram, a nível pessoal.

Ao Laboratório Roche pelo fornecimento do kit de doseamento da 25(OH)D.

Ao ilustrador Neno, pela execução de algumas das figuras incluídas.

ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas	pág i
Lista de Abreviaturas.....	pág iii
Resumo	pág iv
Abstract.....	pág v
Capítulo 1. Introdução	pág 1
Capítulo 2. Objectivos	pág 3
Capítulo 3. Revisão da Literatura	pág 4
Capítulo 4. Metodologia.....	pág 24
Capítulo 5. Resultados.....	pág 26
Capítulo 6. Discussão	pág 36
Capítulo 7. Conclusões e Perspectivas Futuras	pág 38
Capítulo 8. Referências Bibliográficas	pág 39

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	pág 4
Família com raquitismo. Paris, 1900 (adaptada de Wikipedia).	
Figura 2.	pág 6
Molécula de colecalciferol (adaptada de Wikipedia).	
Figura 3.	pág 12
Metabolismo da vitamina D. Autor: Neno.	
Figura 4.	pág 15
Receptor nuclear da vitamina D (adaptada de Wikipedia).	
Figura 5.	pág 17
Ações da vitamina D. Autor: Neno.	
Figura 6.	pág 26
Classificação molecular dos tumores mamários.	
Figura 7.	pág 27
Estado da menopausa nos subtipos moleculares de cancro da mama	
Figura 8.	pág 27
Uso de contraceptivos orais nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 9.	pág 28
Uso de terapêutica hormonal de substituição nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 10.	pág 28
Antecedentes de amamentação nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 11.	pág 29
Distribuição do grau tumoral nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 12.	pág 30
Distribuição do nível de expressão de Ki67 nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 13.	pág 31
Distribuição do tamanho do tumor nos subtipos moleculares de cancro da mama. Sem informação: doentes submetidas a quimioterapia primária.	
Figura 14.	pág 31
Distribuição do estado ganglionar nos subtipos moleculares de cancro da mama. Sem informação: doentes submetidas a quimioterapia primária.	

Figura 15.	pág 32
Níveis séricos de 25(OH)D nos subtipos moleculares de cancro da mama (média \pm erro padrão).	
Figura 16.	pág 33
Níveis séricos de deficiência (< 21) e de insuficiência relativa (\leq 29) de 25(OH)D (ng/ml) nos subtipos moleculares de cancro da mama.	
Figura 17.	pág 33
Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o grau histológico (média \pm erro padrão).	
Figura 18.	pág 34
Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o nível de expressão de Ki67 (média \pm erro padrão).	
Figura 19.	pág 34
Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o tamanho do tumor (cm) (média \pm erro padrão).	
Figura 20.	pág 35
Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e a invasão ganglionar (média \pm erro padrão).	
Tabela 1.	pág 26
Características gerais dos grupos em estudo (mediana, valor máximo e mínimo, excepto, paridade: média \pm DP, valor máximo e mínimo).	

LISTA DE ABREVIATURAS

° C – graus célsius

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – ARN mensageiro

DP – desvio padrão

FISH – fluorescence in situ hybridization

IHQ – imunohistoquímica

Kg – kilograma

L – litro

m² – metro quadrado

mg – miligrama

ml – mililitro

ng – nanograma

nm – nanómetro

nmol – nanomole

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

UI – unidades internacionais

RESUMO

Introdução: A investigação de padrões de expressão genética deu origem a uma classificação molecular dos tumores mamários em vários subtipos com prognóstico distinto: tumores que expressam receptores de estrogénios e/ou progesterona (o subtipo luminal) e tumores que não expressam estes receptores (associados a pior prognóstico); o subtipo com sobreexpressão de HER2 (HER2 positivo) e o subtipo triplo-negativo (TN), que, como o nome indica, não tem expressão dos três marcadores. A deficiência de vitamina D tem sido implicada no aparecimento de muitos tipos de cancro; actua localmente em numerosos tecidos e órgãos, com efeitos de anti-proliferação, pró-diferenciação e pró-apoptose. Verificou-se que, no cancro da mama, os níveis de vitamina D são geralmente mais baixos na doença avançada e associam-se a menor sobrevivência. Neste trabalho, pretendeu-se estudar o status de vitamina D nas doentes com cancro da mama para verificar se existe alguma relação entre a deficiência de vitamina D e os subtipos moleculares de cancro da mama. **Material e Métodos:** A população consistiu em 87 doentes admitidas na Unidade de Senologia do Hospital de São Marcos com o diagnóstico de cancro da mama, durante o período de um ano, num total de 88 cancros. Foi realizada a determinação quantitativa da 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] no soro, pelo método de imunoensaio de electroquimioluminescência. A avaliação do subtipo de tumor mamário foi efectuada pela análise da expressão de receptores hormonais e de HER2, realizada por IHQ ou FISH. Foram também avaliados o grau histológico, a expressão de Ki67, o tamanho do tumor e o estado dos gânglios. As associações estatísticas foram avaliadas usando os testes One-Way ANOVA, Fisher e Mann-Whitney, realizados utilizando o programa SPSS, versão 17. **Resultados:** Do total de tumores, 63 (72%) foram classificados como tumores do subtipo luminal, 18 (20%) como tumores HER2 e 7 (8%) como tumores do subtipo TN. Em relação às características patológicas do tumor, foi encontrada associação entre o grau histológico 3 e os subtipos TN e HER2 e entre expressão alta de Ki67 e os subtipos TN e HER2. Não se encontrou associação entre o tamanho do tumor ou o estado ganglionar em nenhum dos subtipos tumorais. Verificou-se que 23,8% do grupo luminal, 28,6% do grupo TN e 5,6% do grupo HER2 apresentaram níveis séricos deficientes de 25(OH)D e que 80,9%, 71,4% e 50% dos tumores luminais, TN e HER2, respectivamente, apresentaram níveis de insuficiência relativa de 25(OH)D. Em relação à diferença entre os grupos nos níveis séricos de 25(OH)D, foi encontrada diferença estatisticamente significativa no subtipo HER2 em relação ao luminal; o subtipo HER2 apresentou níveis séricos mais altos. E não se verificou diferença entre os grupos luminal e TN. **Conclusões:** Verificou-se uma elevada prevalência de níveis insuficientes ou deficientes de vitamina D, particularmente nos subtipos luminal e TN. Os tumores do subtipo HER2 apresentaram níveis séricos de 25(OH)D mais altos em relação aos outros subtipos. Só 5,6% dos tumores do subtipo HER2 apresentaram níveis deficientes de vitamina D. Estes dados sugerem que poderá existir neste subtipo de cancro da mama algum mecanismo de resistência às acções locais da vitamina D nas células tumorais; alterações na sua bioactivação local ou alterações a nível da expressão das proteínas-chave envolvidas nas suas acções anti-neoplásicas, apresentando o tumor HER2 um fenótipo molecular de resistência à vitamina D.

Palavras-chave: 25-hidroxivitamina D, luminal, triplo-negativo, HER2, cancro da mama.

ABSTRACT

Introduction: Gene expression analysis has identified several breast cancer subtypes with distinct clinical outcomes and marked differences in prognosis: tumors that express estrogen (ER) and/or progesterone receptors (PR) (luminal subtype) and tumors that do not express these receptors, the HER2 overexpressing subtype (HER2 positive) and the triple-negative subtype (TN). The latter two are associated to a worse prognosis. Vitamin D deficiency has been implicated in the development of many types of cancer. There is evidence that vitamin D acts in numerous tissues and organs, mediating anti-proliferative, pro-differentiating and pro-apoptosis effects. In breast cancer, vitamin D serum levels are lower in late stages of the disease and are associated to poorer survival. The goal of the present analysis was to estimate the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in breast cancer patients and to examine correlations with the breast cancer subtypes.

Methodology: Eighty seven patients diagnosed with breast cancer at Senology Unit of S. Marcos Hospital within a year, performing a total number of 88 cancers, were assessed for serum levels of 25-hydroxyvitamin D by electrochemiluminescence immunoassay. Tumors were classified based on the expression of ER, PR and HER2, determined by immunohistochemistry or FISH, and were also assessed for histological grade, Ki67 expression, tumor size and lymph node status. Statistical analyses were made using One Way ANOVA test, Fisher exact test and Mann-Whitney test on SPSS program, version 17.

Results: Of the 88 tumors, 63 (72%) were classified as luminal subtype, 18 (20%) as HER2 positive subtype and 7 (8%) as TN subtype. We observed that, compared with luminal tumors, the other subtypes were associated with unfavorable pathological features, such as histological grade 3 and high expression of Ki67. No association was found between tumor size and lymph node status and tumor subtypes. We found that 23.8% of the luminal tumors, 28.6% of the TN tumors and 5.6% of the HER2 positive tumors were vitamin D deficient and that 80.9%, 71.4% and 50% of the luminal, TN and HER2 positive tumors, respectively, had vitamin D levels in the insufficiency range. The serum levels of 25(OH)D from HER2 positive subtype were found to be statistically different (higher) than those from the luminal type. There were no significant differences in 25(OH)D serum levels between luminal and TN subtypes.

Conclusions: There was a high prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency in the study population, especially in the luminal and TN subtypes of breast cancer. HER2 positive subtype presented with the highest 25(OH)D serum levels when compared with the other subtypes. Only 5.6% of the HER2 positive tumors were vitamin D deficient. Our data suggest that there might be some kind of resistance mechanism to vitamin D local actions in cancer cells in this breast cancer subtype; alterations in vitamin D local bioactivation or in the expression of key-proteins involved in vitamin D anti-neoplastic actions, presenting HER2 positive subtype a molecular phenotype of vitamin D resistance.

Key words: 25-hydroxyvitamin D, 1,25 dihydroxyvitamin D, luminal, triple-negative, HER2, breast cancer

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A deficiência de vitamina D é muito comum, especialmente nos países de latitudes mais altas e nos idosos [1-5]. Também a deficiência de estrogénios se associa a status corporal baixo de vitamina D, o que, associado à idade, coloca a mulher pós-menopausica, população-alvo do cancro da mama, em maior risco de apresentar níveis deficientes de vitamina D [6,7]. Numerosos estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre baixos níveis de vitamina D, ou baixo nível de exposição solar ou ingestão dietética de vitamina D, e o risco de cancro da mama, e estudos animais confirmaram essa relação [8-18].

A existência, a nível do tecido mamário normal e transformado, do receptor da vitamina D [19-21] e da maquinaria enzimática necessária para a bioactivação da vitamina D [22-24], sugerindo uma actuação autócrina/parácrina da vitamina, com as suas acções comprovadas de anti-proliferação, pró-diferenciação e pró-apoptose, e a existência de expressão alterada de alguns destes elementos do metabolismo da vitamina D no tecido neoplásico, reforça o papel desta vitamina na patogénese do cancro da mama [24-27]. A vitamina D induz um programa de expressão génica que contribui para a manutenção do fenótipo diferenciado, quiescente [25]. De acordo com estes conceitos, será de esperar níveis mais baixos de vitamina D nos cancros da mama que apresentem características de pior prognóstico. Parece também que o sistema da vitamina D pode ter relevância tanto na prevenção como no tratamento do cancro. Estudos usando sistemas-modelo de cancros mostraram que a administração de vitamina D ou de análogos de vitamina D apresentava efeitos anti-tumorais significativos [28-33]; o mesmo se verificou em estudos com animais [34].

No que diz respeito à relação entre o status de vitamina D e o prognóstico do cancro da mama, alguns estudos demonstraram que os níveis da vitamina são mais baixos na doença avançada e em tumores com alto grau histológico e que baixos níveis se associam a maior taxa de metástases à distância e pior sobrevivência [10-12,17,18,35].

O cancro da mama consiste numa variedade de subtipos biológicos distintos, assim classificados de acordo com padrões de expressão genética, tendo sido os tumores agrupados em clusters, dependendo dos genes expressos; cada cluster constituindo uma subclasse de tumor com características próprias e comportamento biológico diferente [36-38]. Dentro desta classificação, o subtipo basal-like e o subtipo com sobreexpressão de HER2 (human epidermal growth factor receptor-2) são os que se associam a comportamento biológico mais agressivo [39-42].

O propósito deste estudo foi verificar se existe alguma associação entre os níveis séricos de vitamina D e os diferentes subtipos moleculares de cancro da mama. Até à data, ainda não se tinha estudado se os níveis séricos de vitamina D estariam relacionados aos diferentes subtipos biológicos de cancro da mama, ou seja, se, por alguma razão, a deficiência de vitamina D está associada a um ou outro subtipo. Dentro dos diversos subtipos, verificou-se também se existe alguma correlação entre os níveis de vitamina D e as características patológicas do cancro da mama, como o índice de proliferação, através da expressão de Ki67, o grau histológico, o tamanho do tumor e o estado dos gânglios linfáticos axilares.

Para estabelecer essa possível correlação, 87 doentes com cancro da mama, uma delas com cancro bilateral síncrono, perfazendo um total de 88 cancros, foram analisadas de uma forma prospectiva, em relação ao seu status de vitamina D na ocasião do diagnóstico. Foi efectuada colheita do sangue periférico e determinação quantitativa da 25-hidroxivitamina D, que é um marcador biológico fidedigno do status corporal da vitamina D, e os resultados obtidos foram analisados em relação aos subtipos de cancro da mama, nomeadamente, tumores com receptores de estrogénios e/ou progesterona positivos, tumores com expressão HER2 e tumores triplo-negativos.

CAPÍTULO 2. OBJECTIVOS

- Determinar o status de vitamina D da doente com o diagnóstico de cancro da mama e classificar o cancro da mama nos vários subtipos de tumores mamários.
 - Verificar se existe associação entre os subtipos de cancro da mama e as características patológicas de mau prognóstico do tumor.
 - Verificar se existem diferenças nos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D entre os subtipos de cancro da mama.
 - Verificar se existem diferenças nos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D em relação às características patológicas do tumor.
-

CAPÍTULO 3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Vitamina D – Perspectiva Histórica

Vitamina deriva de “vital amine”, termo usado pelo bioquímico Casimir Funk para designar certos constituintes alimentares essenciais à saúde, que ele acreditava serem aminas. Inicialmente, a vitamina D foi erradamente identificada pelos cientistas como uma vitamina, isto é, uma substância essencial que o corpo não produz e que só pode ser obtida através da dieta. Mas a vitamina D pode ser produzida no organismo, quando a pele é exposta à luz solar.

Com o advento da revolução industrial, o raquitismo tornou-se muito frequente por toda a Europa, à medida que mais famílias deixavam a vida ao ar livre das actividades agrícolas para se instalarem em cidades industriais e trabalharem em fábricas (Fig. 1). Através do século XIX, apareceram apenas relatórios esporádicos de cura do raquitismo, como o do médico polaco que observou que as crianças da cidade de Varsóvia sofriam de raquitismo ao contrário das que viviam nas aldeias, tendo concluído que a exposição solar curava o raquitismo. Posteriormente, um investigador francês relatou curas de raquitismo com o uso de óleo de fígado de bacalhau. Nenhum dos tratamentos foi devidamente reconhecido.

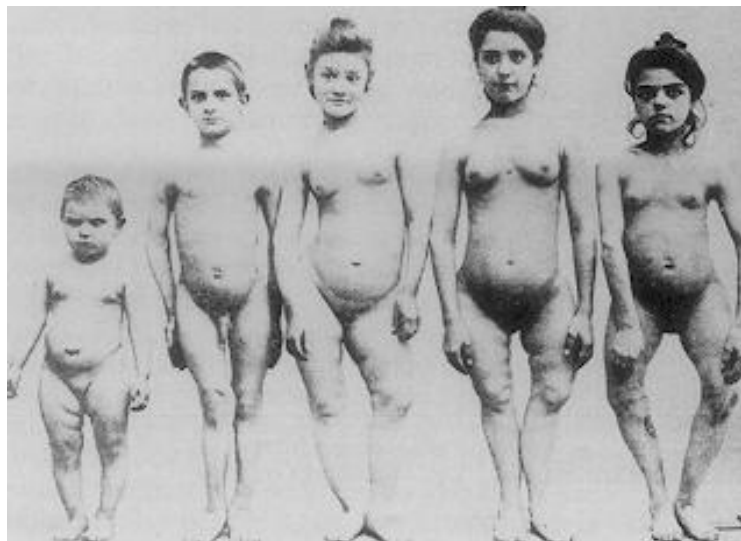


Figura 1. Família com raquitismo. Paris, 1900.

No final dos anos de 1880, Christian Eijkman e, no início dos anos 1900, o biólogo inglês Sir Frederick Gowland Hopkins desenvolveram o conceito de “substâncias diferentes das proteínas e sais” que são essenciais para a saúde e crescimento, tendo, por isso, partilhado em 1929 o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina.

Em 1882, o cientista britânico T. A. Palm descobriu uma relação entre a distribuição geográfica do raquitismo e a quantidade de exposição solar na região. Em 1919, o investigador alemão K. Huldschinsky levou a cabo uma experiência inovadora e curou

crianças com raquitismo usando luz ultravioleta produzida artificialmente. Dois anos depois, Alfred F. Hess e L. F. Unger demonstraram que a simples exposição solar curava o raquitismo. Entretanto, o médico britânico Sir Edward Mellanby, em 1918, curou cães com raquitismo alimentando-os com óleo de fígado de bacalhau, acreditando que isso se devia à vitamina A, recentemente identificada. Elmer McCollum, o investigador de Wisconsin que isolou a vitamina A, descobriu que certos alimentos podem conter mais do que uma substância essencial. Aqueceu o óleo de fígado de bacalhau para destruir a vitamina A e o óleo assim tratado já não curou a cegueira noturna mas, surpreendentemente, manteve-se eficaz no tratamento do raquitismo. Em 1922, designou a nova substância de vitamina D.

No início dos anos 1920, duas equipas de investigadores – H. Steenbock e A. Black, e Alfred Hess e Mildred Weinstock – realizaram uma série de experiências sobre o efeito da luz ultravioleta nos alimentos administrados a ratos. Nos alimentos irradiados, era produzida uma substância que parecia actuar no raquitismo da mesma forma que a vitamina D presente no óleo de fígado de bacalhau. Em 1924, Steenbock patenteou o processo de irradiação dos alimentos usando luz ultravioleta.

Posteriormente, várias equipas de investigadores confirmaram que a substância está presente em gorduras animais e vegetais e que está localizada na fracção das gorduras conhecida por conter moléculas esterol. Os investigadores descobriram que o colesterol purificado (esterol animal) e o fitoesterol (esterol vegetal) adquiriam propriedades anti-raquíticas pela irradiação ultravioleta.

Em 1928, Adolf Windaus, um químico orgânico alemão, isolou três formas de vitamina D: duas derivadas dos esteróis de plantas irradiadas, que chamou D1 e D2, e uma derivada da pele irradiada, que chamou D3. A equipa inglesa de F.A. Askew, em 1931, definiu a origem química de D2, a forma da vitamina D encontrada na comida irradiada, agora chamada ergocalciferol, que era derivada da molécula precursora ergosterol. Cinco anos depois, Windaus sintetizou a molécula 7-diidrocolesterol e converteu-a por radiação em vitamina D3, agora conhecida como colecalciferol. Foi então possível sintetizar a vitamina D em grandes quantidades. Pela sua investigação na constituição dos esteróis e a sua ligação às vitaminas, Windaus ganhou o Prémio Nobel da Química em 1928.

Em 1968, Hector F. DeLuca isolou um metabolito activo da vitamina D, identificando-o como 25-hidroxivitamina D, e que é produzido no fígado.

Nos anos 70, os investigadores descobriram a relação da vitamina D com o sistema endócrino corporal e a regulação do cálcio. Foi identificada a estrutura molecular da forma activa final da vitamina D, a 1,25-dihidroxivitamina D3, que é pouco depois reclassificada como uma hormona que controla o metabolismo do cálcio. Esta reclassificação surgiu devido à evidência de que é produzida no rim e que a sua secreção é seguida da sua captação pelos núcleos celulares do intestino, onde regula o metabolismo do cálcio.

Em 1975, Mark R. Haussler confirmou a descoberta de um receptor proteico que liga o metabolito activo da vitamina D ao núcleo das células do intestino. Nos anos 70, vários grupos de investigadores encontraram a hormona vitamina D no núcleo de células que não fazem parte do sistema de regulação do cálcio, incluindo o cérebro, os linfócitos, a

pele e tecidos malignos. No início dos anos 80, o investigador japonês Tatsuo Suda fez a descoberta excitante de que adicionando a hormona a células leucémicas malignas imaturas levava as células a diferenciarem-se, amadurecerem e a pararem o crescimento. Esta descoberta abriu uma nova era na investigação da vitamina D.

Nas duas últimas décadas, a investigação revelou uma variedade de acções biológicas da vitamina D. Entre outras, a inibição do crescimento celular, a indução da diferenciação celular, a imunomodulação e o controlo de outros sistemas hormonais, estando a deficiência de vitamina D associada a cancro, doenças auto-imunes, hipertensão e diabetes.

3.2. Fontes de Vitamina D

A vitamina D é um grupo de pró-hormonas lipossolúveis, sendo as duas formas principais o ergocalciferol (vitamina D₂) e o colecalciferol (vitamina D₃). A vitamina D pode ser obtida através da dieta ou pela acção da luz solar sobre a pele. A exposição da pele aos raios ultravioletas (290-315 nm) induz a conversão fotolítica do 7-dihidrocolesterol para pré-vitamina D₃, seguida de isomerização térmica para vitamina D₃. A vitamina D₃ assim formada é libertada para a circulação durante 2 a 3 dias após uma única exposição à luz solar [43].

Poucos alimentos na natureza contêm vitamina D. O salmão, o atum, a cavala e o óleo de fígado de bacalhau são as melhores fontes. As formas de vitamina D que ocorrem naturalmente são o colecalciferol, de fonte animal (Fig.2), e o ergocalciferol, de fonte vegetal [44]. O ergocalciferol pode ser obtido a partir de cogumelos, por exemplo [45]. A vitamina D₃ é mais eficaz do que a vitamina D₂ em aumentar a concentração sérica de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], mantendo esses níveis por um período mais prolongado [46]. Após a ingestão, são incorporadas em kilomícrons, transportadas através do sistema linfático e, subseqüentemente, libertadas na circulação venosa, onde se ligam a lipoproteínas.

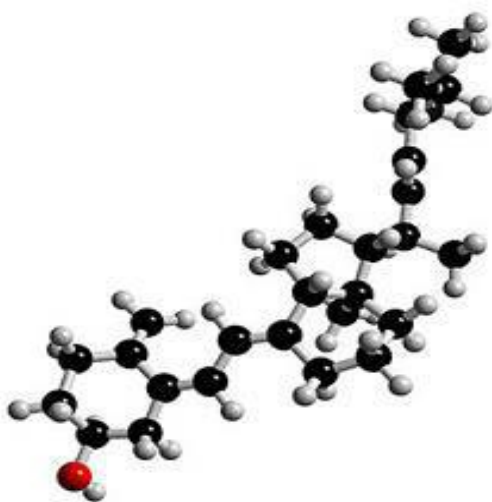


Figura 2. Molécula de colecalciferol

A deficiência em vitamina D é surpreendentemente comum, e é presentemente um problema, especialmente nas populações dos climas nórdicos e nos idosos, que pode levar a uma série de condições patológicas como a osteoporose, fraqueza muscular, fracturas, cancros e doenças auto-imunes, infecciosas e cardio-vasculares. Mais recentemente, foi demonstrado que os níveis de vitamina D também podem ter impacto nas taxas de mortalidade, independentemente da causa de morte [47]. Factores associados a status baixo de vitamina D incluem síntese cutânea limitada de colecalciferol (estação do ano, latitude, pigmentação cutânea, uso de protector solar, idade), biodisponibilidade diminuída (má-absorção, obesidade), catabolismo aumentado (anticonvulsivantes, glicocorticoides, terapêutica retroviral), gravidez e amamentação, síntese diminuída de 25(OH)D (falência hepática) e síntese diminuída de 1,25-dihidroxitamina D [1,25(OH)2D] (doença renal crónica). Seja o que for que diminua a transmissão da radiação ultravioleta B (UVB) para a superfície da terra ou que interfira com a penetração da radiação UVB na pele afectará a síntese cutânea da vitamina D [6,48]. A pigmentação melânica da pele limita a penetração dos raios ultravioletas às camadas profundas da pele onde a vitamina D é sintetizada, sendo esta síntese menos eficiente nos indivíduos de raça negra [49-51]. De forma semelhante, um creme protector solar factor 15 absorve 99% da radiação UVB incidente, diminuindo a síntese de vitamina D3 em 99% [52]. A idade está associada a uma diminuição da concentração de 7-dihidrocolesterol da pele. Uma pessoa de 70 anos tem aproximadamente 25% da quantidade de 7-dihidrocolesterol de um adulto jovem e, portanto, uma capacidade reduzida em 75% de produzir vitamina D [48]. A obesidade está associada a deficiência de vitamina D por sequestro desta na grande quantidade de massa gorda, uma vez que a vitamina é lipossolúvel e prontamente sequestrada nos adipócitos [53]. Num estudo recente [54], verificou-se que os doentes oncológicos obesos, com índice de massa corporal superior a 30 kg/m², apresentaram níveis séricos de 25(OH)D significativamente mais baixos, comparados com os não obesos. Níveis séricos inferiores a 21 ng/ml (52 nmol/l) são considerados insuficientes. Níveis compreendidos entre 21 e 29 ng/ml (52-72 nmol/l) podem ser considerados com indicando uma insuficiência relativa e níveis superiores a 29 ng/ml (72 nmol/l) são considerados adequados [35,55,56].

Tem sido estimado que um bilião de pessoas no mundo apresenta deficiência ou insuficiência de vitamina D. De acordo com vários estudos [1-5], 40 a 100% de homens e mulheres idosos europeus e americanos são deficientes em vitamina D. Particularmente relevante para o potencial papel da vitamina D no cancro da mama, é o facto de que tanto a idade com a deficiência de estrogénios estarem associadas a um status baixo de vitamina D. A idade reduz a produção de colecalciferol na pele, enquanto a deficiência de estrogénios diminui a activação metabólica da vitamina D e a expressão do seu receptor, Receptor da Vitamina D (VDR) [6,7], estando assim as mulheres pós-menopausicas (população-alvo do cancro da mama) em maior risco de deficiência de vitamina D do que as mulheres mais novas. Num estudo de mulheres pós-menopausicas em tratamento para a osteoporose [5], mais de 50% apresentaram níveis insuficientes (inferiores a 30 ng/ml) de 25(OH)D. O National Health and Nutrition Examination (NHANES) 2000-2004 apresentou dados do estado nutricional de vitamina D da população dos EUA [57]: no geral, os níveis séricos de 25(OH)D são mais elevados na população mais jovem em relação à mais idosa, nos homens em relação às mulheres e na população de raça branca em relação à de raça negra. Dependendo do

grupo populacional, 1-9% apresentaram níveis séricos de 25(OH)D inferiores a 11 ng/ml (27,5 nmol/l), 8-36% tinham níveis inferiores a 20 ng/ml (50 nmol/l) e a maioria, 50-78%, apresentaram níveis inferiores a 30 ng/ml (75 nmol/l). Em relação aos valores do NHANES de 1988-1994, os níveis séricos de 25(OH)D diminuíram acentuadamente em todos os grupos [58].

3.2.1. Exposição solar, ingestão de vitamina D e cancro da mama

As populações que vivem em latitudes mais altas têm um risco aumentado para linfoma de Hodgkin, assim como para cancro do cólon, pâncreas, ovário, mama e outros cancros, e têm maior probabilidade de morrer destes cancros, em comparação com as populações de mais baixas latitudes [59-62]. Outros investigadores publicaram a existência de uma variação geográfica na mortalidade por cancro da mama nos Estados Unidos, associada a medidas geográficas de radiação ultravioleta por mais de 9 anos [63]. As mortes por cancro da mama variaram entre baixas taxas nas zonas solarengas do sul e sudoeste e altas taxas em áreas com pouca exposição solar, como Nova Iorque. Relação inversa entre o ambiente de radiação ultravioleta e a mortalidade devida a cancro da mama, endométrio, ovário, próstata e rim, mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin tem sido reportada em vários países europeus [64]. Num estudo caso-controlo populacional [65], a relação entre fontes de vitamina D e risco de cancro da mama foi determinada em 972 doentes com cancro da mama a partir do Canadian Ontario Cancer Registry e 1135 controlos. Um risco reduzido de cancro da mama foi significativamente associado a exposições solares mais elevadas. Também se verificaram associações inversas ao risco de cancro da mama com o uso de óleo de fígado de bacalhau e alto consumo de leite. Isto, na faixa etária 10-19 anos. A associação foi mais fraca entre 20 e 29 anos e não se verificou associação na faixa etária 45-54 anos. Estes resultados sugerem que as actividades exteriores e os alimentos ricos em vitamina D e suplementos podem ser cruciais na fase de desenvolvimento mamário, proporcionando uma protecção significativa contra o risco de cancro da mama. Um estudo prospectivo de incidência de cancro da mama em relação com a ingestão de vitamina D em mais de 30000 participantes no Women's Health Study [66] revelou que uma maior ingestão de vitamina D estava moderadamente associada a um menor risco de cancro da mama na pré-menopausa mas não na pós-menopausa. Outro estudo epidemiológico [67], com 5009 mulheres, demonstrou que a exposição solar e a vitamina D da dieta estavam associadas a um risco reduzido de cancro da mama, mas esta associação era dependente da região de residência. O risco relativo foi calculado baseado em 190 casos que desenvolveram cancro da mama. A correlação entre a exposição à radiação solar e o risco de cancro da mama também foi sugerida noutros grandes estudos epidemiológicos [68-70], por exemplo, um deles [70] revelou que a incidência de cancro da mama foi mais elevada nas latitudes mais altas em ambos os hemisférios, e muitos estudos demonstraram uma relação inversa entre a ingestão de vitamina D e o risco de cancro da mama [66,67,71-75]. Num desses estudos [66], foram avaliadas mais de 30000 mulheres com idade igual ou superior a 45 anos com follow-up de 10 anos, tendo sido constatado que uma ingestão elevada de cálcio e vitamina D reduziu o risco de cancro da mama nas mulheres pré-menopausicas em cerca de um terço, sendo esta associação mais forte para os tumores mais agressivos e não foi observada nas mulheres pós-menopausicas. Noutro estudo [71], foram avaliadas 68567 mulheres pós-menopausicas do Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort com um questionário detalhado e follow-up. Foram detectados 2855 cancros da mama, tendo sido encontrada uma

associação com um menor consumo de produtos lácteos. Outro estudo semelhante [72], avaliou a relação entre a ingestão de vitamina D e o risco de cancro da mama em 34321 mulheres pós-menopausicas do Iowa Women's Health Study, tendo sido concluído que o risco relativo de cancro da mama era mais baixo nas mulheres que consumiam mais de 800 UI/dia de vitamina D, em comparação com as que consumiam menos que 400 UI/dia. Estes resultados sugerem que a ingestão diária de mais de 800 UI de vitamina D poderá associar-se a uma pequena diminuição do risco de cancro da mama. Num estudo caso-controlo populacional [73], foram examinados os efeitos da ingestão da vitamina D e cálcio no risco de cancro da mama em mulheres pré-menopausicas, tendo-se observado que a ingestão de vitamina D, mas não de cálcio, estava associada a uma diminuição do risco. Noutro estudo [74], mulheres pós-menopausicas foram randomizadas em 3 grupos, um com ingestão de 1400 a 1500 mg/dia de cálcio, outro com ingestão da mesma quantidade de cálcio associada a 1100 UI/dia de vitamina D e o terceiro grupo com placebo, e seguidas durante 4 anos. Após este período, as mulheres no grupo do tratamento combinado apresentaram um risco de cancro da mama 60% mais baixo, comparado com o placebo, e as mulheres no grupo da ingestão de cálcio isolado, 47% de redução em relação ao placebo. O Nurses Health Study [75], que realizou um follow-up de 16 anos a 88691 mulheres desde o questionário alimentar, providenciou informação interessante acerca da ingestão de cálcio, vitamina D e o risco de cancro da mama, que estaria diminuído nas mulheres pré-menopausicas com alta ingestão de cálcio e vitamina D.

3.2.2. Níveis séricos de vitamina D e cancro da mama

Vários estudos exploraram a possível associação entre baixos níveis séricos de metabolitos da vitamina D e o risco de cancro da mama e a progressão do cancro [8-12,35]. Um estudo caso-controlo prospectivo, inserido no Nurses' Health Study [13], avaliou a relação entre os níveis de metabolitos de vitamina D, a 25(OH)D e a 1,25(OH)2D, e o risco de cancro da mama, com um follow-up de 6 anos. Comparadas com os controlos, as doentes com cancro da mama apresentaram níveis séricos médios mais baixos de 25(OH)D. O nível sérico de 25(OH)D estava inversamente associado com o risco de tumores com receptores de estrogéneos e progesterona negativos, mas não com tumores com receptores de estrogéneos positivos. Embora os valores séricos de 1,25(OH)2D também fossem baixos nos casos, não tinham significado quando comparados com os controlos. Outro estudo recente [14] demonstrou que os níveis de vitamina D associam-se inversamente ao risco de cancro da mama, independentemente do estado dos receptores. Foi realizada uma análise de várias publicações que associaram a 25(OH)D sérica ao risco de cancro da mama [8], parecendo haver uma associação inversa entre os níveis de vitamina D e o cancro da mama. Um estudo caso-controlo alemão [9] com 1394 casos e 1365 controlos, agrupados segundo os níveis de 25(OH)D, <30, entre 30 e 45, entre 45 e 60, entre 60 e 75 e >75 nmol/l, sugeriu um efeito protector forte da vitamina D em relação ao cancro da mama na pós-menopausa, com uma redução de cerca de 70% do risco nas mulheres com níveis superiores a 75 nmol/l, em comparação com as que apresentavam níveis inferiores a 30 nmol/l. Mais recentemente, um estudo caso-controlo com 1026 doentes com cancro da mama e 1075 controlos [15] com o intuito de avaliar a relação entre os níveis plasmáticos de 25(OH)D e o risco de cancro da mama, revelou que a concentração média plasmática de 25(OH)D foi de 27,1 ng/ml nos casos e de 29,7 nos controlos, concluindo que a concentração plasmática de 25(OH)D estava inversamente associada ao risco de cancro

da mama de uma forma concentração-dependente. Em comparação com as mulheres deficientes em vitamina D, níveis acima de 40 ng/ml estavam associados a uma diminuição de 40% no risco de cancro da mama invasivo, sendo esta diminuição no risco maior nas mulheres pós-menopausicas sugerindo os autores, ser esse o nível óptimo para prevenção do cancro da mama. Outro estudo, apresentado na reunião da American Society of Clinical Oncology (ASCO) de 2009 [16], analisou os níveis séricos de vitamina D e o estado nutricional de doentes oncológicos, tendo concluído que a deficiência de vitamina D é prevalente em doentes oncológicos, independentemente do estado nutricional (não houve diferença significativa entre os níveis de estado nutricional), sugerindo que deve ser feito o rastreio de deficiência de vitamina D nestes doentes.

Há no entanto alguns estudos que não encontram essa associação. Num estudo recente [76], os níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH)2D foram medidos entre 1993 e 2001 em mulheres pós-menopausicas do cohort Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. Após 3,9 anos de follow-up, os autores identificaram 1005 cancros da mama que foram comparados a 1005 controlos. Os riscos relativos de cancro da mama não foram estatisticamente significativos entre os valores mais altos e os mais baixos para ambos os metabolitos. Outro estudo [77] concluiu que a suplementação de cálcio e vitamina D não diminuiu a incidência de cancro da mama invasivo nas mulheres pós-menopausicas e que os níveis de 25(OH)D não estavam associados a risco subsequente de cancro da mama.

Em relação à progressão do cancro da mama, o papel da 1,25(OH)2D nos diversos estádios clínicos tem sido estudado. Num estudo [10], os níveis hormonais eram mais altos na doença precoce, desciam nas doentes normocalcémicas com metástases ósseas e eram mais baixos nas doentes hipercalcémicas. Nas doentes normocalcémicas com metástases ósseas submetidas a hormonoterapia, os níveis séricos de 1,25(OH)2D desciam nas doentes com progressão de doença num período de 6 meses, enquanto se mantinham estáveis nas que respondiam ao tratamento. Outra publicação, destinada a clarificar o papel da vitamina D na progressão do cancro [11], realizou a medição dos níveis séricos de 25(OH)D no cancro da mama precoce e avançado, sendo estes significativamente mais elevados na doença precoce. Pode ser especulado que a hormona controla o crescimento tumoral secundário ou que a sua síntese diminui à medida que o crescimento tumoral progride. Recentemente, foi publicado um estudo prospectivo [35] que avaliou os níveis de 25(OH)D e o risco de recorrência à distância e morte com 512 doentes e um follow-up médio de 11,6 anos. Baixos níveis de vitamina D foram associados a um risco mais elevado de metástases à distância e pior sobrevivência (22,7% apresentaram recorrência à distância e 20,7% morreram durante o follow-up). Baixos níveis de vitamina D foram significativamente associados a status pré-menopausa, alto índice de massa corporal, altos níveis de insulina e alto grau tumoral. A sobrevivência livre de doença foi pior nas doentes com níveis deficientes de vitamina D, em comparação com as doentes com níveis adequados. Esta associação foi independente da idade, índice de massa corporal, status de receptores de estrogéneos, estadio TNM e grau tumoral. Outro estudo [12] avaliou os efeitos anti-proliferativos de suplementar com 1,25(OH)2D, por um período de 30 dias, 21 doentes pós-menopausicas com cancro da mama, através da medição do tamanho do tumor, da taxa de proliferação celular (expressão Ki67) e dos níveis séricos de 1,25(OH)2D. Não houve diferença nos níveis de 1,25(OH)2D e nas dimensões tumorais avaliadas por ecografia antes e após a suplementação. Nos tumores G1, houve uma pequena redução na expressão de Ki67 e

houve uma redução significativa dessa expressão nos tumores GII após o tratamento, um indício do seu efeito anti-proliferativo. Estes resultados correlacionam-se com estudos *in vitro* que mostram que a 1,25(OH)₂D afecta o fenótipo do cancro da mama e reverte as características mioepiteliais associadas a formas mais agressivas e a pior prognóstico [25]. Num estudo prospectivo multicêntrico [17] com 1183 doentes sobreviventes de cancro da mama, verificou-se uma elevada prevalência de níveis insuficientes (69,4%) ou francamente deficientes (6,2%) de vitamina D, sendo que as mulheres com cancro invasivo apresentavam níveis mais baixos do que as com doença *in situ*, embora a possibilidade do estadio da doença estar independentemente associado à vitamina D necessite de mais investigação. Muito recentemente, foram publicados os resultados de um estudo prospectivo [18] que avaliou 512 doentes com cancro da mama em estadio precoce em relação aos níveis de vitamina D e que demonstrou que os níveis eram deficientes (<50 nmol/L) em 37,5%, insuficientes (entre 50 e 72 nmol/L) em 38,5% e suficientes (>72 nmol/L) em 24%. As doentes com níveis deficientes apresentaram um risco aumentado de recorrência à distância e morte, comparadas com as que apresentavam níveis suficientes.

No entanto, um estudo recente, apresentado na reunião da ASCO de 2009 [78], analisou 607 doentes pós-menopausicas com cancro da mama, do ensaio NCIC-CTG MA 14, avaliando os níveis de 25(OH)D séricos e o prognóstico, e não foi encontrada associação entre os níveis de vitamina D e a sobrevivência livre de doença (recorrência).

3.3. Metabolismo da Vitamina D

O primeiro passo na activação metabólica da vitamina D é a hidroxilação do carbono 25, que ocorre no fígado pela acção das 25-hidroxíases mitocondriais e microssómicas (codificadas pelos genes CYP27A1, CYP2R1, CYP3A4, CYP2J3) [79,80]. O metabolito resultante, a 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D₃], é 1 α -hidroxilado no rim pela 1 α -hidroxíase mitocondrial (codificada pelo gene CYP27B1), originando a hormona activa 1,25 dihidrocoleciferol ou calcitriol [1,25(OH)₂D₃] [79] (Fig. 3). A 25-hidroxilação da vitamina D é pouco regulada. Os níveis de 25(OH)D aumentam na proporção da ingestão de vitamina D (sendo armazenada no tecido adiposo) e, por essa razão, os níveis plasmáticos de 25(OH)D são usados como um indicador do status de vitamina D [43]. A 1 α -hidroxíase renal é fortemente regulada, sendo isto consistente com a potente actividade do seu produto na homeostasia do cálcio. O cálcio da dieta pode regular a enzima directamente, através de alterações no cálcio sérico e, indirectamente, alterando os níveis de hormona paratiróide (PTH) [81-83]. A restrição do fosfato da dieta também aumenta a actividade da 1 α -hidroxíase renal [84,85].

A 25(OH)D e a 1,25(OH)₂D são catabolizadas pela enzima citocromo P450, 24-hidroxíase (codificada pelo gene CYP24A1), nos metabolitos 24,25(OH)₂D e 1,24,25(OH)₂D, respectivamente [79,86]. A 24-hidroxíase é regulada de uma forma recíproca à da 1 α -hidroxíase. A sua actividade e expressão são aumentadas pelo fosfato e pela vitamina D [87] e reduzidas pela PTH [88].

Os metabolitos da vitamina D são moléculas lipofílicas com baixa solubilidade aquosa, que têm que ser transportados na circulação ligados a proteínas plasmáticas. A mais importante destas proteínas transportadoras é a Vitamin D Binding Protein (DBP), que se liga aos metabolitos por ordem de afinidade 25(OH)D = 24,25(OH)₂D > 1,25

(OH)2D > vitamina D [89,90]. Os níveis plasmáticos de DBP são vinte vezes superiores à quantidade total de metabolitos de vitamina D e mais de 99% dos compostos circulantes de vitamina D estão ligados às proteínas, principalmente ao DBP, embora a albumina e as lipoproteínas contribuam em menor grau. Os metabolitos de vitamina D ligados ao DBP têm acesso limitado às células-alvo e, assim, são menos susceptíveis ao metabolismo hepático e subsequente excreção biliar, levando a uma maior semi-vida circulante [90]. Apenas a pequena fracção dos metabolitos não ligados parece entrar nas células-alvo para ser metabolizada ou exercer actividade biológica. Para a 1,25(OH)2D e os seus análogos, a actividade biológica foi correlacionada com a concentração de hormona livre [91,92]. Uma vez dentro das células, o destino metabólico da 25(OH)D depende da expressão e/ou actividade das 24 e 1 α hidroxilases. Em células com altos níveis de 24-hidroxilase, predomina a formação de 24,25(OH)D e subsequente catabolismo. Mas, nas células que contêm 1 α -hidroxilase funcional, pode haver conversão de 25(OH)D para 1,25(OH)2D que se pode ligar ao Vitamin D Receptor (VDR) e mediar efeitos regulatórios celulares específicos de uma forma autócrina. A 25(OH)D praticamente não tem efeito directo no VDR porque a sua ligação é apenas 2% da da 1,25(OH)2D e devido ao facto da 25(OH)D estar cerca de 1000 vezes mais fortemente ligada ao DBP sérico [93]. Os níveis de DBP não são regulados pela vitamina D. Existe diminuição de DBP na presença de doença hepática, síndrome nefrótico e malnutrição, e aumento durante a gravidez e no decurso de terapêutica com estrogéneos [94]. A 25(OH)D não difunde simplesmente para dentro das células tubulares proximais renais que contêm a 1 α -hidroxilase. A 25(OH)D ligada ao DBP entra nestas células via endocitose mediada pela megalina [95]. A megalina faz parte de um complexo de proteínas que facilitam a endocitose, como a receptor-associated protein (RAP) e a cubilina [96,97].

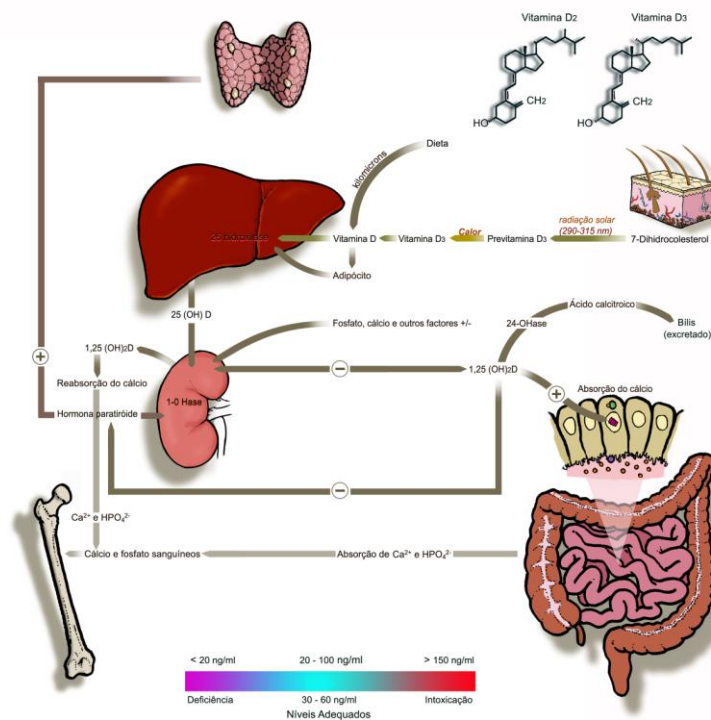


Figura 3. Metabolismo da vitamina D

3.3.1. Metabolismo da vitamina D e cancro da mama

A 1α -hidroxilase tem sido encontrada em muitas células e tecidos, incluindo a próstata, a mama, o cólon, o pulmão, as células β pancreáticas, os monócitos e as células paratiroideias, sugerindo que os efeitos não clássicos da vitamina D podem estar ligados à expressão tecido-específica da 1α -hidroxilase e à síntese local de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Então, essa $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida fora do rim serve primariamente como um factor autócrino/parácrino com funções celulares específicas [22,23]. Tais acções locais podem incluir a regulação da proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. Dado os efeitos regulatórios negativos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ no crescimento da glândula mamária, a identificação de 1α -hidroxilase e a conversão local da $25(\text{OH})\text{D}$ para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ nas células mamárias [24] tem implicações significativas no que respeita ao desenvolvimento, progressão e tratamento do cancro da mama. A regulação da 1α -hidroxilase em locais extra-renais é bastante diferente da enzima renal, sendo isto consistente com as funções autócrinas/parácrinas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ produzida localmente. As taxas de síntese e degradação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estão sob o controlo de factores locais, isto é, citocinas e factores de crescimento, que optimizam os níveis da hormona para estas acções específicas de célula, através de mecanismos incompletamente compreendidos [98]. Os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ (como precursor) serão o maior factor limitante para a síntese extra-renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Foi observado aumento da expressão do CYP27B1 no cancro da mama [99] e da próstata [100], assim como nos estadios iniciais do cancro do cólon bem a moderadamente diferenciado; mas encontra-se diminuída nos cancros do cólon mal diferenciados [101,102]. A expressão aumentada de CYP27B1 em tecidos tumorais pode prover a conversão local de $25(\text{OH})\text{D}$ para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [24,99]. Mas a expressão de ARNm da CYP24A1 (que codifica a 24O-hase) está aumentada em tumores e pode contrariar a actividade anti-proliferativa da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ao diminuir os seus níveis [103,104]. A região cromossómica 20q13.2, contendo o gene CYP24A1 está amplificada em tumores mamários humanos, sendo que esta amplificação pode levar a níveis séricos reduzidos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, providenciando um micro-ambiente propício ao crescimento celular na ausência do controlo de crescimento mediado pela vitamina D [105]. Também se verificou que a expressão do ARNm do CYP24A1 está aumentada em amostras de cancros do pulmão, do cólon e do ovário, sugerindo que os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ estariam reduzidos nestes casos [106]. A 24-hidroxilase está presente na maioria dos tecidos-alvo da vitamina D e é expressa nas células de cancro da mama [107].

Foi demonstrado que as células epiteliais mamárias humanas expressam megalina e cubilina e a entrada de DBP foi observada em células mamárias *in vitro*, estando esta entrada de DBP correlacionada com a transactivação do VDR mediada pela $25(\text{OH})\text{D}$ [108].

3.4. Receptor da Vitamina D - VDR

A maior parte das actividades biológicas da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ requer um receptor de alta afinidade, o “Vitamin D Receptor” (VDR), um membro antigo da superfamília dos receptores nucleares para hormonas esteróides (Fig. 4). Através da ligação ao VDR, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ exerce activação e repressão da transcrição dos genes-alvo. O VDR regula a expressão génica de uma forma ligando-dependente [109,110]; actua como um factor

de transcrição activado por um ligando. Os domínios funcionais do VDR são o ADN binding domain, próximo ao terminal N, o ligand binding domain, localizado na porção terminal COOH da molécula, locais de heterodimerização com o Retinoid X Receptor (RXR), sinais de localização nuclear e locais de transactivação (AF1 e AF2). Os domínios envolvidos no controlo da transcrição génica são o ligand binding, a heterodimerização com o RXR, a ligação do heterodímero aos Vitamin D Response Elements (VDREs) nas zonas promotoras dos genes responsivos à 1,25(OH)₂D e o recrutamento das VDR interacting nuclear proteins (co-reguladores) para o complexo de pré-iniciação transcripcional (que aumentam ou reprimem a taxa de transcrição génica pelo VDR). Assim, a 1,25(OH)₂D exerce os seus efeitos biológicos ligando-se ao VDR e formando um heterodímero com o RXR. Na ausência de ligando, a maior parte do VDR está presente no citoplasma. A ligação do ligando ao VDR induz a heterodimerização VDR-RXR e translocação do complexo para o núcleo, onde promove a transcrição de genes que tenham um VDRE na sua região promotora [111].

O ligand binding domain é responsável pela ligação de alta afinidade da 1,25(OH)₂D. A 25(OH)D e a 24,25(OH)₂D ligam-se 100 vezes menos avidamente [112]. O anel A contendo o grupo 1 α -hidroxilo é a porção da molécula de 1,25(OH)₂D responsável pela ligação ao VDR. A molécula de VDR está protegida da degradação proteossómica pela ligação ao ligando [113]. Após a ligação do VDR ao ligando, o reposicionamento da hélice 12 no terminal COOH do domínio ligand binding, conhecida como Activation Function 2 (AF2) dependente de ligando, leva a uma alteração conformacional da estrutura tridimensional do VDR. Este passo da activação parece ser necessário para o recrutamento pelo VDR de Motor Proteins responsáveis pela translocação rápida do VDR citoplasmático para o núcleo através de microtúbulos [114,115].

A associação selectiva entre o VDR e o RXR envolve superfícies de dimerização em três diferentes domínios da molécula de VDR e induz uma conformação do VDR que é essencial para a função de transactivação do VDR.

O ADN binding domain está organizado em dois zinc-nucleated modulos, os zinc finger DNA binding motifs, que são responsáveis pela interacção de alta afinidade com sequências de ADN específicas na região promotora dos genes-alvo da 1,25(OH)₂D, chamadas vitamin D-responsive elements (VDREs). O tipo de VDRE mais comum, designado DR3, é composto por dois hexanucleotídeos repetidos, separados por um número variável de nucleotídeos (GGTCCA-NNN-GGTCCA). O complexo activado 1,25(OH)₂D-VDR-RXR liga-se a estes VDREs na regiões promotoras dos genes-alvo. Para a activação transcripcional, o VDR ocupa o braço 3' e o RXR liga-se ao braço 5' do VDRE [79,116].

A vitamina D, através da ligação ao VDR, pode regular positivamente a expressão de certos genes, ligando-se aos VDREs presentes nas suas regiões promotoras, ou regular negativamente a expressão de outros genes, ligando-se a VDREs negativos. Os genes cuja expressão é induzida pelos ligandos do VDR incluem genes envolvidos na formação da matriz óssea e remodelação óssea e outros genes relacionados com as acções não clássicas da vitamina D, tais como, a molécula de adesão celular integrina β 3, o supressor tumoral p21, a calbindina-9K, a 24-hidroxilase, o CYP3A4, a involucrina, a fosfolípase C γ 1 e o IGF binding protein-3. Os genes que são regulados negativamente em resposta à vitamina D e aos seus análogos são genes cujos produtos são conhecidos pelas suas funções inflamatórias, como algumas citocinas (IL-2, IL-12,

TNF- α , interferon- γ e o granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), e pró-proliferativas, como o epidermal growth factor receptor, o c-myc e o K16 [117-119].

Existem proteínas co-factores que têm a capacidade de modular a expressão génica mediada pelo VDR. Estas proteínas possuem actividades enzimáticas intrínsecas modificadoras da cromatina, actuam como uma plataforma para o recrutamento de proteínas modificadoras da cromatina e recrutam factores de transcrição basais para os promotores [79]. Actuam como uma ponte entre o heterodímero VDR-RXR e a maquinaria de transcrição. Esses co-factores podem ser co-activadores ou co-repressores. A ligação da 1,25(OH)₂D induz fosforilação e alterações conformacionais no VDR que causa a libertação de co-repressores [tais como os nuclear receptor co-repressors – NcoRs – e o silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT)-histone deacetylase (HDAC) complex] que mantêm a cromatina num estado de repressão da transcrição [120]. A alteração conformacional também reposiciona os domínios Activation Function 2 (AF2) do VDR de forma a ligarem-se a co-activadores estimulatórios, consistindo nos steroid receptor coactivators (SRCs), no nuclear coactivator 62 Kda-SKI-interacting protein (Nco A62-SKIP) e nos modificadores da cromatina CREB binding protein (CBP)-p300 e PBAF (polybromo-e SWI-2-related gene 1 associated factor) que acetilam histonas nos nucleossomas para preparar o ADN para a transcrição [121]. Uma vez despreprimida a cromatina, as vitamin D receptor-interacting proteins (DRIPs) formam um complexo que se liga ao domínio AF2 do VDR e interactuam com a maquinaria da transcrição, como o transcription factor 2B (TF2B) e a polimerase II-RNA, e iniciam a transcrição.

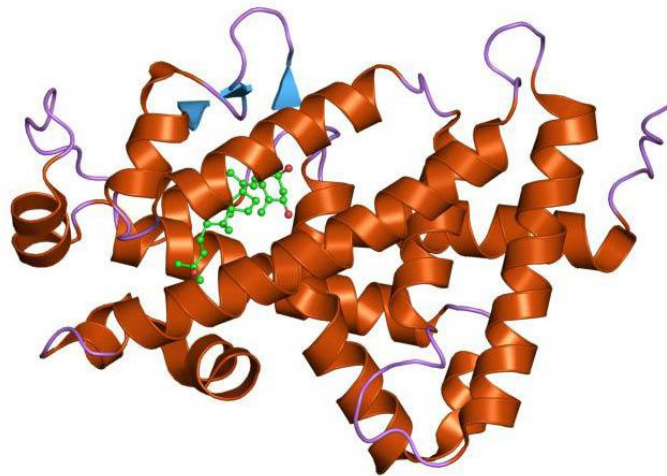


Figura 4. Receptor nuclear da vitamina D

3.4.1. VDR e cancro da mama

O VDR foi originalmente encontrado nos órgãos-alvo clássicos da vitamina D envolvidos na homeostasia mineral, como o intestino, o osso, o rim e as glândulas paratiroideias. Posteriormente, o VDR foi detectado em muitos outros tecidos e tipos celulares, incluindo a pele, o pâncreas, a próstata, a glândula mamária e células transformadas de uma grande variedade de tipos tumorais. Investigação extensa

demonstrou que as células tumorais expressam VDR, que pode regular mais de 60 genes envolvidos na diferenciação celular, em efeitos anti-proliferativos e anti-metastáticos [122]. Na glândula mamária, o VDR está presente em todos os tipos celulares da glândula (células epiteliais basais e luminais, células estromais) mas a sua expressão não é uniforme no tempo e no espaço [19]. Durante a puberdade, observa-se uma coloração fraca do VDR nas populações proliferativas e uma coloração forte nas populações diferenciadas. Durante a gravidez e lactação, a expressão do VDR aumenta na glândula mamária [20]. Este efeito sugere um papel para a 1,25(OH)₂D na proliferação e diferenciação da glândula. Na senescência, na involução da glândula (um processo que envolve remodelação tecidual e apoptose extensas), existe um aumento marcado da expressão do VDR nas células epiteliais, indicando um papel funcional para o VDR na apoptose fisiológica. O VDR é expresso em baixos níveis na glândula mamária de ratos virgens e essa expressão está aumentada em resposta a hormonas que induzem diferenciação, como o cortisol, a prolactina e a insulina [21]. Os níveis mais altos de VDR na mama são observados durante a lactação, sendo máximos no terceiro dia pós-parto, quando a concentração de cálcio no leite é mais alta [20]. A concentração de 1,25(OH)₂D circulante está aumentada durante a gravidez e lactação e, como já referido, foi demonstrada a presença de 1 α -hidroxilase no tecido mamário normal, sugerindo um papel para a 1,25(OH)₂D na diferenciação e produção láctea pela glândula mamária.

A análise do desenvolvimento da glândula mamária de ratos VDR-Knock-Out (VDR-KO) demonstrou um crescimento acelerado e maior ramificação do que nos wild-type; além disso, as glândulas de ratos VDR-KO exibiram aumento do crescimento em resposta a estrogéneos exógenos e progesterona [19,123]. Também se verificou uma involução glandular atrasada nos ratos VDR-KO em relação aos wild-type [19] e uma percentagem aumentada de lesões mamárias pré-neoplásicas induzidas pelo carcinogéneo químico DMBA nas glândulas de ratos VDR-KO, comparada com ratos wild-type [124]. Houve um aumento da incidência de desenvolvimento de tumores mamários com receptores de estrogéneos negativos em resposta ao DMBA nestes ratos VDR-KO, assim como tumores nos gânglios linfáticos e pele [125]. Vários estudos demonstraram que uma grande proporção de biópsias de cancros da mama contêm VDR [126,127], parecendo haver uma associação entre os níveis de VDR e o prognóstico, na medida em que o status de receptor do tumor pode estar relacionado com a sobrevivência livre de doença [128,129]. O VDR é expresso em muitas linhas celulares de cancro da mama, tumores mamários do rato induzidos por carcinogénios, tecido mamário normal e cancros da mama. Mais, em tecidos de cancro da mama, foram observados níveis mais elevados de RXR e VDR do que no tecido mamário normal [33,130]. Há autores que propõem que o complexo 1,25(OH)₂D-VDR induz um programa de genes que suprime a proliferação e estimula a diferenciação na glândula mamária normal e que uma desregulação da expressão génica mediada pelo VDR possivelmente predispõe as células para a transformação [44].

3.5. Acções da Vitamina D

A descoberta de que muitos tecidos e células no organismo contêm um receptor de vitamina D e de que vários possuem a maquinaria enzimática para converter a forma primária em circulação de vitamina D, a 25(OH)D, para a forma activa, a 1,25(OH)₂D, providenciou novos conhecimentos em relação às acções desta vitamina (Fig. 5).

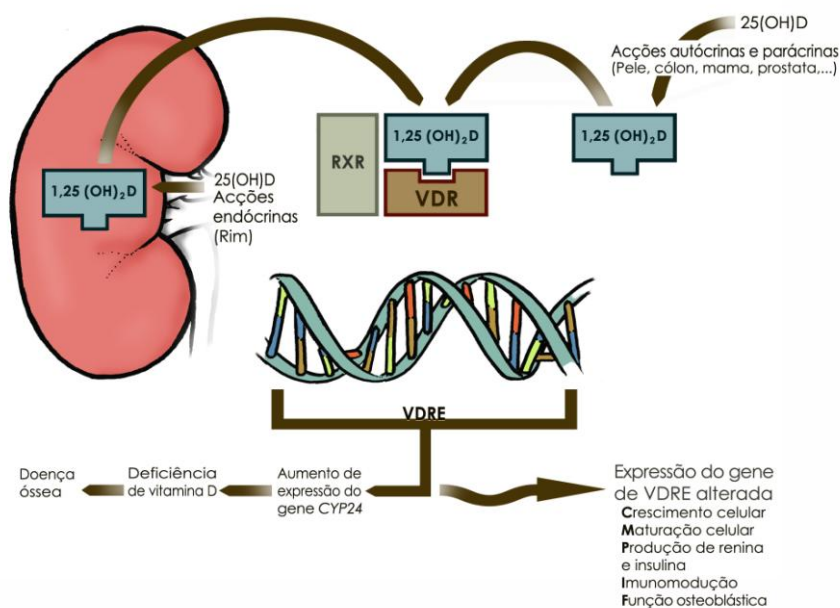


Figura 5. Ações da vitamina D

Classicamente, a vitamina D é considerada fundamental para a homeostasia do cálcio e saúde do osso. O sistema endócrino da vitamina D é um componente essencial das interações entre o rim, o osso, a glândula paratiroide e o intestino que mantêm os níveis de cálcio extracelular dentro de limites apertados, um processo vital para a fisiologia celular normal e a integridade do esqueleto [131]. A vitamina D aumenta as concentrações de cálcio sérico através de três mecanismos: primeiro, induz as proteínas envolvidas na absorção intestinal do cálcio; estimula também a absorção intestinal activa do fosfato. Segundo, as concentrações sanguíneas do cálcio mantêm-se dentro dos limites normais mesmo quando não há ingestão de cálcio na dieta; quando não há absorção intestinal de cálcio, a vitamina D estimula os osteoblastos a produzir o receptor activador nuclear factor-KB ligand (RANKL) que estimula a osteoclastogénese e activa os osteoclastos em repouso para a reabsorção óssea [132]. Assim, a hormona vitamina D tem um papel importante em permitir a mobilização do cálcio do osso, quando este está ausente da dieta. Tanto a vitamina D como a hormona paratiroide são necessárias para esta mobilização [82]. Terceiro, o túbulo renal distal é responsável pela reabsorção do último 1% do cálcio filtrado e as duas hormonas interagem para estimular a reabsorção deste último 1% de carga de cálcio filtrado [133].

Em relação às acções não clássicas, evidências genéticas, nutricionais e epidemiológicas associam anomalias no sistema endócrino da vitamina D a doenças não relacionadas com a homeostasia do cálcio, desde a hipertensão até à susceptibilidade a infecções, doenças autoimunes e cancro [134]. Os alvos para a vitamina D incluem o sistema nervoso central, a pele e os folículos pilosos, o sistema imune e as glândulas endócrinas. A nível celular, a vitamina D afecta a proliferação, a diferenciação e a apoptose de células normais e transformadas.

3.5.1. Efeitos anti-proliferativos e pró-diferenciação:

O sistema 1,25(OH)₂D₃ – VDR aprisiona o ciclo celular na transição G1-G₀, através de múltiplos mecanismos. A progressão através do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e pela sua associação com as cyclin dependent kinase (CDK) e os inibidores das CDK (CKIs). A expressão dos CKIs p21 e p27 inibe a proliferação, em parte por induzir a paragem do ciclo celular em G1 e saída do ciclo celular (G₀). Os inibidores das CDK p21 e p27 são alvos genéticos do complexo 1,25(OH)₂D-VDR em muitos tipos celulares [135,136], tendo sido identificado um VDRE no promotor da p21 [119]. A 1,25(OH)₂D induz a transcrição génica do CKI p21, o que parece ser suficiente para parar o crescimento e promover a diferenciação em células da linha monócito-macrófago; a activação da transcrição do CDKN1A (que codifica o CKI p21) pelo complexo 1,25(OH)₂D – VDR induz a saída do ciclo celular (diferenciação) e a paragem do ciclo celular em células humanas mielomonocíticas U937 [119]. A 1,25(OH)₂D induz também a síntese e/ou estabilização do CKI p27 (codificado pelo CDKN1B), através de interacções do VDR-Sp1 no promotor da p27 e pela redução, induzida pelo VDR, da actividade CDK2 e SKIP2, os principais factores responsáveis pela degradação da p27 [137].

Um mecanismo adicional pelo qual os derivados da vitamina D podem influenciar o crescimento das células tumorais é através da modulação da sinalização dos factores de crescimento. O complexo 1,25(OH)₂D – VDR bloqueia a sinalização mitogénica dos estrogéneos, do Epidermal Growth Factor (EGF), do Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) e regula para cima factores de crescimento negativos como o Transforming Growth Factor-β (TGF-β) [138-141].

3.5.2. Efeitos pró-apoptóticos:

Em associação aos efeitos anti-proliferativos, há evidências crescentes de que a 1,25(OH)₂D exerce efeitos anti-tumorais ao regular mediadores-chave da apoptose, como a repressão da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e BclXL, e a indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a BAX, a BAK e a BAD. Além de regular a expressão da família Bcl2, a 1,25(OH)₂D pode também activar directamente as moléculas efectoras caspases, embora não seja claro se a apoptose induzida pela vitamina é dependente das caspases [142]. Nos tecidos normais, as propriedades pro-apoptóticas da 1,25(OH)₂D são críticas no controlo do crescimento hiperplásico. No tecido mamário normal, o controlo da apoptose pelo complexo 1,25(OH)₂D – VDR através da indução da caspase 3 e BAX é necessário durante a gravidez, lactação e involução pós-lactação [123].

3.5.3. Efeitos anti-angiogénicos

A 1,25(OH)₂D também tem efeitos directos sobre as células endoteliais, inibindo a proliferação das mesmas e reduzindo a angiogénese *in vivo*, sendo este outro factor de actividade anti-tumoral da vitamina D observado em modelos animais de cancro.

3.5.4. Acções da vitamina D e cancro da mama

O papel protector da vitamina D no cancro foi sugerido por associações epidemiológicas fortes entre cancros da próstata, da mama e do cólon e deficiência em vitamina D. Mais, estudos usando sistemas modelo de carcinoma de células escamosas [28], adenocarcinoma prostático [29], cancro do ovário [30], cancro da mama [31] e cancro do pulmão [32] mostraram que a administração de 1,25(OH)₂D ou análogos da vitamina D apresentava efeitos anti-tumorais significativos. Foi demonstrado que a 1,25(OH)₂D e os seus análogos sintéticos inibem a proliferação de células de cancro da mama *in vitro* e a progressão tumoral *in vivo* [33]. Estudos com animais também suportam o conceito que a sinalização da vitamina D reduz o desenvolvimento de cancro mamário. Ratos alimentados com dietas pobres em vitamina D e cálcio desenvolveram hiperproliferação e/ou aumento da taxa de formação de tumores no cólon, próstata e glândula mamária [34]. A 1,25(OH)₂D induz paragem do ciclo celular, diferenciação e apoptose em células de cancro da mama, tanto receptores de estrogéneos positivas como negativas [24-27]. Os efeitos antiproliferativos de 1,25(OH)₂D resultam de alterações em reguladores chave do ciclo celular que culminam na defosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) e paragem em G₀/G₁.

O tratamento de células de cancro da mama humano MCF7 com 1,25(OH)₂D aumenta a expressão do CDKN1A e do CDKN1B e reprime o CCND1 (que codifica a ciclina D1), o CCND3 (que codifica a ciclina D3), o CCNA1 (que codifica a ciclina A1) e o CCNE1 (que codifica a ciclina E1), levando à inibição da actividade CDK e hipofosforilação do pRb [143,144]. O tratamento de células de cancro da mama com receptores de estrogénios positivos MCF-7 com 1,25(OH)₂D induz a paragem do ciclo celular em G₀/G₁, sendo este efeito acompanhado de aumento da expressão de CKIs e de fosforilação da proteína retinoblastoma [144]. Foi documentado o aumento da expressão da p21, a nível do RNAm e proteico, associada à paragem em G₁ mediada pela 1,25(OH)₂D ou seus análogos sintéticos [145,146]. Os efeitos da 1,25(OH)₂D na p27 parecem variar com o tipo celular. Alguns estudos mostraram não haver variação nos níveis de p27 em células MCF-7 humanas tratadas com 1,25(OH)₂D ou o seu análogo EB1089 [136,144,145], mas outro estudo demonstrou um aumento deste inibidor [143]. Um aumento na expressão da p27 foi também observado em resposta ao tratamento com o análogo EB1089 nas células de cancro da mama BT20 e ZR-75-1 [136]. Muitos estudos dos efeitos da vitamina D nas células de cancro da mama têm sido feitos em células MCF-7 que são receptores de estrogénios positivas. A sensibilidade à 1,25(OH)₂D é geralmente demonstrada como sendo maior em células de cancro da mama que expressam receptores de estrogénios do que naquelas que não os expressam [147]. No entanto, células de cancro da mama com resistência anti-estrogénica e células negativas para receptores de estrogénios retêm sensibilidade à paragem do ciclo celular mediada pela 1,25(OH)₂D [148-150]. Tem sido demonstrado que a transcrição de vários outros genes é afectada pela 1,25(OH)₂D no cancro do cólon, do ovário e células leucémicas. Por exemplo, a activação do gene do growth arrest and ADN damage (GADD45) [151], que está envolvido na resposta à lesão do ADN, a repressão do TYMS (que codifica a timidilato sintetase) [152] e do TK1 (que codifica a timidina cinase), que estão envolvidos na replicação do ADN, e a activação da família INK4 de inibidores ciclin D-dependent kinase, que medeiam a paragem do ciclo celular em G₁ [153]. O tratamento com 1,25(OH)₂D também resulta na repressão do proto-oncogene C-myc, o que contribui de forma significativa para os efeitos anti-proliferativos da 1,25(OH)₂D [144]. Embora pareça haver uma inibição da progressão do ciclo celular

das células tumorais tratadas com 1,25(OH)₂D, a base molecular precisa para este efeito difere de acordo com o tipo de célula tumoral, de tal forma que uma hipótese unificadora em relação ao exacto mecanismo de perturbação do ciclo celular mediado pela 1,25(OH)₂D não foi ainda possível.

Nos tumores em que o crescimento é dirigido pelo aumento da expressão do Transforming Growth Factor α / Epidermal Growth Factor Receptor (TGF α / EGFR), a 1,25(OH)₂D induz o sequestro do EGFR activado pelo ligando para dentro de endossomas, reduzindo assim os sinais de crescimento do EGFR activado pelo ligando na membrana celular, e a transactivação, pelo EGFR, do gene da ciclina D1 no núcleo [138]. Está bem documentado que as células de cancro da mama elaboram e respondem a uma variedade de factores de crescimento parácrinos/autócrinos. O análogo da vitamina D, EB1089, consegue reverter os efeitos estimulatórios de crescimento do EGF [154] e foi demonstrada regulação dos níveis do receptor de EGF pela 1,25(OH)₂D [155]. Em muitas células epiteliais, incluindo as células de cancro da mama, o TGF- β tem-se revelado um regulador negativo do crescimento e, assim, espera-se que o aumento da actividade de TGF- β diminua o crescimento das células tumorais mamárias. É interessante que tem sido demonstrado que a 1,25(OH)₂D aumenta a expressão de TGF- β 1 em células de cancro da mama [156]. Estudos *in vitro* com células de cancro da mama BT-20 e MCF-7 demonstraram um aumento dose-dependente no ARNm de TGF- β 1 e na proteína TGF β secretada no meio, em resposta ao tratamento com 1,25(OH)₂D ou EB1089, sendo o análogo mais potente [157]. O IGF-I é um mitogéneo potente e factor de sobrevivência para muitos tipos de células, incluindo o epitélio mamário normal e as células de cancro da mama [158]. O IGF-I contribui para a perda da regulação do crescimento, ao inibir a morte celular nas células tumorais. Níveis altos de IGF-I plasmáticos estão associados a um risco aumentado de cancro da mama em mulheres pré-menopausadas [159] e o receptor de IGF-I apresenta expressão aumentada em muitas linhas celulares de cancro da mama [160]. Estudos com linhas celulares de cancro da mama indicaram que os compostos de vitamina D são capazes de bloquear os efeitos mitogénicos da IGF-I. Este efeito é acompanhado de uma diminuição na proliferação e de um aumento na apoptose [161,162].

Tem sido reportado que a 1,25(OH)₂D diminui a expressão de Bcl2 nos tumores mamários MCF7 e nas células leucémicas HL-60, e aumenta a expressão de BAX e BAK no cancro prostático, no adenoma colo-rectal e em células de carcinoma [142]; nas células MCF-7, induz a redistribuição da proteína BAX do citosol para a mitocôndria [27,163]. A 1,25(OH)₂D também aumenta as propriedades pro-apoptóticas e anti-tumorais da radiação ionizante nas células tumorais mamárias MCF7 e a apoptose induzida pelo TNF- α nas mesmas células, através de mecanismos caspase-dependentes e independentes [164,165]. O TNF- α induz a apoptose nas células MCF-7 por uma via bem definida que é despoletada pela activação do TNF-R1, um “death receptor” da superfície celular, cuja sinalização está ligada à activação de caspases. Também foi demonstrado que os compostos de vitamina D potenciam a apoptose induzida pela adriamicina e pelo taxol, assim como pela radiação [166-168]. Outro mecanismo de apoptose mediado pela 1,25(OH)₂D no cancro epitelial do ovário foi proposto [169], no qual a 1,25(OH)₂D desestabiliza o ARNm da transcriptase inversa da telomerase (telomerase reverse transcriptase – TERT), induzindo assim a apoptose pela diminuição da actividade da telomerase.

Em relação aos efeitos anti-angiogénicos da 1,25(OH)₂D [170,171], verificou-se que a formação de tubos de células endoteliais e o crescimento tumoral induzidos pelo Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) são inibidos *in vivo* pela administração de 1,25(OH)₂D [172]. Observa-se uma inibição significativa da metastização em modelos de próstata e pulmão tratados com 1,25(OH)₂D e estes efeitos podem ser, em parte, devidos às acções anti-angiogénicas [29,32]. Em células endoteliais derivadas de tumor (TDECs), a 1,25(OH)₂D induz a apoptose e a paragem do ciclo celular, tendo sido demonstrado que as TDECs podem ser mais sensíveis à vitamina devido ao silenciamento epigenético do CYP24A1 [170,173].

Algumas células mamárias transformadas apresentam sensibilidade diminuída à 1,25(OH)₂D, sugerindo que estas células desenvolvem mecanismos de resistência à acção da vitamina D. Vários mecanismos foram identificados, incluindo perda da expressão do VDR, alteração do co-reguladores transcripcionais e sobreexpressão de CYP24 [174-176]. Linhas celulares de cancro da mama foram seleccionadas pela sua resistência à 1,25(OH)₂D *in vitro* e verificou-se que estas células retinham expressão do VDR mas exibiam alterações na expressão de proteínas que favorecem a sinalização no sentido de crescimento autónomo e que diminuem as vias de apoptose [177].

3.6. Subtipos Moleculares de Cancro da Mama

Os cancros que se desenvolvem na mama representam um grupo heterogéneo de tumores, de subtipos biológicos distintos, tendo sido demonstrado serem diferentes em termos de resposta à terapêutica e prognóstico. Através da elaboração de perfis de expressão genética, utilizando microarrays ADN, foram identificados cinco subtipos moleculares de cancro da mama, luminal A, luminal B, normal breast-like, HER2+/RE- (human epidermal growth factor receptor 2+ / receptores de estrogénios-) e basal-like, estando os dois últimos associados a mau prognóstico [36-38]. Temos dois subtipos de tumores com receptores de estrogénios negativos, o basal-like e o HER2+/RE -, e pelo menos dois tipos de tumores com receptores de estrogénios positivos, o luminal A e o luminal B [36,37].

Os tumores basal-like tipicamente demonstram baixa expressão de RE e HER2 e exibem alta expressão de genes característicos da camada celular epitelial basal, como as citoqueratinas 5, 6 e 17 [178]. Os tumores HER2+ estão representados em dois grupos distintos: os que são RE negativos, o subtipo HER2+/RE-, e os que são RE positivos, o subtipo luminal B [36,37]. Um dos propósitos da investigação pré-clínica e clínica sobre o comportamento dos diferentes subtipos moleculares é a obtenção de tratamentos dirigidos, específicos para cada subgrupo, como, por exemplo, o tratamento dos tumores com receptores de estrogénios positivos com tamoxifeno, inibidores da aromatase ou agonistas da gonadotropin – releasing hormone, ou o tratamento dos tumores da mama que expressam HER2 com o anticorpo monoclonal transtuzumab.

Dado que não é praticável realizar estudos de microarrays de forma corrente, foram estabelecidos perfis imunohistoquímicos que se correlacionam com os padrões de expressão genética [179, 180]. Num desses estudos [179], os tumores foram categorizados em subtipo luminal (ER+ e HER2-), subtipo HER2+ e subtipo basal-like (RE-, HER2- e positivos para citoqueratinas 5 e 6 e/ou EGFR). O termo triplo-negativo refere-se a tumores que não expressam receptores de estrogénio e progesterona nem

HER2, constituindo 10 a 15 % dos câncros da mama. Como um grupo, os câncros basal-like correspondem à maioria (70 a 85%, dependendo dos autores) do subgrupo triplo-negativo [36, 181, 182]. Alguns autores consideram mesmo serem os tumores triplo-negativos o mesmo grupo de tumores que são definidos como subtipo basal-like [183], tendo obtido 91% de correspondência entre as duas entidades no estudo que realizaram. Entretanto, estes achados são controversos [184]. Há uma heterogeneidade significativa e uma sobreposição considerável entre o subgrupo triplo-negativo (definido por critérios imunohistoquímicos) e o subgrupo basal-like (definido por estudos de microarrays); há câncros basal-like que expressam receptores de estrogénios ou HER2 e há câncros triplo-negativos que podem ter perfis de expressão genética do subtipo normal breast-like [178,179,185].

3.6.1. Factores de risco e características clínicas dos subtipos moleculares de tumores mamários

Os tumores triplo-negativos têm sido caracterizados por vários factores clínico-patológicos agressivos, como, por exemplo, aparecimento em idades mais jovens, tumores de maior tamanho e com menor diferenciação. Num estudo populacional do California Cancer Registry [186], em mais de 50000 mulheres, 12,5% foram identificadas como apresentando tumor triplo-negativo. Estas doentes eram significativamente mais prováveis de ter menos de 40 anos e de serem de raça negra. Independentemente do estadió ao diagnóstico, as doentes com tumores triplo-negativo apresentaram pior sobrevivência e as mulheres de raça negra com tumores triplo-negativos em estadió avançado tiveram o pior prognóstico, com uma sobrevivência aos 5 anos de apenas 14%. A relação entre este tipo de tumores e a raça tem sido demonstrada em vários estudos. No Carolina Breast Cancer Study [180] de aproximadamente 500 câncros da mama, os tumores basal-like eram significativamente mais frequentes em mulheres americanas de origem africana do que nas outras (26% versus 16%) e nas pré-menopausicas em relação às pós-menopausicas (24% versus 15%).

Vários estudos epidemiológicos permitiram conhecer alguns factores de risco associados aos vários subtipos de câncros da mama. Uma nova avaliação de 1400 casos de cancro da mama do Carolina Breast Cancer Study [187] revelou que, comparados aos tumores luminal A (RE + e/ou RP + e HER2 -), os tumores basal-like eram mais prováveis de aparecer em mulheres com menarca mais precoce, maior paridade, idade mais jovem na primeira gravidez a termo, menor duração da amamentação e maior índice de massa corporal, especialmente, entre as doentes pré-menopausicas. Noutro estudo [39], verificou-se que os tumores basal-like estavam relacionados com a menarca precoce (com uma marcada redução do risco com o aumento da idade da menarca) e com um alto índice de massa corporal entre as mulheres pré-menopausicas (nas mulheres pré-menopausicas, um maior índice de massa corporal estava associado a um risco reduzido de tumores do tipo luminal mas não do tipo basal), enquanto que os tumores luminal A estavam associados a primiparidade tardia. Parece que os factores de risco do cancro da mama variam de acordo com o subtipo de tumor.

Em relação às características clínicas e história natural, há evidências crescentes que indicam que o tumor triplo-negativo apresenta um comportamento clínico diferente dos outros tipos, mais agressivo, com um risco de recorrência e morte superior. Os tumores

basal-like e HER2 + são mais vezes pouco diferenciados quando comparados com os luminais, sendo a sobreexpressão de HER2 factor de mau prognóstico [39]. O tipo luminal A apresenta o melhor prognóstico [36, 37]. Foi publicado um estudo [40] com 1601 doentes com cancro da mama, dos quais, 180 (11,2%) eram triplo-negativos, tendo sido concluído que, nestes, a idade média ao diagnóstico era mais baixa, mais frequentemente apresentavam gânglios positivos, apresentavam maior probabilidade de recorrência à distância e morte e o padrão de recorrência à distância era diferente do dos outros tipos de cancro da mama (o risco de recidiva apresentava um pico aos 3 anos do diagnóstico e depois declinava rapidamente, enquanto que nos outros tipos o risco de recorrência é constante ao longo do tempo). Além do padrão distinto da altura da recorrência, tem sido reconhecido que o tumor triplo-negativo apresenta padrões únicos de local de recidiva, predominando as metástases viscerais mais agressivas, sendo menos frequentes as metástases ósseas. Num estudo recente [41], as metástases ósseas ocorreram mais frequentemente nos subtipos luminais e menos nos fenótipos basal-like, ao contrário das metástases pulmonares, que foram mais frequentes nos basal-like. Também se verificou uma predilecção pelo cérebro como local de recidiva entre os tumores triplo-negativos. A incidência aumentada de metástases cerebrais nas doentes com tumores HER2 positivos está também bem documentada. Estudos recentes evidenciaram a frequência e agressividade das metástases cerebrais no cancro triplo-negativo, com um estudo a revelar ser o estado triplo-negativo o maior factor de risco para o desenvolvimento deste tipo de recidiva, sendo superior ao estado HER2 positivo [42].

CAPÍTULO 4. METODOLOGIA

4.1. População

A população do estudo consistiu nas doentes admitidas na Consulta de Grupo Oncológico de Mama da Unidade de Senologia do Hospital de São Marcos com o diagnóstico de cancro da mama, durante o período de um ano, entre 1 de Setembro de 2008 e 31 de Agosto de 2009. Foram incluídas 87 doentes de um modo prospectivo, com um total de 88 cancros da mama (uma das doentes apresentou tumor bilateral síncrono com dois tumores histologicamente distintos). Estas doentes tiveram diagnóstico comprovado por exame histopatológico de carcinoma invasivo da mama e não tinham sido ainda submetidas a qualquer tratamento.

O projecto foi aprovado pela Comissão de Ética Hospitalar do Hospital de São Marcos; todas as doentes foram elucidadas sobre o estudo e concordaram em participar, assinando o termo de consentimento informado.

4.2. Recolha e Tratamento de Dados

Foi obtida informação a partir do processo clínico, ou por inquérito às doentes, acerca da idade, idade da menarca, paridade, amamentação, idade da menopausa, uso de contraceptivos orais ou de terapêutica hormonal de substituição, antecedentes pessoais e antecedentes familiares de doença oncológica.

A colheita das amostras do sangue periférico foi realizada após o diagnóstico de cancro da mama, estabelecido histologicamente por biópsia de agulha grossa, e antes da realização de qualquer tratamento. Foram obtidos 10 ml de sangue periférico que foi centrifugado, sendo o soro e o plasma armazenados em congelador a -20°C até ao momento do doseamento sérico da vitamina D. Foi devidamente registado o mês da colheita.

As determinações da 25(OH)D foram realizadas de uma só vez, no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São Marcos. Para a determinação quantitativa da 25(OH)D, foi utilizada a técnica de imunoensaio de electroquimioluminescência Elecsys, no soro das doentes (Roche Elecsys Systems, Mannheim, Germany). O método consiste num ensaio competitivo, no qual a DBP (vitamina D - binding protein) é inactivada durante a incubação e é usado um anticorpo policlonal dirigido à 25(OH)D, permitindo a sua detecção num analisador de imunoensaio. O analisador usado foi o Cobas e 411, Roche Diagnostics Systems. O ensaio dura cerca de 18 minutos e apresenta um domínio de detecção de 4 a 100 ng/ml. A concentração final de 25(OH)D no soro foi expressa em ng/ml.

A avaliação do fenótipo tumoral foi obtida a partir dos registos do resultado anatómico-patológico da biópsia com agulha grossa ou da peça operatória. A expressão dos receptores hormonais e de Ki67 foi avaliada por imunohistoquímica (IHQ). Os blocos de parafina foram desparafinizados, rehidratados e sujeitos a incubação em panela de pressão em solução de ácido cítrico a pH 6 durante 9 minutos, para recuperação dos

epitopos. Em seguida, foram incubados com os anticorpos para os receptores de estrogénios (clone 1D5, 1:50, Dako), para os receptores de progesterona (clone 1A6, 1:10, Dako) e para o Ki67 (clone MIB-5, 1:50, Dako). A localização dos anticorpos foi realizada usando o método de streptavidina biotina. A expressão dos receptores foi considerada positiva quando mais de 10% das células coraram. Considerou-se tumor com alta expressão de Ki67 quando a marcação pela IHQ ocorreu em pelo menos 25% das células (para um mínimo de 500 células avaliadas) e o tumor com menos de 25% de células coradas para o Ki67 foi considerado como tumor com baixa expressão de Ki67. A expressão de HER2 foi analisada por IHQ usando o anticorpo anti-HER2 (clone CB11, 1:40, Novocastra), após recuperação dos epitopos. O HER2 foi considerado positivo com imunoreactividade 3+ (reactividade forte difusa em mais de 30% das células tumorais) ou por amplificação por FISH (fluorescence in situ hybridization). Todos os casos 2+ por IHQ foram confirmados por FISH. Um resultado de FISH equívoco (ratio 1,8-2,2) foi considerado como negativo para HER2. Considerou-se a expressão de RE, RP e HER2 e classificaram-se os tumores de acordo com: RE+ e/ou RP+, tumores do tipo luminal; RE-, RP- e HER2+, tumores com sobreexpressão HER2; RE-, RP- e HER-, tumores do tipo triplo-negativo. Foram também considerados o grau de diferenciação tumoral, o tamanho do tumor e a presença ou não de metástases ganglionares.

4.3. Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada a análise descritiva da população, estratificada em três grupos de doentes (subtipos de cancro da mama) que foram caracterizados através do cálculo da média, mediana e desvio padrão e através do cálculo da frequência de características clínico-patológicas relevantes. Em relação à variável dependente da investigação, foi realizada a análise da normalidade e da homogeneidade da amostra, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente, e foi feita a análise da assimetria e achatamento da distribuição, através dos testes de Skewness e de Kurtosis respectivamente. Foi considerado que quando estes valores não estão compreendidos entre -1 e 1, violam a normalidade.

Para a análise inferencial, quando foi testada a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os subtipos de cancro da mama em relação às características clinico-patológicas, foi usado o teste estatístico de análise de variância One-way ANOVA para as variáveis contínuas e o teste do Qui Quadrado ou o teste de Fisher para as variáveis nominais. Para testar a existência de diferenças entre os subtipos em relação à variável dependente (níveis de vitamina D), foi usado o teste One-way-ANOVA. De modo a verificar quais as diferenças que se estabeleciam entre os grupos das variáveis independentes estudadas, foi utilizado o teste estatístico *post-hoc* de Holm-Sidack. Para testar os níveis de vitamina D em relação às características patológicas do tumor, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney em dois grupos independentes, e foi usado o teste estatístico de análise de variância One-way ANOVA em três ou mais grupos independentes. O nível de significância foi mantido em 5% para todos os procedimentos estatísticos realizados ($p < 0,05$). Todos os testes foram realizados utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 17.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Análise Descritiva

Foram obtidos os níveis séricos de 25(OH)D correspondentes a 88 cânceros da mama diagnosticados no período de um ano na Unidade de Senologia do Hospital de São Marcos. A idade mediana da população foi de 58 anos, com um mínimo de 19 e um máximo de 84 (DP 14,4), sendo 34,52 % das doentes pré-menopausicas e 65,48 % pós-menopausicas.

Do total de tumores, 63 (72%) foram classificados como tumores do subtipo luminal, 18 (20%) como tumores com sobreexpressão HER2 (HER2) e 7 (8%) como tumores do subtipo triplo-negativo (TN) (Fig. 6).

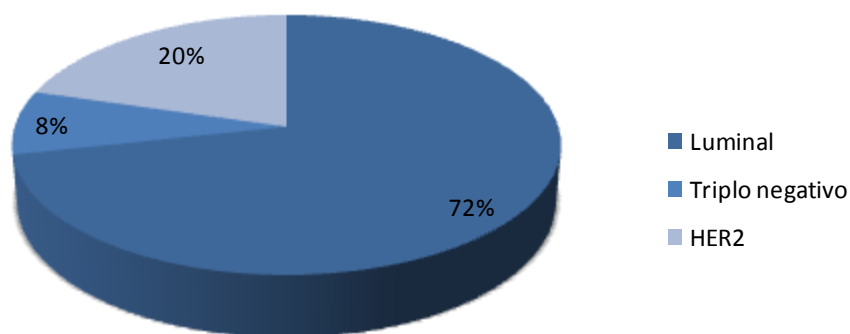


Figura 6. Classificação molecular dos tumores mamários

Nos diversos subtipos tumorais, foi calculada a mediana da idade das doentes, da idade da menarca, da idade da menopausa e a média da paridade. A diferença entre os valores nos grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,78; 0,84; 0,97; 0,26$, respectivamente) (Tabela 1).

	Luminal	Triplo Negativo	Her2	<i>p</i>
Idade	58,0 (19-83)	64,0 (38-79)	57,5 (32-84)	ns
Menarca	13,0 (11-19)	13,5 (11-17)	13,0 (11-18)	ns
Menopausa	50,0 (38-57)	51,0 (42-53)	49,5 (39-56)	ns
Paridade	2,21±2,12 (0-10)	3,29±3,25 (0-10)	3,31±3,32 (0-11)	ns

Tabela 1. Características gerais dos grupos em estudo: mediana, valor máximo e mínimo (excepto, paridade: média ± DP, valor máximo e mínimo)

Em relação ao estado da menopausa, 63,3%, 71,4% e 70,6% eram pós-menopausicas nos grupos luminal, TN e HER2, respectivamente (Fig. 7).

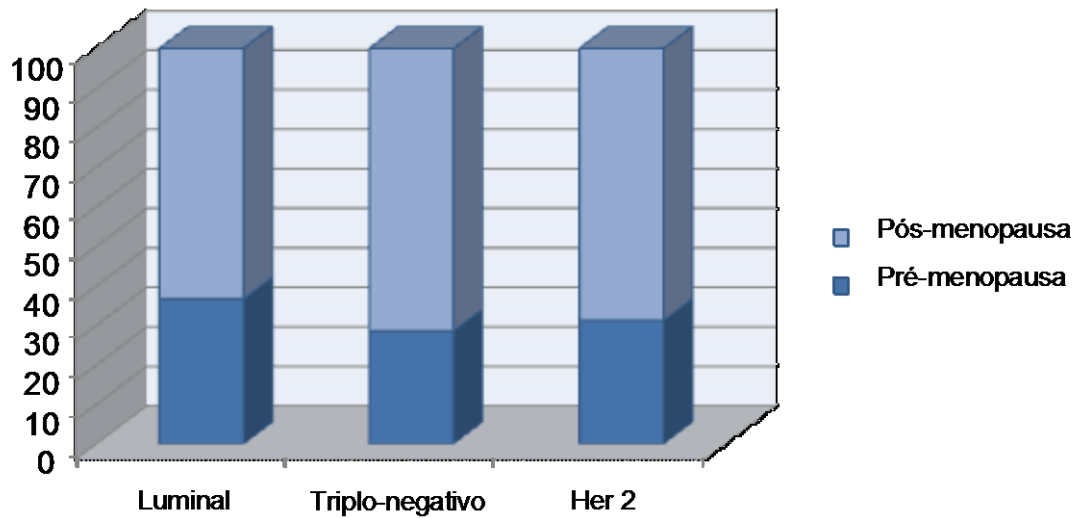


Figura 7. Estado da menopausa nos subtipos moleculares de cancro da mama

O uso de contraceptivos orais (CO) foi verificado em 16 doentes do grupo luminal (35,6%), em 3 doentes do grupo TN (60%) e em 6 doentes do grupo HER2 (42,9%), com uma média de duração do uso de 10,29 anos (Fig. 8).

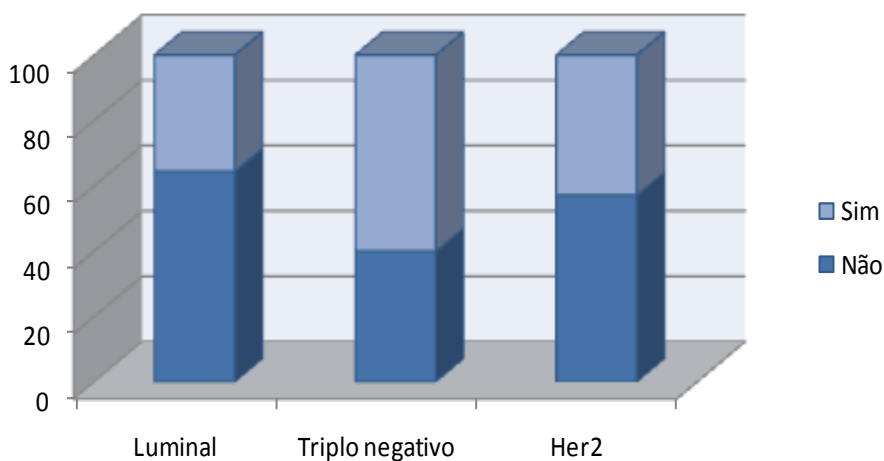


Figura 8. Uso de contraceptivos orais nos subtipos moleculares de cancro da mama

Cinco doentes (7,9%) referiram o uso de terapêutica hormonal de substituição (THS) no grupo de tumores luminais, 2 doentes (28,6%) no grupo TN e uma doente (5,6%) no grupo de tumores HER2 (Fig. 9). Não foi possível obter informação fiável em relação ao uso de THS em 9, 0 e 5 doentes, respectivamente nos grupos referidos, por desconhecimento das doentes. A média de duração do uso de THS foi de 6,16 anos.

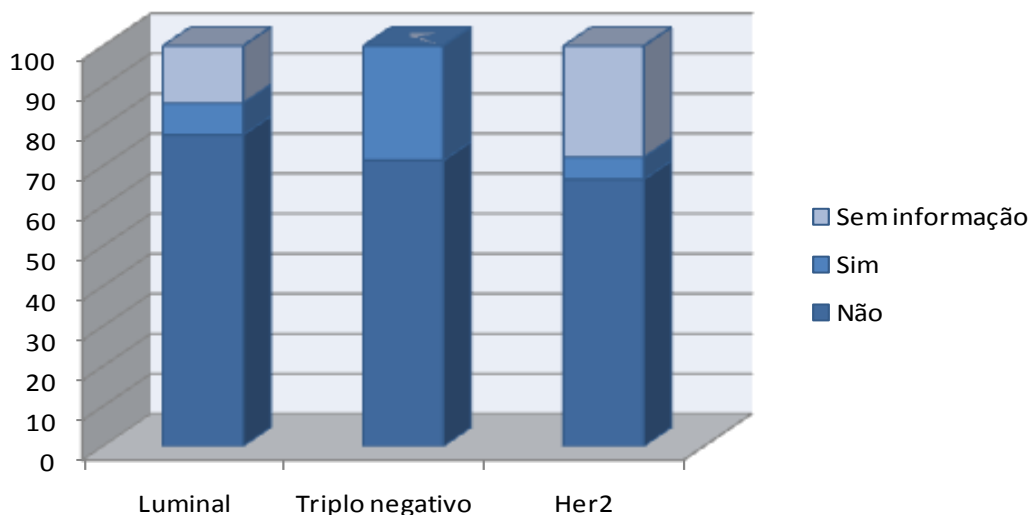


Figura 9. Uso de terapêutica hormonal de substituição nos subtipos moleculares de cancro da mama

No presente estudo, verificou-se que 29 (61,7%), 5 (83,3%) e 11 (78,6%) doentes apresentaram antecedentes de amamentação nos grupos luminal, TN e HER2, respectivamente (Fig. 10). A média de duração da amamentação de 11,45 meses.

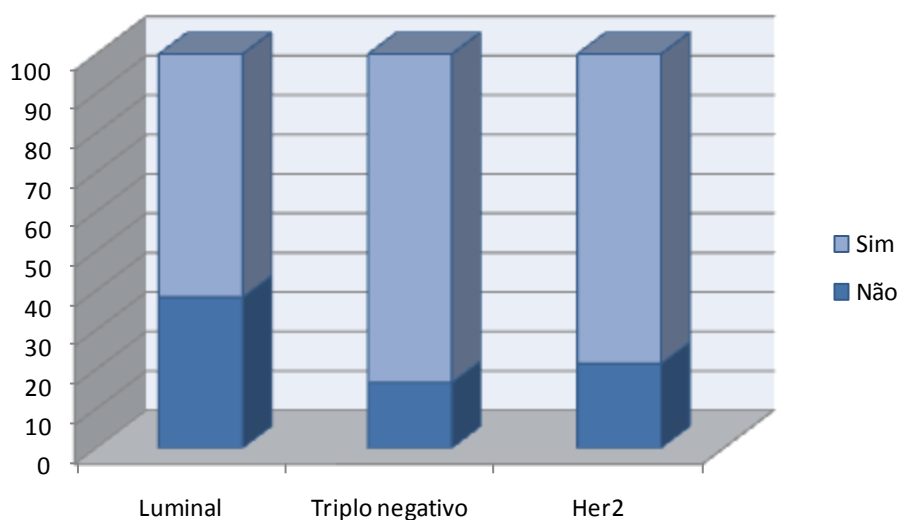


Figura 10. Antecedentes de amamentação nos subtipos moleculares de cancro da mama

Em relação aos antecedentes pessoais de cancro, 3 doentes apresentaram história de cancro da mama, duas no subgrupo luminal e uma no subgrupo HER2. Uma doente do subgrupo HER2 apresentou antecedentes de carcinoma gástrico. As doentes com antecedentes familiares de cancro corresponderam a 21,6% do total. Seis doentes referiram antecedentes familiares múltiplos de cancro, 3 no subgrupo luminal e 3 no subgrupo HER2. Treze doentes apresentaram história familiar de cancro da mama, correspondendo a 14,7% do total de doentes do estudo e a 56,5% do total de doentes com antecedentes familiares de cancro. Destas 13 doentes, 6 referiram cancro da mama em familiares do 1º grau (mãe, irmã e filha), três no subgrupo luminal, dois no subgrupo HER2 e uma no subgrupo TN. Tumores com outra localização foram referidos por 11,4% das doentes, correspondendo a 43,5% do total de doentes com antecedentes familiares de cancro. As localizações mais frequentes foram o cólon (3 doentes), o corpo uterino (2 doentes) e o pulmão (2 doentes).

5.2 Análise das Características Patológicas do Tumor nos Subtipos de Cancro da Mama

Nenhum dos tumores dos subtipos TN e HER2 apresentou grau histológico de diferenciação 1, enquanto este foi observado em 23,8% dos tumores do tipo luminal. O grau histológico de diferenciação 2 foi observado em 36 tumores luminais (57,1%), num tumor triplo negativo (14,3%) e em 7 tumores HER2 (43,8%). O grau de diferenciação histológico 3 foi mais frequente nos tumores dos subtipos TN e HER2 (85,7% e 56,2%, respectivamente) do que no tumores do subtipo luminal (19%) (Fig. 11), sendo a diferença estatisticamente significativa.

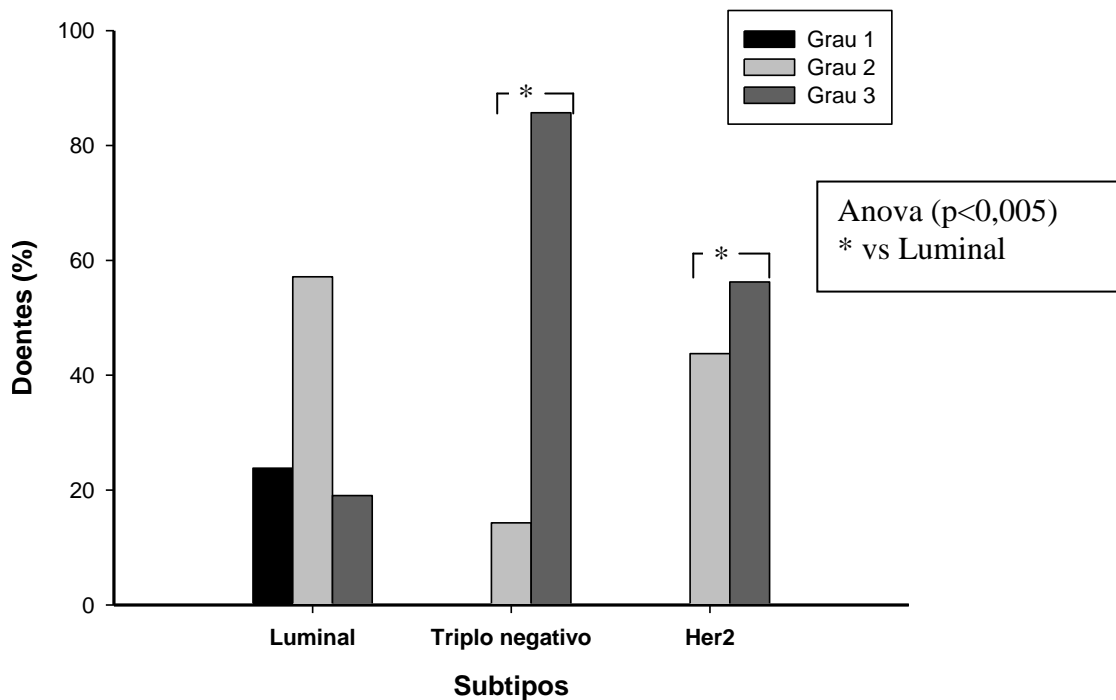


Figura 11. Distribuição do grau tumoral nos subtipos moleculares de cancro da mama

Quando se analisou o índice de proliferação do tumor, através da expressão de Ki67, verificou-se que 100% dos tumores TN apresentaram Ki67 alto, assim como 88,2% dos tumores HER2 e 55,9% dos tumores luminais. Quando foi testada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os subtipos de cancro da mama em relação à expressão de Ki67, verificou-se existirem essas diferenças entre o grupo dos tumores luminais e os outros dois grupos. A diferença entre o grupo dos tumores TN e o grupo dos tumores HER2 não foi estatisticamente significativa a um nível de significância de 5% (Fig. 12).

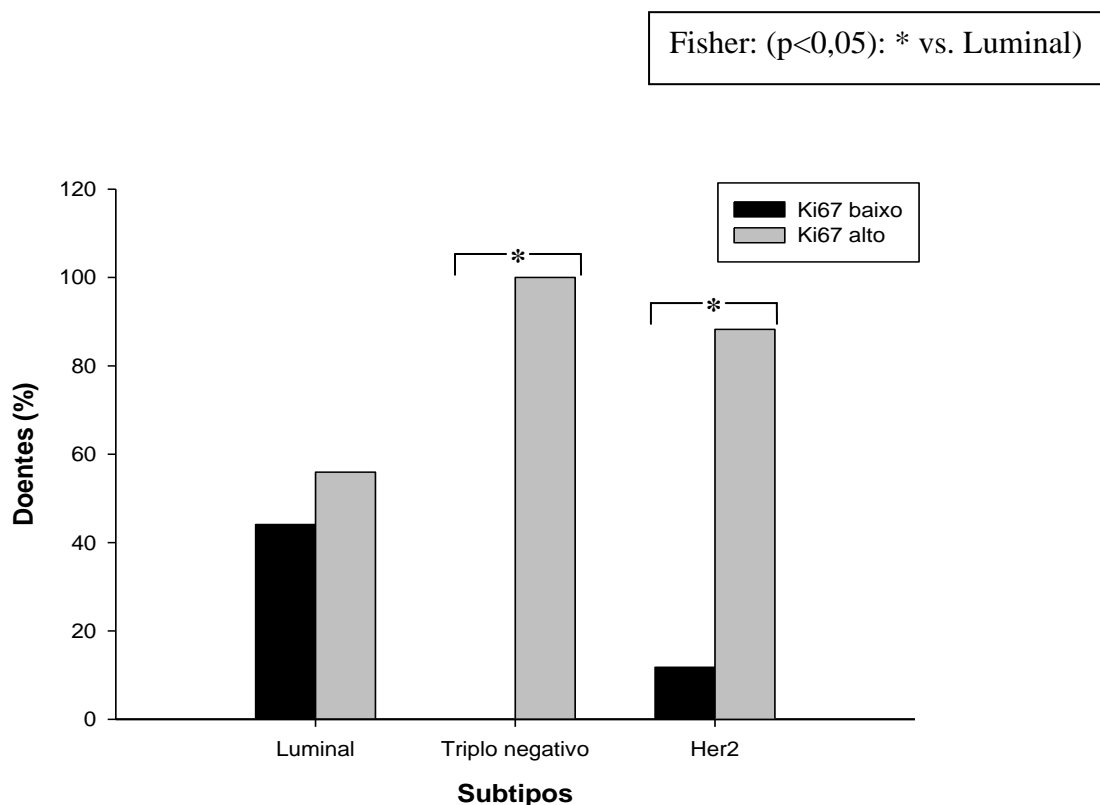


Figura 12. Distribuição do nível de expressão de Ki67 nos subtipos moleculares de cancro da mama

Tumores com dimensões iguais ou superiores a 2 cm ($T \geq 2$ cm) foram observados em 50,8% dos tumores do tipo luminal, em 42,9% dos tumores TN e em 38,9% dos tumores HER2 (Fig. 13). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. As doentes submetidas a quimioterapia primária, prévia à cirurgia, não foram incluídas na avaliação do tamanho do tumor nem na avaliação da presença de metástases ganglionares, dada a influência do tratamento nestas características. São um grupo de doentes com estadios clínicos avançados, constituído por 2 doentes do grupo luminal (3,2%), 1 doente do grupo TN (14,3%) e 5 doentes do grupo HER2 (27,7%).

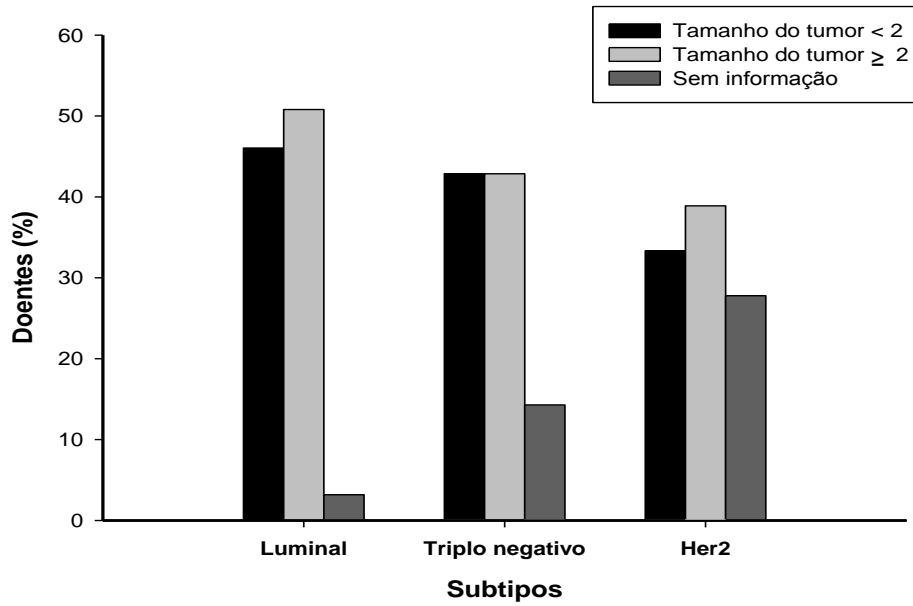


Figura 13. Distribuição do tamanho do tumor nos subtipos moleculares de cancro da mama. Sem informação: doentes submetidas a quimioterapia primária.

Quando se analisou o estado dos gânglios axilares, verificou-se a existência de metástases ganglionares em 32 doentes (50,8%) do grupo luminal, em 3 doentes (42,9%) do grupo TN e em 8 doentes (44,4%) do grupo HER2 (Fig. 14). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a este parâmetro. Como já referido, as doentes submetidas a quimioterapia primária, prévia à cirurgia, não foram incluídas nesta avaliação.

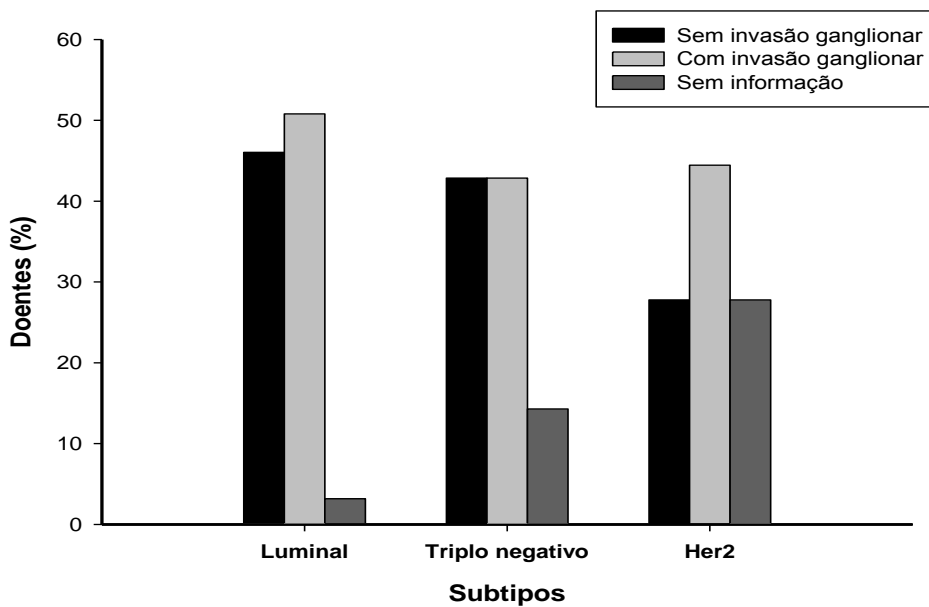


Figura 14. Distribuição do estado ganglionar nos subtipos moleculares de cancro da mama. Sem informação: doentes submetidas a quimioterapia primária.

5.3 Análise da Relação dos Níveis Séricos de 25-hidroxivitamina D com os Subtipos de Cancro da Mama e com as Características Patológicas do Tumor

Foi realizado o cálculo da média e desvio padrão dos níveis séricos de 25(OH)D nos vários subtipos tumorais: o subtipo luminal apresentou um nível sérico médio de 25,0 ng/ml \pm 5,49, o subtipo TN um nível de 24,62 ng/ml \pm 6,47 e o subtipo HER2 um nível de 30,52 ng/ml \pm 7,96. O teste de análise de variância revelou que os grupos são diferentes entre si a um nível de significância de 0,004. O teste *post-hoc* de Holm-Sidack demonstrou que existe uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo do subtipo HER2 e o grupo luminal ($p=0,008$) e que existe uma tendência para haver diferença entre o grupo do subtipo HER2 e o grupo do subtipo TN ($p=0,07$). Não existe diferença nos níveis de 25(OH)D entre os grupos luminal e TN (Fig. 15).

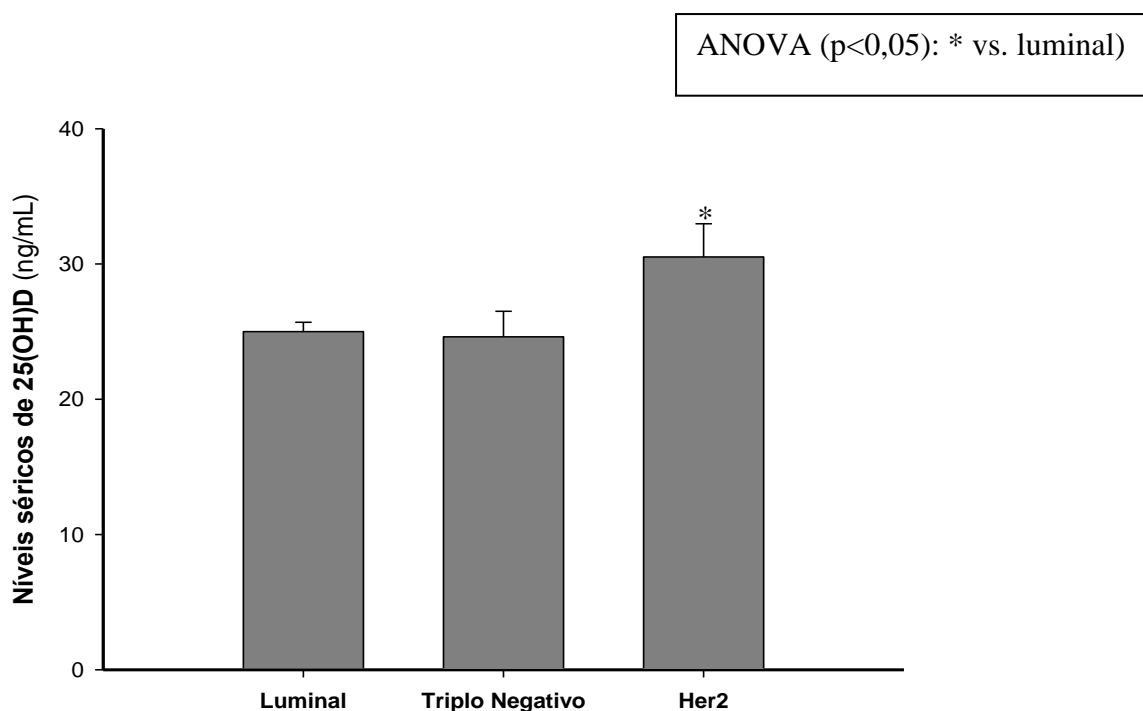


Figura 15. Níveis séricos de 25(OH)D nos subtipos moleculares de cancro da mama (média \pm erro padrão).

Foram considerados níveis inferiores a 21 ng/ml como deficientes, níveis compreendidos entre 21 e 29 ng/ml como insuficiência relativa e níveis superiores a 29 ng/ml como adequados. Com base nestes valores de referência, foi calculada a frequência de doentes com níveis séricos deficientes e com níveis de insuficiência relativa de 25(OH)D, e verificou-se que 23,8% do grupo luminal, 28,6% do grupo TN e 5,6% do grupo HER2 apresentaram níveis séricos de 25(OH)D deficientes e que 81%, 71,4% e 50% apresentaram níveis de insuficiência relativa respectivamente nos grupos

luminal, TN e HER2. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa (Fig.16).

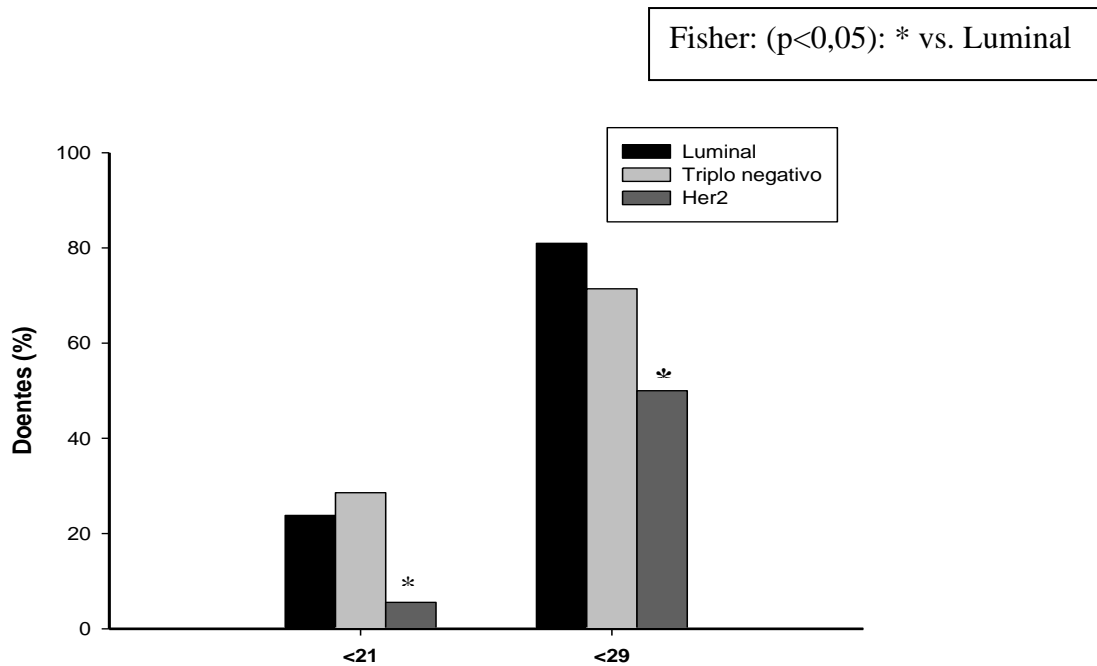


Figura 16. Níveis séricos de deficiência (< 21) e de insuficiência relativa (\leq 29) de 25(OH)D (ng/ml) nos subtipos moleculares de cancro da mama.

Não há diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos de 25(OH)D entre os tumores com grau histológico 1, 2 e 3, cujo valor médio é, respectivamente, 23,9 ng/ml, 25,7 ng/ml e 27,9 ng/ml (Fig 17).

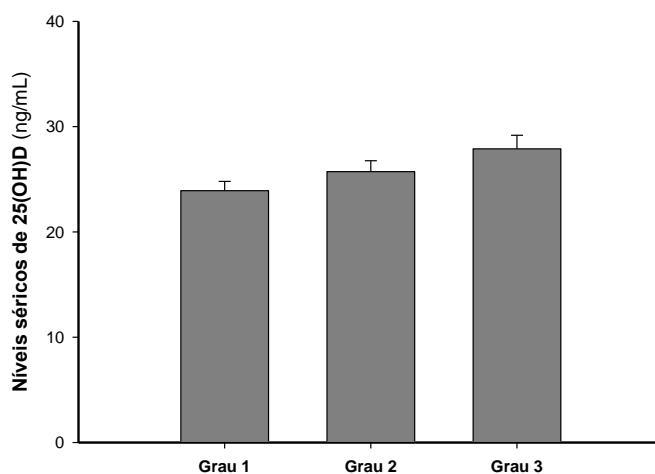


Figura 17. Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o grau histológico. (média \pm erro padrão).

Em relação à expressão de Ki67, verificou-se um nível médio de 25(OH)D de 23,9 ng/dl nos tumores com expressão baixa de Ki67 e de 25,7 ng/ml nos tumores com expressão alta. A diferença é estatisticamente significativa ($p=0,02$) (Fig. 18).

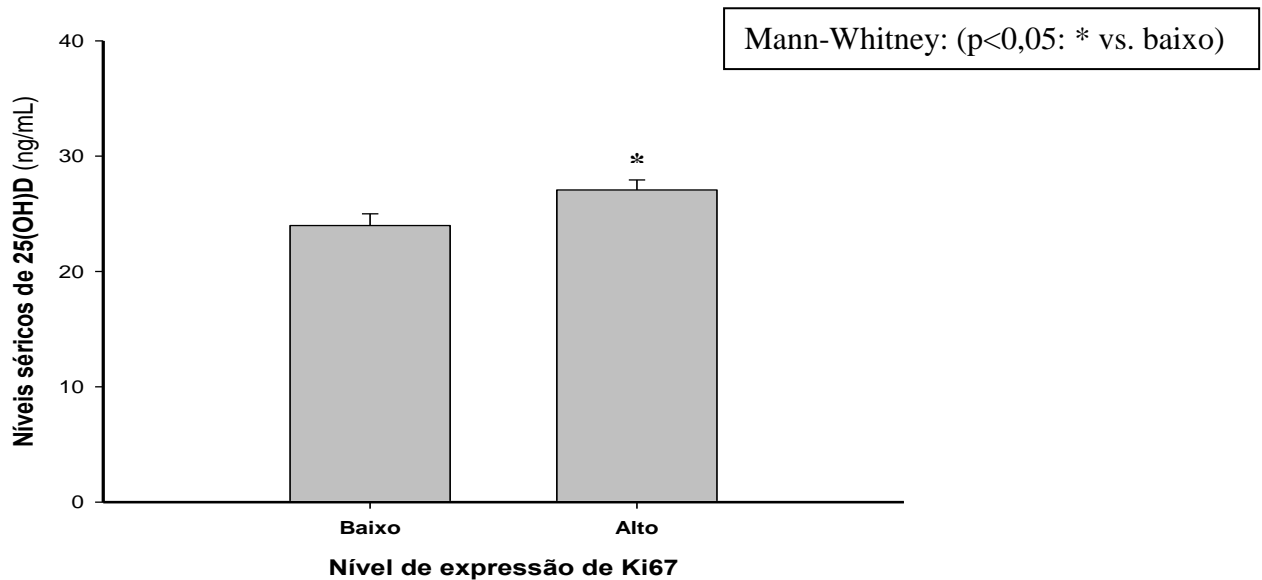


Figura 18. Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o nível de expressão de Ki67 (média \pm erro padrão).

Quando se testou a existência de diferenças nos níveis de 25(OH)D entre tumores com dimensões inferiores a 2 cm e tumores com tamanho igual ou superior a 2 cm, verificou-se que a diferença não era estatisticamente significativa (Fig. 19), sendo a média do valor de 25(OH)D de 24,9 ng/ml e 26,7 ng/ml, respectivamente.

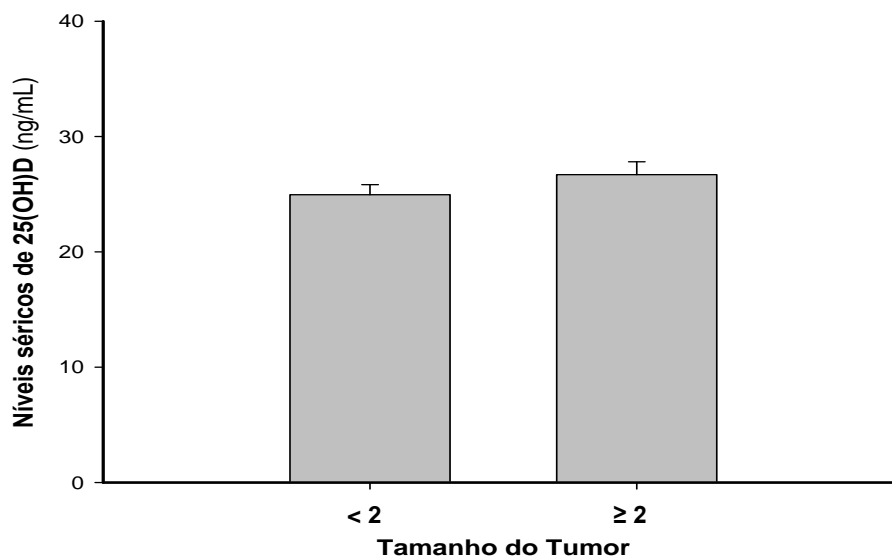


Figura 19. Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o tamanho do tumor (cm) (média \pm erro padrão).

O nível médio de 25(OH)D foi de 26,5 ng/ml e de 25,3 ng/ml, na ausência e na presença de metástases ganglionares, respectivamente. A diferença não é estatisticamente significativa (Fig. 20).

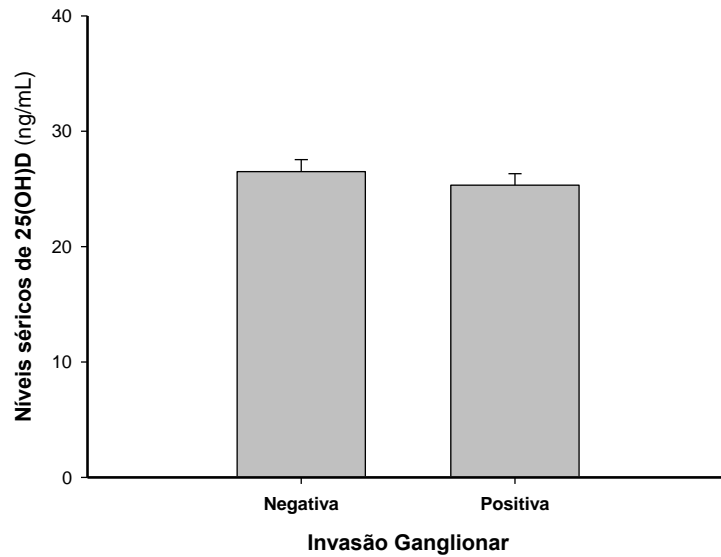


Figura 20. Relação entre os níveis séricos de 25(OH)D e a invasão ganglionar (média \pm erro padrão).

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO

O cancro da mama não é mais visto como uma entidade única, mas sim como uma doença multifacetada, composta por vários subtipos biológicos distintos com uma história natural própria e com um espectro variado de características clínicas e patológicas, com diferentes implicações terapêuticas e prognósticas [36-38]. Estes subtipos podem ser categorizados em tumores que expressam receptores de estrogénios (RE) e/ou receptores de progesterona (RP) (subtipo luminal) e em tumores que não expressam esse receptores, sendo estes últimos subdivididos, de acordo com a expressão de HER2, em tumores do subtipo triplo-negativo (RE, RP e HER2 negativos) e em tumores do subtipo com sobreexpressão de HER2 (RE e RP negativos e HER2 positivo) [179]. Neste trabalho, do total de tumores, 63 (72%) foram classificados como tumores do subtipo luminal, 18 (20%) como tumores com sobreexpressão HER2 (HER2 positivo) e 7 (8%) como tumores do subtipo triplo-negativo (TN).

Os tumores do subtipo TN e do subtipo HER2 positivo apresentam comportamentos clínicos diferentes dos tumores do subtipo luminal, sendo mais frequentemente tumores pouco diferenciados, diagnosticados em estadios clínicos mais avançados e apresentando maior probabilidade de recorrência à distância e morte [39-42]. O presente estudo confirmou essa diversidade biológica do cancro da mama, revelando associações com significado estatístico entre certas características patológicas do tumor e os diferentes subtipos moleculares de cancro da mama. Os tumores do subtipo TN e do subtipo HER2 positivo foram mais frequentemente de alto grau histológico e apresentaram maior índice de proliferação em relação aos tumores do subtipo luminal. Em relação ao tamanho do tumor e ao estado dos gânglios axilares, não se verificou nenhuma associação com significado estatístico com nenhum dos subtipos de cancro da mama, mas convém realçar que 14,3% das doentes com tumores TN e 27,7% das doentes com tumores HER2 positivo não foram incluídas nesta avaliação por apresentarem estadios clínicos avançados (nomeadamente, tumores de grande tamanho, tumores inflamatórios e/ou tumores com metástases ganglionares) e terem sido submetidas a quimioterapia neoadjuvante, o que altera as características destas variáveis na peça operatória.

O objectivo principal do estudo foi verificar se existia diferença entre os subtipos de cancro da mama em relação aos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, o marcador do status corporal de vitamina D. Numerosos estudos epidemiológicos relacionam a deficiência de vitamina D com vários tipos de cancro, incluindo o cancro da mama [8-18]. Neste trabalho, verificou-se uma elevada prevalência de níveis insuficientes ou deficientes de vitamina D nas doentes com cancro da mama, particularmente nos subtipos luminal e TN. Consideraram-se níveis inferiores a 21 ng/ml como deficientes, níveis compreendidos entre 21 e 29 ng/ml como insuficiência relativa e níveis superiores a 29 ng/ml como adequados [35,55,56], e, com base nestes valores de referência, verificou-se que 23,8% do grupo luminal, 28,6% do grupo TN e 5,6% do grupo HER positivo apresentavam níveis séricos de 25(OH)D deficientes e que 81%, 71,4% e 50% apresentavam níveis de insuficiência relativa respectivamente nos grupos luminal, TN e HER2 positivo. No cancro da mama, estudos recentes demonstraram que níveis deficientes de vitamina D se associam a tumores com menor diferenciação, com maior taxa de metastização e de recorrência à distância e sobrevivência menor

[35,10,11,17,18]. Os tumores do tipo triplo-negativo assim como os tumores com sobreexpressão HER2 são tumores muito agressivos com menor taxa de sobrevivência, logo, seria de esperar uma associação entre estes subtipos de tumor e níveis deficientes de vitamina D. Isso não se verificou neste estudo. Não houve diferença estatisticamente significativa no nível médio de 25(OH)D entre os subtipos luminal e TN. Inesperadamente, o grupo do subtipo HER2 positivo apresentou níveis séricos de 25(OH)D superiores em relação aos outros grupos. A diferença em relação ao subtipo luminal foi estatisticamente significativa e o estudo mostrou uma tendência para existir também diferença em relação ao subtipo TN. O estudo revelou que, no subtipo HER2 positivo, apenas 5,6% das doentes apresentaram níveis deficientes de 25(OH)D e apenas 50% apresentaram uma insuficiência relativa.

Estes resultados levantam novas questões. Pode-se especular que existe, neste tipo de tumores do subtipo HER2 positivo, algum mecanismo de resistência nas células tumorais contra as ações anti-neoplásicas da vitamina D. Poderá existir algum tipo de bloqueio na entrada da vitamina na célula ou poderá haver algum tipo de inibição da bioativação local da vitamina. Dessa forma, este tipo de tumores poderá desenvolver-se em indivíduos com níveis normais de vitamina D. Foi demonstrado que algumas linhas celulares do cancro da mama apresentam sensibilidade diminuída aos efeitos anti-neoplásicos da vitamina D [174-177], tendo esta sensibilidade reduzida sido relacionada com alterações nas enzimas do metabolismo da vitamina D ou com alterações na expressão ou função do VDR. Num desses estudos [174], a expressão de VDR era semelhante entre as linhas celulares sensíveis e resistentes à vitamina D, mas as células sensíveis à vitamina D mostraram um aumento da actividade de ligação a um VDRE, enquanto que nas células resistentes não foi observada activação do VDRE em resposta à 1,25(OH)₂D₃. Outro estudo sugeriu que as células resistentes às ações da vitamina D teriam um VDR funcional mas que este não estaria acoplado a uma via apoptótica funcional [176]. Um estudo mais recente [177] identificou uma série de proteínas que estavam expressas de uma forma diferente entre linhas celulares sensíveis e resistentes à vitamina D. As funções da maioria dessas proteínas alteradas estavam relacionadas com os efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos da 1,25(OH)₂D, por exemplo, proteínas envolvidas na indução da apoptose, na sinalização mitogénica e no ciclo celular. A exposição à vitamina D é um factor facilmente modificável; uma maior exposição à luz solar ou uma maior ingestão de vitamina D pode reduzir o risco de cancro da mama [65-67,72-74]. Provavelmente, nas doentes com tumores do tipo HER2 positivo, a suplementação com vitamina D ou com análogos da vitamina D não trará benefícios, ao contrário do que se pode esperar nos tumores dos subtipos luminal e TN.

Secundariamente, avaliou-se se havia diferenças nos níveis de 25-hidroxivitamina D em relação às características patológicas de mau prognóstico do tumor. Apenas se verificou existir diferença com valor estatístico no nível médio de 25(OH)D entre os tumores com expressão baixa e alta de Ki67, tendo estes últimos revelado maiores níveis de vitamina D. Isto explica-se pela elevada prevalência de tumores com alta expressão de Ki67 no subtipo HER2 positivo.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que as doentes com cancro da mama apresentam uma elevada prevalência de deficiência de vitamina D e que o cancro da mama é constituído por uma variedade de subtipos biológicos distintos com características próprias. Um dos subtipos, o HER2 positivo, apresentou-se com níveis de vitamina D superiores aos outros subtipos, podendo não ser sensível às acções anti-tumorais da vitamina D e desenvolver-se em indivíduos sem deficiência dessa vitamina. Estes resultados precisam de ser confirmados com estudos futuros, eventualmente com amostras maiores, e precisam de ser fundamentados com estudos a nível celular e molecular. Deve ser estudada, nos tecidos tumorais, a expressão das proteínas-chave envolvidas nas acções locais da vitamina D, como a 1α -hidroxilase (responsável pela bioactivação da vitamina D), a 24-hidroxilase (responsável pelo seu catabolismo), o receptor da vitamina D e as proteínas que poderão estar sob a influência da via de sinalização da vitamina D e que estão envolvidas na proliferação celular e na apoptose. É necessário estudar a expressão destas proteínas nos diferentes subtipos moleculares de cancro da mama para averiguar se algum deles apresenta um fenótipo molecular de resistência à vitamina D semelhante ao das linhas celulares de cancro da mama resistentes à vitamina D.

CAPÍTULO 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 81: 353-373, 2006.
- [2] Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 7: 439-443, 1997.
- [3] Bluyère O et al. Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin* 23(8): 193-194, 2007.
- [4] Lips P, Hosking D, Lippuner K et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med* 260: 245-254, 2006.
- [5] Holick MF, Siris ES, Binkley N et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal north american women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3215-3224, 2005.
- [6] Holick MF. Vitamin D: the under appreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 9:87-98, 2002.
- [7] Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22: 477-501, 2001.
- [8] Garland CF, Gorham ED, Mohr SB et al. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 708-711, 2007
- [9] Abbas S, Linseisen J, Slinger T et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of postmenopausal breast cancer - results of a large case-control study. *Carcinogenesis* 29: 93-99, 2008.
- [10] Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA, Bundred NJ. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D may be related inversely to disease activity in breast cancer patients with bone metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 118-122, 1997.
- [11] Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. *J Clin Pathol* 59: 1334-1336, 2006.
- [12] de Lyra EC, Katayama MH; Basso RA et al. Ki 67 tumor expression in breast cancer post-menopausal patients following calcitriol supplementation. *J Clin Oncol* 26: Abstract 14612, 2008
- [13] Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25 dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 1991-1997, 2005.
- [14] Blackmore KM, Lesosky M, Barnett H, Raboud JM, Vieth R, Knight JA. Vitamin D from dietary intake and sunlight exposure and the risk of hormone-receptor-defined breast cancer. *Am J Epidemiol* 168: 915-924, 2008.
- [15] Crew KD, Gammon MD, Steck SE, Hershman DL et al. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Cancer Prev Res* 2: 598-604, 2009.
- [16] Trukova K, Gupta D, Vashi PG et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and nutritional status: implications for vitamin D assessment and dietary supplementation in oncology. *J Clin Oncol* 27 (15 suppl): Abstract 9638, 2009.
- [17] Neuhauser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambros A, Ulrich CM et al. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr* 88: 133-139, 2008.
- [18] Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J Clin Oncol* 27: 3757-3763, 2009.
-

-
- [19] Zinser G, Packman K, Welsh J. Vitamin D3 receptor ablation alters mammary gland morphogenesis. *Development* 129: 3067-3076, 2002.
- [20] Colston KW, Berger U, Wilson P, Hadcocks L, Naeem I, Earl H, Coombes RC. Mammary gland 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptor content during pregnancy and lactation. *Moll Cell Endocrinol* 60: 15-22, 1988.
- [21] Mezzetti G, Barbiroli B, Oka T. 1,25 dihydroxy-cholecalciferol receptor regulation in hormonally induced differentiation of mouse mammary gland in culture. *Endocrinology* 120: 2488-2493, 1987.
- [22] Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hidroxílase. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 888-894, 2001.
- [23] Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hidroxílase. *Moll Cell Endocrinol* 215: 31-38, 2004.
- [24] Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D3, the major circulating form of vitamin D3. *J Nutr* 136: 887-892, 2006.
- [25] Pendas-Franco N, Gonzalez-Sancho JM, Suarez Y, Aguilera O, Steinmeyer A, Gamallo C et al. Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells. *Differentiation* 75: 193-207, 2007.
- [26] Lazzaro G, Agadir A, Qing W, Poria M, Mehta RR, Moriarty RM et al. Induction of differentiation by 1 alpha-hydroxyvitamin D (5) in T47D human breast cancer cells and its interaction with vitamin D receptors. *Eur J Cancer* 36: 780-786, 2000.
- [27] Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 276: 9101-9107, 2001.
- [28] McElwain MC et al. Antiproliferative effects in vitro and in vivo of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and a vitamin D3 analog in a squamous cell carcinoma model system. *Moll Cell Differ* 3: 31-50, 1995.
- [29] Getzenberg RH et al. Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the Dunning rat prostate model system. *Urology* 50: 999-1006, 1997.
- [30] Zang X et al. Growth suppression of ovarian cancer xenografts in nude mice by vitamin D analogue EB1089. *Clin Cancer Res* 11: 323-328, 2005.
- [31] Colston KW, Chander SK, MacKay AG, Coombes RC. Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 44: 693-702, 1992.
- [32] Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis* 26: 429-440, 2005.
- [33] Bortman P, Fogueira MAAK, Katayama MLH, Snitcovsky IML, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res* 35: 1-9, 2002
- [34] Lipkin M, Newmark HL. Vitamin D, calcium and prevention of breast cancer: a review. *J Am Coll Nutr* 18: 392S-397S, 1999.
- [35] Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Frequency of vitamin D (Vit D) deficiency at breast cancer (BC) diagnosis and association with risk of distant recurrence and death in a prospective cohort study of T1-3, N0-1, M0 BC. *J Clin Oncol* 26: Abstr 511, 2008.
- [36] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10869-10874, 2001
-

-
- [37] Sorlie T, Tibshirani R, parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8418–8423, 2003.
- [38] van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-535, 2002.
- [39] Yang X, Sherman M, Rimm D et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 439-443, 2007.
- [40] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer : clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13: 4429-4434, 2007.
- [41] Smid M, Wang Y, Zhang Y et al: Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 68: 3108-3114, 2008.
- [42] Heitz F, Harter P, Traut A et al: Cerebral metastases (CM) in breast cancer (BC) with focus on triple-negative tumors (abstract 1010). *J Clin Oncol* 26(15S):43s, 2008.
- [43] Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77: 51-58, 1981.
- [44] Welsh J, Wietzke JÁ, Ser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 133: 2425S-2433S, 2003.
- [45] Outila TA, Mattila PH, Piironen VI, Lamberg-Allardt CJE. Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (*Cantharellus tubaeformis*) as measured with a human bioassay. *Am J Clin Nutr* 69: 95-98, 1999.
- [46] Armas LAG, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5387-5391, 2004.
- [47] Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25 dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Int Med* 168: 1340-1349, 2008.
- [48] Holick MF, Chen T. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87: 1080-1086, 2008.
- [49] Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1982, 74-76.
- [50] Loomis WF. Skin pigment regulation of vitamin D biosynthesis in man. Variation in solar ultraviolet at different latitudes may have caused racial differentiation in man. *Science* vol 157 n° 3788, 501-506, 1967.
- [51] Dawson-Hughes B. Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. *Am J clinical Nutrition* 80, 1763S-1766S, 2004.
- [52] Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1165-1168, 1987.
- [53] Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 72: 690-693, 2000.
- [54] Gupta D, Trukova K, Vashi PG et al. Association of serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index in cancer. *J Clin Oncol* 27 (15 suppl): Abstract 6625, 2009.
- [55] Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 16: 713-716, 2005.
- [56] Holick M. The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr* 135: 2739S-2748S, 2005.
- [57] Yetley EA. Assessing vitamin D status of the US population. *Am J Clin Nutr* 88: 558S-564S, 2008.
- [58] Ginde AA, Liu MC, Camargo CA. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Int Med* 169: 626-632, 2009.
-

-
- [59] Gorham ED, Garland CF, Garland FC, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *Steroid Biochem Mol Biol* 97: 179-194, 2005.
- [60] Hanchette CL, Schwartz GG. Geographic patterns of prostate cancer mortality: evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 70: 2861-2869, 1992.
- [61] Grant WB. An estimate of premature cancer mortality in the US due to inadequate doses of solar ultraviolet B radiation. *Cancer* 94: 1867-1875, 2002.
- [62] Garland CF, Garland FC, Gorham ED et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 96: 252-261, 2006.
- [63] Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Yong JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19: 614-622, 1990.
- [64] Grant WB. Ecologic studies of solar UV-B radiation and cancer mortality rates. *Recent Results Cancer Res* 164: 371-377, 2003.
- [65] Knight JA, Lesosky M, Barnett H, Raboud JM, Vieth R. Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 422-429, 2007.
- [66] Lin J, Manson JE, Lee IM, Cook NR, Buring JE, Zhang SM. Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women. *Arch Intern Med* 167: 1050-1059, 2007.
- [67] John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. *National Health and Nutrition Examination Survey. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 399-406, 1999.
- [68] Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control* 16: 83-95, 2005.
- [69] Grant WB, Garland CF. The association of solar ultraviolet B (UBV) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates. *Anticancer Res* 26: 2687-2699, 2006.
- [70] Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Grant WB, Garland FC. Relationship between low ultraviolet B irradiance and higher breast cancer risk in 107 countries. *Breast J* 14: 255-260, 2008.
- [71] McCullough ML, Rodriguez C, Diver WR et al. Dairy calcium, and vitamin D intake and postmenopausal breast cancer risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2898-2904, 2005.
- [72] Robien K, Cutler GJ, Lazovich D. Vitamin D intake and breast cancer risk in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Causes Control* 18: 775-782, 2007
- [73] Abbas S, Linseisen J, Chang-Claude J. Dietary vitamin D and calcium intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Nutr Cancer* 59: 54-61, 2007.
- [74] Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 85: 1586-1591, 2007.
- [75] Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Colditz GA, Willet WC. Intake of dairy products, calcium and vitamin D and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1301-1311, 2002.
- [76] Freedman DM, Chang SC, Falk RT et al. Serum levels of vitamin D metabolites and breast cancer risk in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 889-894, 2008.
- [77] Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100: 1581-1591, 2007.
-

-
- [78] Piura E, Chapman JW, Lipton A et al. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D (D) and prognosis of postmenopausal breast cancer (BC) patients: NCIC-CTG MA 14 trial. *J Clin Oncol* 27 (15 suppl): Abstract 9581, 2009.
- [79] Haussler, MR et al. The nuclear vitamin D receptor : biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13: 325-349, 1998.
- [80] Baeke F, van Etten E, Gysemans C, Overbergh L, Mathieu C. Vitamin D signaling in immune-mediated disorders: evolving insights and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med* 29: 376-387, 2008
- [81] Omdahl JL, DeLuca HF. Mediation of calcium adaptation by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J Nutr* 107: 1975-1980, 1977.
- [82] Garabedian M, Holick MF, DeLuca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1673-1676, 1972.
- [83] Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawas H, Suda T, DeLuca HF. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1 α hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1387-1391, 1998.
- [84] Hughes MR, Brumbaugh PF, Hussler MR, Wergedal JE, Baylink DJ. Of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190: 578-580, 1975.
- [85] Zhang MY, Wang X, Wang JT, Compagnone NA, Mellon SH, Olson JL, Tenenhouse HS, Miller WL, Portale AA. Dietary phosphorus transcriptionally regulates 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase gene expression in the proximal renal tubule. *Endocrinology* 143: 587-595, 2002.
- [86] Masuda S, Byford V, Arabian A, Sakai Y, Demay MB, St-Arnaud R, Jones G. Altered pharmacokinetics of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in the blood and tissues of the 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1) null mouse. *Endocrinology* 146(2): 825-834, 2005.
- [87] Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 271: F203-F208, 1996.
- [88] Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (24): 13572-13576, 2001.
- [89] Haddad JG Jr, Walgate J. 25-hydroxyvitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifidiol-binding protein. *J Biol Chem* 251(16): 4803-4809, 1976.
- [90] Cooke NE, Haddad JG. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 10: 294-307, 1989.
- [91] Brown AJ, Finch J, Grieff M, Ritter C, Kubodera N, Nishii Y, Slatopolsky E. The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology* 133: 1158-1164, 1993.
- [92] Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, Lopez-Hilker S, Finch J, Mori T, Nishii Y, Slatopolsky E, Brown AJ. On the mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *Endocrinology* 128 (4): 1687-1692, 1991.
- [93] Bouillon R, Akamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16: 200-257, 1995.
- [94] Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P. Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration. *J Clin Invest* 67: 589-596, 1981.
-

-
- [95] Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25(OH)vitamin D₃. *Cell* 96: 507-515, 1999.
- [96] Birn H, Vorum H, Verroust PJ, Moestrup SK, Christensen EI. Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 11: 191-202, 2000.
- [97] Nykjaer A, Fyfe JC, Kozuraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, Verroust PJ, Aminoff M, de la Chapelle A, Moestrup SK, Ray R, Gliemann J, Willow TE, Christensen EI. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH)vitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13895-13900, 2001.
- [98] Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 α -hidroxilase and the action of vitamin D. *J Mol endocrinol* 25: 141-148, 2000.
- [99] Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M. Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res* 11: 3579-3586, 2005.
- [100] Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 391-395, 1998.
- [101] Cross HS et al. 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hidroxilase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* 66: 287-292, 2001.
- [102] Bises G et al. 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hidroxilase expression in normal and malignant human colon. *J Histochem Cytochem* 52 : 985-989, 2004.
- [103] Friedrich M et al. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res* 164: 239-246, 2003.
- [104] Lechner D, Manhardt T, Bajna E, Posner GH, Cross HS. A 24-phenylsulfone analog of vitamin D inhibits 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) degradation in vitamin metabolism-competent cells. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 1119-1126, 2007.
- [105] Albertson DG, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nature Genet* 25: 144-146, 2000.
- [106] Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 234-240, 2006.
- [107] Swami S, Raghavachari N, Muller UR, Bao YP, Feldman D. Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Res Treat* 80: 49-62, 2003.
- [108] Rowling MJ, Kemmis CM, Taffany DA, Welsh J. Megalin-mediated endocytosis of vitamin D binding protein correlates with 25-hydroxycholecalciferol actions in human mammary cells. *J Nutr* 136: 2754-2759, 2006.
- [109] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895, 1988.
- [110] Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol RenalPhysiol* 277: F157-F175, 1999.
- [111] Prufer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptor promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptor. *J Biol Chem* 275: 41114-41123, 2000.
- [112] Mellon WS, DeLuca HF. An equilibrium and kinetic study of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ binding to chicken intestinal cytosol employing high specific activity 1,25-dehydroxy(3H-26,27)vitamin D₃. *Arch Biochem Biophys* 197: 90-95, 1979.
-

-
- [113] Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Prah JM, DeLuca HF. Upregulation of the vitamin D receptor in response to 1,25 dihydroxyvitamin D3 results from ligand induced stabilization. *J Biol Chem* 267: 20082-20086, 1992.
- [114] Racz A, Barsony J. Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem* 274: 19352-19360, 1999.
- [115] Yasmin R, Williams RM, Xu M, Noy N. Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor and their mutual heterodimer. *J Biol Chem* 280: 40152-40160, 2005.
- [116] Kurokawa R et al. Differential orientations of the DNA binding domain and carboxy-termina dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 7: 1423-1435, 1993.
- [117] Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Rev* 26: 662-687, 2005.
- [118] Freedman LP. Transcriptional targets of the vitamin D3 receptor-mediated cell cycle arrest and differentiation. *J Nutr* 129: 581, 1999
- [119] Liu M, Lee MH, Cohen M, Bosumakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the CDK inhibitor p21 by vitamin D leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10: 142-153, 1996.
- [120] Tagami T, Lutz WH, Kumar R, Jameson JL. The interaction of the vitamin D receptor with nuclear receptor corepressors and coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 358-363, 1998.
- [121] Li B, Carey M, Workman JL. The role of Chromatin during transcription. *Cell* 128: 707-719, 2007.
- [122] Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther* 3: 225-230, 2007.
- [123] Zinser GM, Welsh J. Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Moll Endocrinol* 18: 2208-2223, 2004.
- [124] Zinser GM, McEleney K, Welsh J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild-type and vitamin D3-receptor knock-out mice. *Moll Cell Endocrinol* 200: 67-80, 2003.
- [125] Zinser Gm, Suckow M, Welsh J. Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 153-164, 2005.
- [126] Freake HC, Abeasekeker G, Iwasaki J, Marocci C, MacIntyre I, McClelland RA, Skilton RA, Easton DF, Coombs RC. Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in breast cancer and relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Research* 44: 1677-1681, 1984.
- [127] Eisman JA, Suva LJ, Martin TS. Significance of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in primary breast cancers. *Cancer Research* 46: 5406-5408, 1986.
- [128] Colston KW, Berger U, Coombs RC. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet* 1: 185-191, 1989.
- [129] Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL; Haussler MR, Pike JW, Colston K, Easton D, Coombs RC. Immunocytochemical detection of oestrogen receptor, progesterone receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relation to prognosis. *Cancer Research* 51: 239-244, 1991.
- [130] Friedrich M, Axt-Flidner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, reichrath J. Analysis of vitamin D receptor (VDR) and retinoid X receptor α in breast cancer. *Histochem J* 34: 35-40, 2002.
- [131] Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78: 1193-1231, 1998
-

-
- [132] Suda T, Ueda Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 88: 259-266, 2002
- [133] Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74: 507-513, 1984.
- [134] Holick MF. Vitamin D. Importance in the prevention of cancers, type I diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79: 362-371, 2004.
- [135] Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes p21 and p27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 121: 103-109, 2001.
- [136] Wu G, Fan RS, Li W, Ko TC, Brattain MG. Modulation of cell cycle control by vitamin D₃ and its analogue, EB1089, in human breast cancer cells. *Oncogene* 15: 1555-1563, 1997.
- [137] Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W. p27 (Kip1) stabilization and G1 arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin dependent kinase 2 and Skp1-cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279: 25260-25267, 2004.
- [138] Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ downregulates cell membrane growth and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 277: 38965-38971, 2002.
- [139] Kawata H, Kamiakito T, Takayashiki N, Tanaka A. Vitamin D₃ suppresses the androgen-stimulated growth of mouse mammary carcinoma SC-3 cells by transcriptional repression of fibroblast growth factor 8. *J Cell Physiol* 207: 793-799, 2006.
- [140] Wu Y, Craig TA, Lutz WH, Kumar R. Identification of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ response elements in the human transforming growth factor beta 2 gene. *Biochemistry* 38: 2654-2660, 1999.
- [141] Xie SP, Pirianov G, Colston KW. Vitamin D analogues suppress IGF-I signalling and promote apoptosis in breast cancer cells. *Eur J Cancer* 35: 1717-1723, 1999.
- [142] Ylikomi T et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm* 64: 357-406, 2002.
- [143] Verlinden L et al. Action of 1α,25(OH)₂D₃ on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol* 142: 57-65, 1998.
- [144] Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ on the G1-S phase-controlling machinery. *Mol endocrinol* 15: 1370-1380, 2001.
- [145] Mørk Hansen C, Rhode L, Madsen MW, Hansen D, Colston KW, Pirianov G, Holsu PK, Binderup L. MCF-7/VDR: a new vitamin D resistant cell line. *J Cell Biochem* 82: 422-436, 2001.
- [146] James SY, Mackay AG, Colston KW. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58: 395-401, 1996.
- [147] Narvaez CJ, Zinser G, Welsh J. Functions of 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ in mammary gland: from normal development to breast cancer. *Steroids* 66: 301-308, 2001.
- [148] Love-Schimenti C, Gibson D, Ratman A, Bikle D. Antiestrogen potentiation of antiproliferative effects of vitamin D₃ analogues in breast cancer cells. *Cancer Res* 56: 2789-2794, 1996.
-

-
- [149] Welsh J, VanWeelden K, Flanagan L, Byrne I, Nolan E, Narvaez CJ. The role of vitamin D3 and anti-estrogens in modulating apoptosis of breast cancer cells and tumors. *Subcell Biochem* 30: 245-270, 1998.
- [150] Flanagan L, Vanweelden K, Ammerman C, Ethier S, Welsh J. SUM-159 PT cells, a novel estrogen independent human breast cancer model system. *Breast Cancer Res Treat* 58: 193-204, 1999.
- [151] Jiang F, Li P, Fornace AJ Jr, Nicosia SV, Bai W. G2/M arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in ovarian cancer cells mediated through the induction of GADD45 via a exonic enhancer. *J Biol Chem* 278: 48030-48040, 2003.
- [152] Palmer HG et al. Genetic signatures of differentiation induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 63: 7799-7806, 2003.
- [153] Wang QM, Jones JB, Studzinsky GP. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res* 56: 264-267, 1996.
- [154] Saez S, Meggough F, Lefebvre M-F, Descotes F, Pampile R, Adam L, Crepin M. Potential direct and indirect influence of 1,25(OH)2D3 on the growth of h colonic and breast carcinoma. In *Vitamin D, a Pluripotent Steroid Hormone: Structural Studies, Molecular Endocrinology and Clinical Applications*, pp469-476. Eds AW Norman, R Bouillon & M Thomasset. Berlin: De Gruyter. 1994.
- [155] Desprez P-Y, Poujol D, Falette N, Lefebvre M-F, saez S. 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases epidermal growth factor receptor gene expression in BT-20 breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Com* 176: 1-6, 1991.
- [156] Koli K, Keski-Oga J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 has been shown to enhance the expression of transforming growth factor β 1 and its latent form binding protein in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 55: 1540-1547, 1994.
- [157] Mercier T, Chaumontet C, Gaillard-Sanchez I, Martel P, Heberden C. Calcitriol and lexicalcitriol (KH1060) inhibit the growth of human breast adenocarcinoma cells by enhancing transforming growth factor- β production. *Biochem Pharmacol* 52: 505-510, 1996.
- [158] Pollak MN. Endocrine effects of IGF-I on normal and transformed breast epithelial cells: potencial relevance to strategies for breast cancer treatment and prevention. *Breast Cancer Res Treatment* 47: 209-217, 1998.
- [159] Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FR, Pollak M. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and breast cancer risk. *Lancet* 351: 1393-1396, 1998.
- [160] Papa V, Gliozzo B, Clark GM, McGuire WL, Moore D, Fujita-Yamaguchi Y, Vigneri R, Goldfine ID, Pezzino V. Insulin-like growth factors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res* 53: 3736-3740, 1993.
- [161] Xie S, James SY, Colston KW. Vitamin D derivatives inhibit the mitogenic effects of IGF-I on MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol* 154: 495-504, 1997.
- [162] Pirianov G, Colston KW. Interaction of vitamin D analogs with signalling pathways leading to apoptosis in breast cancer cells. *Steroids* 66: 309-318, 2001.
- [163] Mathiasen IS, Lademann U, Jaattela M. Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res* 59: 4848-4856, 1999.
- [164] Sundaram S, Sea A, Feldman S, Strawbridge R, Hoopes PJ, Demidenko E, Binderup L, Gewirtz DA. The combination of a potent vitamin D3 analog, EB1089, with ionizing radiation reduces tumor growth and induces apoptosis of MCF-7 breast tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 9: 2350-2356, 2003.
-

-
- [165] Valrance ME, Brunet AH, Welsh J. Vitamin D-receptor-dependent inhibition of mammary tumor growth by EB1089 and ultraviolet radiation in vivo. *Endocrinol* 148: 4887-4894, 2007.
- [166] Ravid A, Rucker D, Machlenkin A, Rotem C, Hochman A, Kessler-Ickson G, Liberman UA, Koren R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res* 59: 862-867, 1999.
- [167] Sundaram S, Chaudhry M, Reardon D, Gupta M, Gewirtz DA. The vitamin D₃ analog EB1089 enhances the antiproliferative and apoptotic effects of adriamycin in MCF-7 breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treatment* 63: 1-10, 2000.
- [168] Wang Q, Yang W, Uytingco MS, Christakos S, Weider R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and all trans retinoic acid sensitize breast cancer cells to chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 60: 2040-2048, 2000.
- [169] Jiang F, Bao J, Li R, Nicosia SV, Bai W. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ through the downregulation of telomerase. *J Biol Chem* 279: 53213-53221, 2004.
- [170] Chung I et al. Differential antiproliferative effects of calcitriol on tumor-derived and matrigel-derived endothelial cells. *Cancer Res* 66: 8565-8573, 2006.
- [171] Merke J et al. Identification and regulation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. J Clin Invest* 83: 1903-1915, 1989.
- [172] Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87: 214-220, 2000.
- [173] Chung I et al. Epigenetic silencing of CYP24 in tumor-derived endothelial cells contributes to selective growth inhibition by calcitriol. *J Biol Chem* 282: 8704-8714, 2007.
- [174] Agadir A, Lazzaro G, Zheng Y, Zhang XK, Mehta R. Resistance of HBL100 human breast epithelial cells to vitamin D action. *Carcinogenesis* 20: 577-582, 1999.
- [175] Hansen CM, Rohde L, Madsen MW, Hansen D, Colston KW et al. MCF-7/VD(R) : a new vitamin D resistant cell line. *J Cell Biochem* 82: 422-436, 2001.
- [176] Narvaez CJ, Vanweelden K, Byrne I, Welsh J. Characterization of a vitamin D₃-resistant MCF-7 cell line. *Endocrinology* 137: 400-409, 1996.
- [177] Byrne B, Welsh J. Identification of novel mediators of vitamin D signaling and 1,25(OH)₂D₃ resistance in mammary cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103: 703-707, 2007.
- [178] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 406: 747-752, 2000.
- [179] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 5367-5374, 2004.
- [180] Carey LA, Perou CM, Livasi CA et al. Race, breast cancer subtypes and survival in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295: 2492-2502, 2006.
- [181] Bertucci F, Finetti P, Cervera N et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 123: 236-240, 2008.
- [182] Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology* 22 (11): 1233-1239, 2008.
- [183] Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 9 (5): R65, 2007.
-

-
- [184] Rakha EA, Tan D, Foulkes WD et al. Are triple-negative tumors and basal-like breast cancer synonymous ? *Breast Cancer Res* 9: 404, 2007.
- [185] Sotiriou C, Neo SY, Mcshane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10393-10398, 2003.
- [186] Bauer KR, Brown M, Cress RD et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 109: 1721-1728, 2007.
- [187] Millikan RC; Newman B Tse C-K et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 109: 123-139, 2008.
-
