Victor Celso Nogueira Fonseca Filho

**Influência da vitamina D por via intratumoral na proliferação
e expressão de genes alvo de xenoenxerto de câncer de
mama de pacientes pós-menopausadas**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca Filho, Victor Celso Nogueira

Influência da vitamina D por via intratumoral na proliferação e expressão de genes alvo de xenoinxerto de câncer de mama de pacientes pós-menopausadas / Victor Celso Nogueira Fonseca Filho. -- São Paulo, 2013.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo.**

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira.

Descritores: 1.Vitamina D 2.Ensaio antitumoral modelo de xenoinxerto 3.Camundongo nus 4.Calcitriol 5.Receptor de calcitriol 6.Proteína VDR humana 7.Expressão gênica 8.Neoplasias da mama/genética 9.Carcinoma ductal de mama/terapia

USP/FM/DBD-366/13

Com muito amor, dedico esta obra científica a meus pais Victor e Maria pelo amor, companheirismo, cumplicidade e entusiasmo que eles tem por mim e pelas minhas batalhas

Com muito amor, também dedico as minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, que muito contribuem para o meu caminhar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro momento a Deus por tudo que ele faz por mim.

Agradeço a minha família pelo amor, companheirismo e cumplicidade no decorrer deste longo caminho.

Agradeço aos meus tios, tias, primos e primas que se fazem tão importante com a atenção, carinho e orações que me dedicam.

Agradeço a minha orientadora professora Maria Aparecida que, muito iluminada, soube me conduzir e me fazer ver detalhes importantes para o amadurecimento profissional e pessoal. Muito grato por tudo.

Agradeço a professora Mitzi pela doce atenção que distribui a todos.

Agradeço as Doutoradas Maria Lucia, Rosemeire Roela, Fatima Pasini e Simone Maistro pelo quanto me ajudaram nesta importante e intensa etapa.

Muito obrigado as minhas amigas e amigos Paulo, Simone, Simoninha, Giselly, Fabyane, Tauane, Cristina Grandau, Maria Jose, Rose, Jair, Cida do Biotério, Leandro, Willian, Dr. Pedro do biotério, Andreza, Zenaide e Fernanda do laboratório do professor Onochic, os quais foram excelentes conselheiros quando eu quis chorar e fizeram o sorriso brotar no coração quando a auto estima estava combalida. Meu eterno obrigado.

Muito tenho a agradecer a querida turma do Butantan, capitaneada pelo professor Durvanei, e composta de uma turma bem animada. Abraço no coração ao professor Durvanei, Doutores Cleber, Fernanda e a Miriam, sou muito grato pelo tanto que me fizeram.

Gratidão aos professores Onochic e Walcy e toda sua equipe, os quais me fizeram sentir-me acolhido em seus laboratórios.

Grato a todos do laboratório de patologia da faculdade de medicina da USP, ao Gerson, a Kelly, a Paula.

Muito grato também sou aos queridos Dr. Eduardo Lyra, Cintia Rolim, Ricardo Basso, Adriano, Dr. Andrade e toda equipe do centro cirúrgico do IBCC.

Agradeço com carinho aos professores Roger Chammass, Igor, Shigueko , Teresinha, Camila, Andréa , a Mara, a Julia e todos que constituem seus respectivos laboratórios.

A Suely Nonogaki e Juliana meu agradecimento

A turma da biblioteca, da Clínica Pinoti, Sameb e Bioimagem

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	11
3.1. Casuística	11
3.1.1. Critérios de inclusão	12
3.1.2. Critérios de exclusão	12
3.2. Ética	12
3.3. Métodos	13
3.3.1. Avaliação de dose e toxicidade do Calcitriol	13
3.3.2. Processamento das Amostras	14
3.3.3. Modelo de Xenenxerto em Camundongo imunocomprometido <i>Nude</i>	15
3.3.4. Análise Histológica de Tumores	17
3.3.5. Exame de Imunohistoquímica para determinação da proliferação, apoptose, parada de ciclo celular e receptor da vitamina D	18
3.3.6. Avaliação de expressão gênica	20
3.3.7. Extração de RNA Total	20
3.3.8. Reação de Transcriptase Reversa	21
3.3.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real	21
3.3.10. Análise estatística	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Avaliação da toxicidade do Calcitriol em camundongos Balb-c	22
4.1.1. Estado geral dos camundongos Balb-c	22
4.1.2. Peso dos camundongos Balb-c	22
4.1.3. Cálcio sérico dos camundongos Balb-c	24

4.1.4. Função renal dos camundongos Balb-c.....	25
4.1.5. Hemograma dos camundongos.....	27
4.1.6. Enzimas Hepáticas dos camundongos Balb-c.....	30
4.2. Características das amostras e xenoenxertos e seleção para estudo.....	32
4.3. Efeitos colaterais do calcitriol em Camundongos Nude	34
4.4. Diâmetro do tumor em camundongos nude.....	36
4.5. Características histológicas das amostras e xenoenxertos selecionados.....	37
4.6. Expressão de VDR nas amostras e xenoenxertos selecionados	37
4.7. Avaliação da proliferação e apoptose nas amostras e xenoenxerto.....	38
4.8. Avaliação da ativação genômica pelo Calcitriol.....	40
4.9. Avaliação da expressão dos genes envolvidos no controle da proliferação celular e potenciais alvos do Calcitriol.....	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	49
7. ANEXOS.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação de dose e toxicidade do Calcitriol.....	14
Figura 2. Modelo de Xenenxerto em Camundongo imunocomprometido <i>Nude</i>	17
Figura 3. Peso dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	24
Figura 4. Cálcio sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	25
Figura 5. Uréia sérica dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	26
Figura 6. Creatinina sérica dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa a creatinina sérica dos camundongos Balb-c tratados com solução salina.....	27
Figura 7. Eritrócitos dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	28
Figura 8. Leucócitos dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	29
Figura 9. Plaquetas dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	30
Figura 10. TGO sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	31
Figura 11. TGP sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol.....	32
Figura 12. Seleção de amostras para estudo.....	33
Figura 13. Peso semanal dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol.....	34
Figura 14. Cálcio sérico dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol.....	35
Figura 15. Diâmetro semanal dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol.....	36

Figura 16. H&E e expressão de VDR por imunohistoquímica do tumor 7	58
Figura 17. H&E e expressão de VDR por imunohistoquímica do tumor 11.....	61
Figura 18. H&E e expressão imunohistoquímica do VDR do tumor 16.....	63
Figura 19. Expressão relativa do mRNA do VDR entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.....	38
Figura 20. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 7.....	65
Figura 21. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 11.....	67
Figura 22. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 16.....	69
Figura 23. Correlação de entre marcadores de proliferação e apoptose	39
Figura 24. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 7.....	71
Figura 25. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 11.....	75
Figura 26. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 16.....	75
Figura 27. Expressão relativa do mRNA do CYP24A1 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.....	40
Figura 28. Expressão relativa do mRNA do TGF-B2 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.....	41
Figura 29. Expressão relativa do mRNA do CDKN1A entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.....	42
Figura 30. Expressão relativa do mRNA do IGFBP3 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.....	43
Figura 31. Camundongo nude do grupo tratado por veiculo e por calcitriol.....	71

RESUMO

Fonseca Filho VCN. Influência da vitamina D por via intratumoral na proliferação e expressão de genes alvo de xenoenxerto de câncer de mama de pacientes pós-menopausadas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O efeito antiproliferativo do calcitriol foi detectado principalmente em linhagens de carcinoma mamário expostas in vitro a alta concentração hormonal (10 – 100nM), que é associado com hipercalcemia em seres humanos. Nossa hipótese era que a administração intratumoral de calcitriol permitiria maior concentração do hormônio e ativação da via genômica. Para testar esta hipótese, um modelo de enxerto tumoral que reproduz o mais próximo das características moleculares do tumor primário, foi estabelecida. As amostras de câncer de mama recolhidos foram enxertados em camundongos nude e depois da sexta semana, semana, os enxertos tumorais foram tratados semanalmente com injeções intra-tumorais de veículo (controle) ou o calcitriol 0,06 mcg (dose que pode permitir que picos séricos de calcitriol na faixa terapêutica prevista) durante seis semanas. A proliferação e apoptose do enxerto tumoral Veículo (controle) ou o calcitriol 0,06 mcg (dose que pode permitir que o soro de pico, assim como, a expressão dos genes alvos foram avaliadas através de reações imunohistoquímica ou RT-PCR. A expressão de VDR foi detectada em todas as amostras, assim como uma tendência para maior expressão de mRNA CYP24A1 (indução 10-18 vezes) em amostras tratadas com calcitriol, indicando que a via genômica foi induzida pelo hormônio. O elevado índice proliferativo, avaliado pela expressão de Ki67, foi detectado. No entanto, não havia diferenças na expressão de marcadores de proliferação (incorporação de BrdU, Ki67 e CDKN1B expressão) nem marcadores de apoptose (caspase-3 clivada e BCL2 expressão) entre os enxertos tumorais tratados por veículo e calcitriol tratado. Além disso, não houve diferença entre os grupos detectada na expressão de mRNA do CDKN1A. Em resumo, os efeitos antitumorais não foram observados neste modelo de enxerto tumoral. A indução do gene alvo CYP24A1 pode ter em parte impedido os efeitos antitumorais da vitamina D

Descritores: Vitamina D; Ensaios antitumorais modelo de xenoenxerto; Camundongos nus; Calcitriol; Receptores de calcitriol; Proteína VDR humana; Expressão gênica; Neoplasias da mama/genética; Carcinoma ductal de mama/terapia.

Summary

Fonseca Filho VCN. Influence of vitamin D via intratumoral proliferation and expression of target genes in breast cancer xenografts in postmenopausal patients [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Antiproliferative effects of calcitriol were mainly detected in breast carcinoma lineages exposed in vitro to high hormone concentrations (10-100 nM), which is associated with hypercalcemia in human beings. Our hypothesis was that intra-tumoral administration of calcitriol would allow higher tissue concentration of the hormone and activation of the genomic pathway. To test this hypothesis, a tumorgraft model, that more closely reproduces the molecular characteristics of the primary tumor, was established. Freshly collected breast cancer samples were grafted in nude mice and after the 6th week, tumorgrafts were treated weekly with intra-tumoral injections of vehicle (control) or calcitriol 0.06 mcg (dose that may allow peak serum calcitriol levels in the predicted therapeutic range) for six weeks. Tumorgraft proliferation and apoptosis, as well as expression of target genes, were evaluated through immunohistochemistry reactions or RT-PCR. VDR expression was detected in all samples as well as a trend towards higher expression of CYP24A1 mRNA (10-18 fold induction) in calcitriol treated samples, indicating that the genomic pathway was induced by the hormone. A high proliferative index, evaluated by Ki67 expression, was detected. However, there were neither differences in the expression of proliferation markers (BrdU incorporation, Ki67 and CDKN1B expression) nor in apoptosis markers (cleaved caspase 3 and BCL2 expression) between vehicle and calcitriol treated tumorgrafts. In addition, no difference between groups was detected for the expression of CDKN1A mRNA. In summary, calcitriol antitumoral effects were not observed in this tumorgraft model. Calcitriol induction of the target gene CYP24A1, might have in part, precluded vitamin D antitumoral effects.

Descriptors: Vitamin D; Xenograft model antitumor assays; Mice, nude; Calcitriol; Receptors, calcitriol; VDR protein, human; Gene expression; Breast neoplasms/genetics; Carcinoma, ductal, breast

1. INTRODUÇÃO

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram o câncer mamário mais incidente em estados brasileiros mais afastados da linha do Equador, vindo a corroborar com estudos ecológicos que sugerem os efeitos da latitude e exposição a radiação solar. Em análise de estudo ecológico confirmou-se a razão inversa entre a radiação ultravioleta B solar e a taxa de morte de 15 tipos de câncer (Grant et al., 2010). Outros estudos indicam que a alta exposição à luz ultravioleta esteja associada a um menor risco de incidência de linfomas não Hodgkin (Smedby et al., 2005) e que pacientes com melanoma submetidos a maior exposição solar apresentem melhor prognóstico em relação àqueles expostos a menor insolação (Berwick et al., 2005). Entre os mecanismos aventados para essa relação entre exposição solar e câncer está a gênese de vitamina D na pele, resultante da ação de raios solares, apoiado por estudo caso-controle populacional correlacionando um maior score de vitamina D solar (estimada por algoritmo) e exposição solar com a menor ocorrência de câncer mamário (Anderson et al., 2011). De acordo com esta hipótese, dados epidemiológicos indicam ainda que, a suplementação de vitamina D via dieta, ou conseqüentemente à exposição solar, pode ser um fator protetor contra o câncer (Ainsleigh, 1993).

A vitamina D3 (colecalfiferol), de origem animal, e a vitamina D2 (ergocalciferol) sintetizada pelas plantas, podem ser absorvidas, a partir da dieta, no duodeno e jejuno. A absorção da vitamina D no intestino requer a presença de sais biliares, por ser lipossolúvel. No entanto, ela é produzida predominantemente de maneira endógena a partir de um derivado do colesterol existente na pele, o 7 deidrocolesterol, que através de uma fotólise química, sob ação dos raios ultravioleta da luz solar transforma-se em colecalfiferol ou pré-vitamina D3, a qual está presente em todas as cinco camadas da epiderme, mas a maior concentração ocorre nas camadas germinativa e espinhosa. A síntese de vitamina D está diretamente relacionada ao grau de exposição solar, e varia de acordo com a latitude, a

estação climática, a poluição atmosférica, o tempo de exposição ao sol, a intensidade da irradiação solar, a área de superfície da pele exposta, a concentração de melanina, a idade, o uso de protetor solar entre outros fatores. Ao atingir o fígado, a vitamina D sofre uma hidroxilação na posição C-25, para formar o 25-hidroxicolecalciferol ou 25(OH)D₃, principal forma circulante no organismo. Nos rins dá-se uma segunda hidroxilação na posição C-1, que permite a transformação da 25-hidroxivitamina D₃ em 1,25(OH)₂D₃, pela ação de 1 alfa hidroxilase (Bouillon et al., 1995).

A forma ativa da vitamina D, calcitriol, através de sua ação no epitélio intestinal promove a indução da expressão da Calbidina e da TRPV6, que são moléculas envolvidas no transporte de cálcio da luz intestinal para o sangue.

Em indivíduos normais a concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ é 36-144 pmol/L e a de 25(OH)D₃ é de 20-100 nmol/L (Wilson et al., 1992). Níveis séricos de 25(OH)D₃ estão diretamente relacionados à densidade mineral óssea em homens e mulheres, sendo máxima quando o nível alcança ou suplanta 40 ng/mL, enquanto níveis séricos abaixo de 30 ng/mL causam redução da absorção intestinal de cálcio e hiperparatireoidismo. Logo, admite-se a presença de deficiência de vitamina D quando a concentração sérica é menor que 20ng/mL (50nmol/L), e insuficiência relativa e suficiência de vitamina D com concentrações de 21-29 e a partir de 30 ng/mL (72 nmol/L) respectivamente. Estima-se que 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo apresentem deficiência ou insuficiência de vitamina D, incluindo-se 40-100% dos homens e mulheres idosos na Europa e EUA e mais de 50% das mulheres pós-menopausadas que fazem uso de medicamentos para osteoporose (Holick, 2006).

A densidade mineral óssea decresce após a menopausa e a osteoporose afeta milhões de indivíduos idosos, sendo responsável por inúmeras fraturas por ano. Logo, a vitamina D é habitualmente prescrita a mulheres na pós menopausa, com o objetivo de reduzir a perda óssea, pois, estudos sugerem que a suplementação de vitamina D a mulheres com mais de 70 anos e insuficiência de vitamina D, resulte em aumento dos níveis

séricos do hormônio e benefício na densidade mineral óssea. A suplementação ideal de vitamina D, entretanto, não está bem determinada e a reposição de colecalciferol 400 UI/dia parece insuficiente para alguns autores, enquanto meta-análise demonstra que suplementação de doses diárias de 700-800 UI reduzam o risco de fraturas (Dawson-Hughes et al., 1997, Ooms et al., 1995, Chapuy et al., 1992). Outros autores ainda sugerem que as necessidades diárias variem de 3.000 a 5.000 UI (Barger-Lux et al., 1998). A suplementação pode também ser realizada na forma de calcitriol, o qual reduz a incidência de fraturas em mulheres pós menopausadas (Tilyard et al., 1992).

Avaliamos a concentração sérica da $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em pacientes com carcinoma de mama e observamos que a segunda, mas não a primeira, foi menor nas pacientes em comparação a mulheres sem câncer de mama (de Lyra et al., 2006). Outros autores também encontraram menor concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Lowe et al., 2005, Bertone-Johnson et al., 2005; Abbas et al., 2008; Crew et al., 2009) e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Janowsky et al., 1999) em pacientes com câncer de mama em relação a mulheres sem a doença. Variações na época da coleta das amostras podem ser responsáveis por algumas diferenças entre os estudos, pois algumas foram coletadas na época do diagnóstico, enquanto outras o foram até 27 anos antes do aparecimento da doença. Além disso, outros estudos indicam que níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são menores em pacientes com carcinoma de mama avançado ou metastático em relação àquelas pacientes com doença em estágio inicial (Mawer et al., 1997; Palmieri et al., 2006) e que a deficiência de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ao diagnóstico esteja relacionado a pior prognóstico, avaliado como sobrevida livre de metástase e sobrevida global (Goodwin et al., 2009). Pacientes com níveis adequados de vitamina D apresentavam melhor sobrevida livre de doença qualificando a deficiência da vitamina D como um indicador prognóstico independente de recorrência do câncer de mama, especialmente do tipo luminal (Kim et al., 2011).

Existem evidências que a vitamina D tenha efeito quimiopreventivo, pois em ratos expostos a carcinógeno químico, a administração de análogo

da vitamina D causa redução na incidência e maior latência no aparecimento do câncer de mama. Esta ação quimiopreventiva parece mais importante durante a fase de promoção do tumor (Murillo et al., 2005).

Estudos clínicos também apontam para benefício clínico quando vitamina D ou análogos foram utilizados para o tratamento do câncer. Assim, em 16 pacientes, com câncer de mama localmente avançado ou com metástase cutânea, tratadas com calcipotriol tópico, observou-se redução de 50% da lesão em três delas (Bower et al., 1991) e em pacientes com câncer de próstata hormônio refratário, a associação de altas doses de vitamina D (calcitriol 45µg via oral semanal) ao quimioterápico docetaxel, levou a um aumento da sobrevida global em relação ao grupo que recebeu docetaxel mais placebo (Beer et al., 2007).

Entretanto, a associação entre vitamina D e câncer em seres humanos ainda não está clara e estudo clínico prospectivo mostrou que a suplementação de vitamina D e cálcio a mulheres pós menopausadas não reduziu a incidência de câncer colorretal (Wactawski-Wende et al., 2006) e câncer de mama (Cheblowski et al., 2008). Dentre os fatores aventados para a negatividade do estudo estão o tempo de seguimento curto, visto que o tempo de latência de evolução do câncer pode ser longo, entre 10 a 20 anos, e dose de suplementação de 400 UI, que pode ter sido baixa, visto que estudos posteriores sugerem uso de doses mais altas.

A ação da vitamina D é mediada pelo receptor de vitamina D (VDR). Demonstrou-se que em mamas normais de coelhas virgens a expressão de VDR está ausente podendo ser detectada durante a gestação e sendo máxima durante a lactação (Eisman et al., 1980). Em câncer de mama a expressão de VDR ocorre em 58%-80% das amostras tumorais (Eisman et al. 1986, Bortman et al., 2002), mas a correlação da expressão do receptor com o prognóstico da doença é incerta, relatando-se que as pacientes portadoras de tumores VDR positivos apresentem maior probabilidade de sobrevida livre de doença (Colston et al., 1989). Além disso, estudo clínico em pacientes com câncer de mama com metástase cutânea ou doença localmente avançada demonstrou que a administração de um análogo de

vitamina D pode causar redução da lesão. Neste caso, os tumores das pacientes consideradas responsivas expressavam receptor de vitamina D (Bower et al., 1991) (Van den Bemd et al., 2000).

Outro fator que pode influenciar a via de sinalização da vitamina D é a presença de enzimas que metabolizam o hormônio. Demonstrou-se em rim a presença tanto de 1α -hidroxilase, responsável pela ativação do hormônio, quanto de 24-hidroxilase, enzima que promove uma oxidação no carbono 24 dando origem a metabólitos $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ou $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, que embora capazes de induzir absorção de cálcio intestinal, possuem menor capacidade na mobilização do cálcio a partir dos ossos (Holick et al., 1973; Wang et al., 1993). A expressão de 24 hidroxilase, codificada pelo gene *CYP24A1*, é induzida pelo próprio hormônio em células leucêmicas promielocíticas humanas HL60 (Inaba et al., 1991), células de câncer de próstata (Skowronski et al., 1995), fibroblastos da pele (Eil et al., 1986) e também em células de mama MCF7 (Swami et al., 2000). Além disso, mostrou-se que pode ocorrer amplificação gênica de *CYP24A1* em carcinoma de mama, apontando para a importância desta via na carcinogênese mamária (Albertson et al., 2000), e colônica (Bareis et al., 2002).

A presença de 1α -hidroxilase também foi detectada em sítios extra renais e em tumores, como adenomas de paratireóide, (Sergesten et al., 2000), linhagens celulares de câncer de mama (MCF7), tecido mamário benigno e amostras de câncer de mama (Friedrich et al., 2000), o que determina a ativação local da $25(\text{OH})\text{D}_3$. Em nosso estudo prévio onde avaliamos a funcionalidade da via da vitamina D em pacientes com carcinoma de mama observamos que a expressão de mRNA de 1α hidroxilase e 24 hidroxilase, bem como de VDR, foi similar em tecido canceroso em relação a tecido mamário normal de mulheres sem câncer (Lyra et al., 2006).

Além de sua ação na homeostase do cálcio, a vitamina D tem também importante papel no controle da proliferação e diferenciação celulares (Van den Bemd et al., 2000). Demonstrou-se que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode inibir o

crescimento de uma variedade de células tumorais *in vitro* incluindo células MCF7 e ZR-75-1 de câncer de mama (Colston et al., 1989) e células mamárias normais (Escaleira et al., 1999; Hussain et al., 2006).

O efeito antiproliferativo da vitamina D pode ser mediado pela indução de expressão de p21^{waf1} (*CDKN1A*) (Katayama et al., 2003) e regulação da expressão de moléculas que controlam a progressão do ciclo celular como p27^{kip1} (*CDKN1B*), ciclina G1, ciclina G2, ciclina I e fatores de crescimento, como TGFβ e EGF (Swami et al., 2003) e seus moduladores, como IGFBP-3 (Katayama et al., 2003). A vitamina D pode também induzir apoptose. Em estudo com células de leucemia tratadas com calcitriol observa-se o decréscimo da expressão de genes anti-apoptóticos como *BCL-2* e *BCL-XL* e aumento da expressão do gene pró-apoptótico *BAX* e ativação da caspase. Em células MCF7, calcitriol promove maior taxa de morte celular, com aumento da intensidade da expressão do TRPM-2/Clusterin e elevação da expressão da Catepsina B, mostrando seu efeito apoptótico.

Outros processos que podem ser modulados pela vitamina D são angiogênese (Nakagawa et al., 2005; Mantell et al., 2000), invasão e metástases, através da regulação da expressão de VEGF, metaloproteínas (Swami et al., 2003) e outras proteases (Barbosa et al., 2004). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a vitamina D altera o perfil gênico de linhagens de câncer de mama como MCF7, MDA-MB-231 e MCF12F transformada com nitrosometilurea (Swami et al., 2003; Hussain et al., 2006).

Recentemente, ganhou importância nos estudos, a intervenção do calcitriol na síntese e sinalização das prostaglandinas, ao reduzir a expressão de cox-2 (enzima importante na elaboração das prostaglandinas) e receptores de prostaglandinas, assim como promove um aumento da expressão da 15-pgdh (enzima que degrada as prostaglandinas) (Swami et al., 2012 ; Wang et al., 2012). Dessa forma, o calcitriol evita que a prostaglandina estimule a aromatase a aumentar o nível tecidual do hormônio de estrogênio, o qual promove proliferação mamária e tumoral (Krishnan et al., 2011).

Uma questão que se coloca é sobre os efeitos *in vivo* da vitamina D,

pois estudos *in vitro* indicam que a supressão do crescimento tumoral depende de concentração supra fisiológica de calcitriol (10-100nM), a qual ocasiona hipercalcemia.

Alguns estudos clínicos de fase I e de farmacocinética foram realizados com o objetivo de determinar a dose máxima tolerada. Um deles indica que calcitriol administrado por via subcutânea em dias alternados, resulta em dose máxima de 8 µg e pico de concentração sérica variando entre 0,25-0,75 nM de 1,25(OH)₂D₃, pico da concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ em 2-4 horas com retorno ao nível basal em 27 horas sem alteração na concentração de equilíbrio dinâmico entre os dias 1 e 7 da administração (Smith et al., 1999; Manson et al., 1980). Doses mais elevadas de calcitriol, entre 4-38 µg podem ser administradas por via oral por 3 dias consecutivos, resultando em dose semanal de 12-105 µg, correspondendo até a 1,5 µg/Kg/semana. Esta última dose leva a pico de concentração plasmática de 600-1440 pg/mL, que corresponde a 1,44-3,45 nM, e meia vida de cerca de 24 horas.

Determinou-se também a dose máxima tolerada utilizando-se administração oral de calcitriol em pulsos semanais. Neste caso, altas doses orais podem ser administradas, de 0,48 até 2,8 µg/kg (resultando em 33,6-196 µg em indivíduos de 70 Kg), as quais levam a pico de concentração sérica de 1.500-2.700 pg/mL, que correspondem a 3,60-6,49 nM, ou seja, concentrações com atividade anti proliferativa em culturas de células *in vitro*. Estas concentrações correspondem a cerca de 25-46 vezes o limite superior da concentração sérica fisiológica e são alcançadas em 4-8h seguida por redução de 50% em 6 horas. Os estudos mostram grande variabilidade na dosagem sérica. Além disso, o aumento de dose não acarreta ganho proporcional em concentração sérica de calcitriol, entretanto as razões a biodisponibilidade reduzida não estão claras. Um ponto positivo é que a toxicidade é mínima, indicando que doses semanais podem ser administradas com segurança (Beer et al., 2001; Muindi et al., 2002).

Um dos objetivos de nosso grupo é avaliar se a vitamina D é ativa no tumor, quando utilizada em concentração não tóxica. Estabelecemos um modelo de cultura primária de fatias de câncer de mama, onde preserva-se a relação epitélio-mesênquima, permitindo uma avaliação mais acurada em relação às condições fisiológicas. Após tratamento com calcitriol 0,5nM observamos que ocorre ativação da via genômica com indução da expressão do gene alvo CYP24A1 (Milani et al., 2010). Em outro estudo observamos que a suplementação de calcitriol a pacientes pós menopausadas com câncer de mama pode estar associada a um benefício clínico, mediado pela ação anti-proliferativa da vitamina D. As pacientes receberam calcitriol em dose para prevenir osteoporose, por curto período de tempo, enquanto eram submetidas a exames de estadiamento para realizar o tratamento cirúrgico. Neste caso, observamos redução da imunexpressão tumoral de Ki67 (marcador de proliferação tumoral) (Lyra et al., 2008).

Há evidências a favor de que o uso tópico da vitamina D possa ter menor efeito sobre a calcemia. Em um pequeno estudo em que pacientes com câncer mamário localmente avançado ou metastático foram submetidas a tratamento tópico do tumor com análogo da vitamina D, hipercalcemia foi detectada na menor parte das pacientes (Bower et al., 1991). Por outro lado, quando a administração de vitamina D é endovenosa, a concentração em determinados tecidos e órgãos pode ser bem inferior à concentração sérica. Avaliando-se a concentração prostática de calcitriol após administração endovenosa ou peritoneal do composto observou-se que o pico de concentração prostática é 5000 vezes menor que aquele alcançado no soro (Konety et al., 2002). Estes dados indicam indiretamente que a administração no próprio tumor, isto é, em um sítio específico, possa ser mais efetiva.

Uma alternativa para avaliar o papel da vitamina D é o uso de xenoenxerto de fatias de câncer de mama, obtidos logo após o ato cirúrgico. As fatias mantêm a interação epitélio/estroma, aproximando-se das condições tumorais da paciente, e apresentam considerável estabilidade

histológica e molecular em comparação aos tumores de origem, reduzindo a interferência obtida ao se realizar o transplante de linhagens de câncer, que são em geral previamente mantidas em cultura por períodos de tempo variável (Dobrolecki et al., 2009). Neste caso, seria possível avaliar os efeitos da administração intratumoral de calcitriol, em um modelo *in vivo*, favorecendo uma análise integrada considerando-se as células cancerosas, interação epitélio-mesênquima, efeitos de doses elevadas de calcitriol no tumor, avaliação da toxicidade sistêmica.

Entre os animais que podem ser utilizados em modelos de xenoenxerto encontram-se os camundongos atímicos *nude* (Marangoni et al., 2007). Estes animais apresentam imunocomprometimento celular (alteração do gene FOXP1), não havendo a produção de células T, o que evita a rejeição dos xenoenxertos. Neste caso, uma das opções é o transplante ortotópico no pâncreas mamário, que permite um crescimento infiltrativo e rápido do tumor mamário (Li et al., 2002).

Em suma, a ação antitumoral do calcitriol *in vivo* não está clara. Logo, nosso objetivo é avaliar os efeitos do calcitriol administrado por via intratumoral em xenoenxerto de câncer de mama. Pretendemos avaliar em um modelo bastante próximo ao que ocorre em seres humanos, se a concentração tumoral de calcitriol está associada a efeito na proliferação, apoptose e na expressão de genes alvo. As vantagens do modelo são além da preservação da interação epitélio-mesênquima, a utilização de concentrações de calcitriol, que apesar de elevadas, podem ser administradas a seres humanos, porém inferiores às utilizadas *in vitro*. Este tipo de abordagem ainda foi pouco explorado e pode contribuir para o esclarecimento das questões propostas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar se calcitriol administrado por via intratumoral tem efeito antiproliferativo ou pró-apoptótico em xenoenxerto de câncer de mama e ação em genes alvo.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar efeitos do calcitriol intra-tumoral na dimensão do tumor, medidas ponderais e concentração sérica de cálcio do camundongo.
- Avaliar a expressão de VDR em xenoenxerto de câncer de mama.
- Determinar se o Calcitriol ativa a via genômica pela indução da expressão do gene alvo CYP24A1 no tumor.
- Determinar se o calcitriol inibe a proliferação e/ou induz apoptose de amostras de câncer de mama.
- Avaliar a ação do Calcitriol sobre a expressão dos genes envolvidos no controle da proliferação celular e potenciais alvos do hormônio: CDKN1B, TGF β 2 e IGFBP3.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídas 17 pacientes com idade média de 59,12 anos ($\pm 7,11$ anos) e mediana de 58 anos (50 – 74 anos), com diagnóstico histológico de carcinoma ductal invasivo (94,1%) ou carcinoma coloide (5,9%) e com grau histológico de Nottingham II (70,6%) ou III (29,4%). O estágio clínico oncológico dos pacientes foram IA (29,4%), IIA (52,9%), IIB (11,8%) ou IIIB (5,9%) (Tabela 1).

TABELA 1 – Características das pacientes

TUMOR	IDADE	EC	TH	GH	RE	RP	HER-2	KI67
1	65	IIB	CDI	2	20%	30%	-	4%
3	63	IIA	CDI	2	30%	40%	-	1%
5	51	IIA	CDI	2	75%	60%	-	12%
7	50	IIA	CDI	3	50%	30%	-	99%
8	74	IA	CDI	2	70%	-	-	5%
9	53	IIA	CDI	2	10%	10%	+	1%
10	51	IIB	CDI	3	10%	-	-	5%
11	51	IIA	CDI	2	-	-	+	85%
12	64	IIA	CDI	3	-	-	-	NR
13	55	IIA	CDI	2	-	1%	-	2%
14	68	IA	CC	2	90%	75%	-	8%
15	58	IA	CDI	2	85%	80%	-	7%
16	57	IIIB	CDI	3	10%	40%	-	99%
17	58	IIA	CDI	3	9%	-	-	NR
18	62	IA	CDI	2	50%	80%	-	1%
19	68	IA	CDI	2	80%	70%	+	10%
20	57	IIA	CDI	3	-	-	-	NR

NR – Não realizado; EC – Estadio Clínico; TH – Tipo Histológico; CDI – Carcinoma ductal invasivo; CC - Carcinoma coloide; GH - Grau Histológico – Nottingham

As pacientes foram selecionadas pelo Dr. Eduardo Carneiro de Lyra, Coordenador de Ensino do Setor de Mastologia do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC - São Paulo – SP) e a Dra Cintia Flores Rolim, mastologista assistente do mesmo serviço. As pacientes receberam

informações sobre o estudo e em seguida foi fornecido termo de consentimento livre e esclarecido para assinarem, ao desejarem participar do estudo. A participação das pacientes resumiu-se à doação de fragmento de tumor, que seria desprezada. Não houve prejuízo para realização de exame histopatológico ou imuno-histoquímico, pois a retirada do fragmento para pesquisa se deu após a separação de fragmento de tumor para exames de rotina.

3.1.1. Critérios de inclusão

- Carcinoma invasivo de mama comprovado por exame histopatológico.
- Pacientes candidatas a tratamento cirúrgico.
- Pacientes que não realizaram quimioterapia neoadjuvante do câncer ou uso de vitamina D para tratamento de osteoporose.

3.1.2. Critérios de exclusão

- Pacientes que realizaram quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia ou suplementação recente de vitamina D (últimos 12 meses).
- Pacientes que apresentavam qualquer outra condição ou terapia que possa indicar risco à paciente ou interferir nos objetivos do estudo.
- Pacientes que participam de outros estudos clínicos enquanto admitido neste protocolo.

3.2. Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo 088/11), Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo 759/10), Comissão de Trabalhos Científicos do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer-IBCC (Agosto de 2010) e Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL 19 E/2013).

3.3. Métodos

3.3.1. Avaliação de dose e toxicidade do Calcitriol

Inicialmente, foi realizada avaliação pré-estudo de toxicidade, em camundongos Balb-c (aproximadamente 20 g), para determinar dose máxima não tóxica de calcitriol. Esta etapa foi realizada no laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, sob a supervisão do Prof. Durvanei Augusto Maria. Foram constituídos 04 grupos (n=13) para tratamento subcutâneo, 01 vez por semana, por 06 semanas (dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35). O primeiro foi o grupo controle - G1 (n=3) de camundongos Balb-c, que recebeu solução salina (soro fisiológico). O grupo G2 recebeu calcitriol (Calcijex - Abbott) na dose 0,02 µg (equivalente a 01µg/Kg); o grupo G3 que recebeu calcitriol (Calcijex) na dose de 0,04 µg (equivalente a 02µg/Kg) e o grupo G4 recebeu calcitriol (Calcijex) na dose de 0,06 µg (equivalente a 03µg/Kg) (Tabela 2). Estas doses foram calculadas em adequada proporção para o peso dos camundongos Balb-c, tomando-se como base um estudo de fase 01 (Beer et al., 2001), conduzido com pacientes com doença maligna tratados com calcitriol, alcançando dose máxima de 2,8 µg/kg semanal, não havendo toxicidade, (aproximadamente 0,06µg para os camundongos). A toxicidade do calcitriol nos camundongos Balb-c foi avaliada semanalmente por meio da determinação do peso e da análise de parâmetros bioquímicos em sangue. A medida de peso dos camundongos Balb/c foram realizado no dia 0 e 01 vez por semana, por 06 semanas, sempre 72 horas após a administração do tratamento calcitriol ou solução salina (dias 0, 3, 10, 17, 24, 31 e 38). Os parâmetros bioquímicos foram dosados através da coleta de sangue, por micropipeta do plexo orbitário dos camundongos Balb/c, 01 vez por semana, por 06 semanas, sempre 72 horas após a administração do tratamento calcitriol ou solução salina (dias 3, 10, 17, 24, 31 e 38). Os camundongos foram monitorados, semanalmente quanto a alterações no padrão de comportamento, peso e estado físico (peles, mucosa e motricidade). O sangue coletado foi submetido a dosagem de cálcio, enzimas hepáticas, ureia, creatinina, eritrócitos, leucócitos e plaquetas

(Figura 1). Após a última coleta de sangue, foi realizada eutanásia por deslocamento cervical, após sedação com solução de Xilazina e Quetamina (*Canadian Council on Animal Care*). Os camundongos foram mantidos em condições de alojamento e higiene adequados (*Canadian Council on Animal Care*), com alimentação *ad libitum* consistindo de água e ração (NUVILAB – Nuvital -Brasil).

Figura 1. Avaliação de dose e toxicidade do Calcitriol. Grupo 1 foi tratado com injeção subcutânea de solução salina nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35. Grupo 2 foi tratado com injeção subcutânea de 0,02µg calcitriol nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35. Grupo 3 foi tratado com injeção subcutânea de 0,04µg calcitriol nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35. Grupo 4 foi tratado com injeção subcutânea de 0,06µg calcitriol nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35.

3.3.2. Processamento das Amostras

Foram coletadas amostras de câncer de mama durante a cirurgia para tratamento da doença, as quais foram transportadas em frascos de 250mL contendo solução fisiológica a 0,9% estéril e acomodados em isopor com gelo. O tempo médio decorrido entre a aquisição do fragmento tumoral até o seu transplante foi de 90 minutos (60 a 120 minutos). As amostras foram processadas em fluxo laminar previamente esterilizado por luz ultravioleta e sob técnicas assépticas. Realizou-se a secção em retângulos do tumor, apresentando os fragmentos enxertados diâmetro médio de 8,59 mm ($\pm 3,18$ mm). Pequeno fragmento antes do enxerto foram fixados em formol tamponado e destinados para estudo histológico.

3.3.3. Modelo de Xenenxerto em Camundongo imunocomprometido *Nude*

Foram estudados camundongos fêmeas imunocomprometidas Balb-c *nude*, com aproximadamente 20 g. Foram alojados em compartimentos de acrílico forrados com maravalha, sob condições livres de patógeno, tendo à disposição água e ração (NUVILAB – Nuvital -Brasil). Foi realizada troca periódica dos compartimentos e da maravalha e reposição de ração e água.

O procedimento foi realizado sob condições assépticas, em fluxo previamente esterilizado e higienizado. O camundongo foram submetido a anestesia por via intraperitoneal 0,01 ml de Xilazina (20mg/ml), que tem ação de sedativo, analgésico e relaxante muscular; e 0,04 ml de Quetamina (50mg/ml), um anestésico (*Canadian Council on Animal Care, 1993*). Foi realizada incisão de 01 cm, lateral ao mamilo em região pélvica do camundongo, expondo o tecido gorduroso mamário, onde foi implantada a lâmina tumoral processada. Este tipo de implante é denominado ortotópico, ou seja, o tecido tumoral vindo de uma glândula mamária humana passa ocupa posição no órgão correspondente do camundongo, a glândula mamária. O peso dos camundongos foram monitorados através de balança a partir do dia de implantação do fragmento de amostra e a cada semana. A dimensão tumoral foi realizada através de um paquímetro, mensurando-se o maior diâmetro tumoral a partir da primeira semana após o implante, devido aos pontos de sutura, repetido-se as medidas semanalmente. A partir da sexta semana pós-enxerto, os camundongos foram randomizados em dois grupos distintos de tratamento. O primeiro correspondeu ao grupo controle, o qual recebeu o veículo (elaborado gentilmente pela Professora Maria Aparecida Nicoletti, Departamento de Farmácia, Ciências Farmacêuticas, USP, baseado na Bula do CALCIJEX - ABBOTT) e o segundo, recebeu calcitriol (CALCIJEX – ABBOTT) em dose semanal (0,06 µg – determinada pelo estudo prévio em Balb-c), por 06 semanas, via intratumoral. Devido ao tamanho dos fragmentos tumorais cedidos pelos patologistas, contudo, somente quatro amostras tumorais (T1, T3, T5 e T7), foram divididas entre

todos os camundongos de ambos os grupos de tratamento (controle e calcitriol). Houve perda de 01 camundongo pós-anestesia nos experimentos das amostras T1 e T3. Ocorreu ulceração tumoral em 02 camundongos do experimento da amostra T5 e redução total de um fragmento uma semana após enxerto no experimento da amostra T7. As demais amostras não apresentaram tamanho suficiente para constituir grupos de tratamentos completos, contemplando somente um camundongo em cada grupo de estudo (controle e calcitriol).

Foi administrado por via intraperitoneal 01 mg de BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine, (5-BrdU), CAS 59-14-3, Calbiochem, 5GM), diluído em 01 ml de soro fisiológico a 0,9%, 02 horas antes do sacrifício dos camundongos (Valrance et al., 2007), para avaliação de índice de proliferação celular. Após esse período, isto é, 24 horas após a última dose de calcitriol, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, após sedação com 0,01 ml de Xilazina (*Canadian Council on Animal Care*). Foi coletado sangue por punção cardíaca. Os tumores foram removidos, sendo alguns fragmentos criopreservados em nitrogênio líquido para estudos de biologia molecular e outros, fixados em formol tamponado, para exames de Imunohistoquímica.

Figura 2. Modelo de Xenenxerto em Camundongo imunocomprometido *Nude*.

As carcaças e peças anatômicas de animais foram acondicionadas em saco branco e identificadas com etiqueta própria para descarte de carcaças, devidamente preenchidas. O descarte ocorreu mediante solicitação telefônica à empresa limpadora. Estes procedimentos estavam de acordo com a Cartilha de Orientação para Descarte de Resíduos da Faculdade de Medicina da USP.

3.3.4. Análise Histológica de Tumores

Os tumores fixados em formol tamponado foram desidratados em álcool, emblocados em parafina e seccionados em 05 micrômetros para coloração com hematoxilina – eosina (HE), procedimento realizado pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia. As lâminas de tecido tumoral mamário pré-enxerto e pós-tratamento coradas com HE foram avaliadas pelo Dr.

Ricardo Basso, experiente patologista do laboratório de anatomia patológica do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), através de exame microscópico (microscópio Nikon Eclipse E400). Foi determinado o tipo histológico, grau histológico, porcentagem de células malignas e estroma em cada lâmina gerada.

3.3.5. Exame de Imunohistoquímica para determinação da proliferação, apoptose, parada de ciclo celular e receptor da vitamina D

A determinação da expressão do KI67, BrdU, BCL-2, Caspase 3 ativada, p27 e Receptor de Vitamina D foram realizadas através da reação de imuno-histoquímica, pelas pesquisadoras Sueli Nonogaki e Juliana Mariotti Guerra do Núcleo de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. A desparafinização de cortes de 03µm de espessura, de tecido parafinado, foi procedido em lâminas previamente tratadas (Amitel cat# CMS-2), as quais foram deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. A seguir realizou-se tratamento sequencial em xilol (60°C por 20 minutos e temperatura ambiente pelo mesmo tempo) e etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos em cada concentração) e lavadas, primeiro em água corrente e depois em água destilada. Para recuperação dos antígenos, as laminas foram fervidas, sob pressurização (panela de pressão Rochedo, A La Carte), em solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 por 3 min. Esfriou-se a panela sob água corrente até a despressurização total, para depois lavar as lâminas em água corrente e destilada e proceder o bloqueio da peroxidase endógena pela exposição a H₂O₂ a 06% com 4 trocas de 5 minutos cada. Após nova lavagem com água corrente e destilada, as lâminas foram lavadas com PBS 10nM pH 7,4 por 05 minutos e, após foi realizado bloqueio com Protein Block (Leica Microsystem, cat# RE7102, Newcastle, Reino Unido), 5 min a temperatura ambiente. Desprezou-se o bloqueador e aplicou-se os anticorpos primários, diluídos em tampão PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, durante 30 min a 37°C e por 16 a 18 horas a 4°C em câmara úmida. Os anticorpos

primário foram específicos contra KI67 (clone MIB-1, diluição 1:200, fabricante Dako, cat#M7240, Glostrup, Dinamarca), BrdU (clone Bu20a, diluição 1:1000, fabricante Neomarkers, cat# 1848-P, Fremont, CA, EUA), BCL-2 (clone 124, diluição 1:500, fabricante Dako cat# M0887), Caspase 3 ativada (clone Policlonal em coelho, diluição 1:200, fabricante Cell Signaling, cat# 9661-L, Danvers, MA, EUA), p27(clone Sx53G8, diluição 1:1000, fabricante Dako, cat# M7203) e Receptor de Vitamina D(clone 9A7, diluição 1:30, fabricante Millipore, cat#04-1526,Temecula, CA, EUA). As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com o Value Primary Antibody Enhancer do sistema de amplificação (UltraVision LPValue Large Volume Detection System HRP Polymer, Thermo Scientific cat# TL-125-HLS) por 20 min a 37°C. Novamente foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com o Value HRP Polymer (UltraVision LPValue Large Volume Detection System HRP Polymer, Thermo Scientific cat# TL-125-HLS) por 30 min a 37°C, para então, proceder mais uma lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Por fim, Incubou-se as lâminas em solução substrato cromógeno: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL H₂O₂ 6%; 100 mL PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Observou-se ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. Nova lavagem foi conduzida em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada As laminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavadas em água (corrente e destilada), imersas em água amoniacal a 0,5%, por 02 vezes e lavou-se em seguida em água corrente e destilada. A seguir realizou-se desidratação sequencial das lâminas em etanol (a 50%, 80% e 95% por 30 segundos em cada concentração e a 100%, 03 vezes, 30 segundos cada) e xilol (04 vezes, 30 segundos cada) e etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos em cada concentração), sendo montadas com Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha).Todas as reações foram realizadas de uma só vez para manter os mesmos parâmetros. Dr.

Ricardo Basso procedeu a seleção das regiões do tumor a serem analisadas em aumento 04x e 10x e a avaliação da porcentagem e intensidade de células marcadas foram realizadas em aumento 40x (microscópio Nikon Eclipse E400). Foram analisados 1000 células por amostra. O resultado foi expresso em porcentagem de positividade em relação a KI67, BrdU, BCL-2, Caspase 3 ativada, p27 e Receptor de Vitamina D.

3.3.6. Avaliação de expressão gênica

Avaliamos por qRT-PCR o nível de expressão gene CYP24A1, VDR, TGF- β 2, CDKN1B, IGFBP3 e dos genes referência GAPDH e β -ACTINA das amostras de tecido tratadas com calcitriol (Calcijex) e amostras de tecidos do controle. Esta avaliação teve início com a etapa da extração de RNA, seguida da conversão desta molécula em DNA e por fim a amplificação do DNA alvo, sendo todas estas etapas descritas abaixo.

3.3.7. Extração de RNA Total

Os fragmentos de tumor congelados serão submetidos à extração de RNA total pelo reagente Trizol[®] - solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Invitrogen), modificado de Chomczynski & Sacchi (1987).

A concentração de RNA será determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm e a qualidade do RNA extraído será verificada pela razão de absorbância a 260nm por 280nm (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). Para verificar a integridade do RNA as amostras serão submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%. A amostra será considerada íntegra pela identificação das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S na proporção 2:1.

A integridade do material será avaliada pelo sistema Agilent Bioanalyzer (Model 2100; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) através do valor de RIN (RNA Integrity Number), dado pelo software da Agilent.

3.3.8. Reação de Transcriptase Reversa

A síntese da primeira fita de cDNA será realizada a partir de 5µg de RNA diluído em água tratada com DEPEC para um total de 12µl e serão adicionados 1µl de oligo dT (concentração inicial 0,5 µg/µl) (Invitrogen) e 1µl de desoxirribunucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 10nM (Gibco). A mistura será aquecida a 65°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de RNA e posteriormente colocada no gelo por 1 minuto. A esta solução serão acrescentados 4µl de tampão da enzima Super Script III (Invitrogen) e 1µl de dietiltreitol (DTT) a 100 mM (Invitrogen). Após o período de aquecimento a 55°C por 10 minutos foi acrescentado 1µl da enzima transcriptase reversa SSII-RT Super Script III (5 UI/ µl) (Invitrogen) e novamente a reação será incubada a 55°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. Posteriormente, o material será aquecido a uma temperatura de 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima e utilizado para a amplificação da região de interesse ou estocado a -20°C.

3.3.9. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Serão analisados alguns genes alvos, como CYP24A1 e dos genes referência GAPDH, e ACTB (β ACTINA) para detectar possíveis alterações na expressão em relação ao tratamento. Para isso, será utilizado o sistema de detecção por *SYBR Green I*, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente que, quando intercalada à dupla fita de DNA, emite fluorescência para possibilitar a quantificação total de moléculas de DNA produzidas. Nesse método de detecção, a confirmação da especificidade da amplificação será realizada por meio da análise da curva de desnaturação.

Todas as amostras serão analisadas pelo programa Rotor-Gene 6 System (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália) e a média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (CT) será utilizada para

quantificação da expressão dos genes de interesse. A expressão relativa será determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.3.10. Análise estatística

Para avaliar a significância dos resultados no estudo da toxicidade do calcitriol em camundongos Balb-c, foram aplicados os testes estatísticos ANOVA, seguidos do teste de Tukey.

Para o modelo de xenoenxerto em camundongos nude e os efeitos do tratamento pelo calcitriol foram aplicados os testes de Wilcoxon e de Friedman para analisar o peso dos camundongos nude e os diâmetros dos xenoenxertos. As medidas do cálcio sérico dos camundongos nude foram submetidos ao teste Mann-Whitney. Para o estudo imunohistoquímico de marcadores de proliferação, apoptose e VDR foi aplicado os testes de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Correlação de Pearson. A análise dos resultados da expressão de genes foi procedida através do teste de Mann-Whitney. Nível de significância da diferença $\leq 0,05$ foi considerado significativo. Os dados foram analisados utilizando-se o programa SPSS (*Statistics Package for the Social Sciences*).

4. Resultados

4.1. Avaliação da toxicidade do Calcitriol em camundongos Balb-c

4.1.1. Estado geral dos camundongos Balb-c

Não foram observadas alterações em mucosa ocular, turgor da pele, motricidade ou do comportamento dos animais durante todo experimento.

4.1.2. Peso dos camundongos Balb-c

Os camundongos Balb-c dos grupos de tratamento, tanto controle quanto calcitriol, evoluíram com ganho ponderal (Figura 3 e Anexo A, Tabela

2). Inicialmente o grupo de camundongos a serem tratados com solução salina, tinham menor peso quando comparados aos camundongos a serem tratados com calcitriol ($P \leq 0,05$: a x h; a x o; a x v). Com o decorrer do tratamento todos os grupos demonstraram ganho ponderal ($P \leq 0,05$: a x g; h x l; o x u, v x ab). O controle, calcitriol 0,04 μg e 0,06 μg aumentaram o peso do dia 0 até o dia 38. O tratado com calcitriol 0,02 μg aumentou do dia 0 ao dia 24, mantendo estável o peso nas medidas seguintes. Ao final o grupo de camundongos tratados com solução salina tinham menor peso em relação aos tratados com calcitriol ($P \leq 0,05$: g x n; g x u; g x aa), contudo, apresentou maior amplitude de ganho ponderal em relação ao grupo calcitriol 0,02 e 0,04 μg ($P \leq 0,05$), com ganho de 3,49g ($\pm 0,53\text{g}$) no grupo controle, 0,83g ($\pm 1,19\text{g}$) no calcitriol 0,02 μg e 0,94g ($\pm 0,61\text{g}$) no calcitriol 0,04 μg . Porém não houve diferença de ganho ponderal nas demais comparações. Os dados indicaram um ganho menor de peso por parte dos camundongos tratado por calcitriol 0,02 e 0,04 μg em comparação ao controle, porém não há correlação de dose-efeito relacionado ao ganho ponderal.

Figura 3. Peso dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa o peso dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa o peso dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa o peso dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa o peso dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

4.1.3. Cálcio sérico dos camundongos Balb-c

O cálcio sérico dosado evoluiu, no grupo do calcitriol, com aumento gradual a cada semana de tratamento, apresentando ao final um nível maior comparado ao controle e ao valor inicial (Figura 4 e Anexo B, Tabela 3). Contudo, os camundongos não apresentaram alterações do padrão de comportamento e motilidade. Os camundongos Balb/c, apesar da elevação da calcemia, não apresentaram, ao final, diferença entre as diferentes doses de calcitriol. Porém, o grupo controle apresentou menor calcemia que os camundongos tratados por calcitriol. Os valores finais não ultrapassaram o limite superior de normalidade, entre 09 a 12mg/dL (Suckow et al., 2001), contudo, os grupos iniciaram com calcemia abaixo do normal.

Figura 4. Cálcio sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa o cálcio sérico dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa o cálcio sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa o cálcio sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa o cálcio sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

4.1.4. Função renal dos camundongos Balb-c

Os grupos de camundongos tratados com calcitriol e solução salina iniciaram e terminaram, em média dentro da faixa normal do nível sérico de ureia, entre 19 a 34mg/dL (Suckow et al., 2001), a exceção da dosagem final dos camundongos tratados por 0,06 µg de calcitriol, que esteve acima do normal, porém, sem que houve-se qualquer alteração nestes camundongos em seus estados gerais (Figura 5 e Anexo C, Tabela 4). Observa-se que todos os grupos de tratamento e controle iniciaram com aproximadamente o mesmo nível de ureia. O grupo controle manteve o nível de uréia estável no decorrer de 06 semanas de tratamento, ficando abaixo do nível dos grupos tratados por calcitriol. Quanto aos grupos tratados por calcitriol nas doses de 0,02 e 0,04µg seguiram oscilando no decorrer do tratamento, exibindo a ureia sérica, ao final, acima do controle e abaixo do tratamento por calcitriol a 0,06µg. O grupo tratado por 0,06µg de calcitriol apresentou uma

progressiva elevação da ureia firmando-se como a maior medida de ureia entre os grupos ao final do tratamento. Ao avaliar a creatinina, vemos que o grupo controle evoluiu com a manutenção do mesmo nível de concentração sérica no decorrer do tratamento. Já os grupos de tratamento com dose de 0,02 e 0,04 μ g progrediram no decorrer das seis semanas com elevação da creatinina sérica, enquanto que de forma inversa comportou-se a creatinina do grupo de tratamento de dose 0,06 μ g de calcitriol, alcançando um nível sérico menor ao final comparado a primeira semana de tratamento (Figura 6 e Anexo D, Tabela 5). Diante da faixa de normalidade, entre 0,5 a 0,8 mg/dL(Suckow et al., 2001), a creatinina apresentou-se discretamente aumentada, em todos os grupos, do início ao final, podendo não corresponder ao efeito do calcitriol. A creatinina sérica de cada grupo não esteve relacionada a proporção direta de dose-efeito, como observado na ureia sérica. Ao final não ficou caracterizado qualquer nefrotoxicidade pelo calcitriol.

Figura 5. Uréia sérica dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa a uréia sérica dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa a uréia sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa a uréia sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa a uréia sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

Figura 6. Creatinina sérica dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa a creatinina sérica dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa a creatinina sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa a creatinina sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa a creatinina sérica dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

4.1.5. Hemograma dos camundongos Balb-c

Os eritrócitos, tanto do grupo controle quanto do calcitriol evoluiu, paulatinamente, com redução dos valores aferidos no avançar das 06 semanas, observando-se, ao final menor contagem de eritrócitos no grupo do calcitriol em relação ao controle, porém apresentaram, todos os grupos de tratamentos, contagem de eritrócitos baixa desde o início da dosagem (Figura 7 e Anexo E, Tabela 6). Ao final, não houve diferença da contagem de eritrócitos entre as três doses de calcitriol e demonstrou ausência de relação dose-efeito.

Figura 7. Eritrócitos dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa os eritrócitos dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa os eritrócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa os eritrócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa os eritrócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

Quanto a contagem de leucócitos, demonstrou-se um expressivo aumento nos grupos tratados por calcitriol 0,02µg e 0,04µg. Porém, nos grupos controle e tratados por calcitriol 0,06µg percebeu-se uma discreta elevação no decorrer do tratamento, mostrando, ser um comportamento que não se correlaciona a proporcional dose-efeito de calcitriol (Figura 8 e Anexo F, Tabela 7). A contagem de leucócitos esteve, em todos os momentos, para todos os grupos, dentro da faixa de normalidade, entre $3,0$ a $14,2 \times 10^3$ células/µL (Suckow et al., 2001), sem efeito prejudicial do calcitriol no leucograma.

Figura 8. Leucócitos dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa os leucócitos dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa os leucócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa os leucócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa os leucócitos dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

Os camundongos tratados por 0,02 μg e 0,06 μg de calcitriol obtiveram maior contagem de plaquetas em relação aos controles. Os camundongos controles e os tratados por 0,04 μg mantiveram contagens de plaquetas aproximadas entre si (Figura 9 e Anexo G, Tabela 8). Ao final não se evidência dose-efeito não sendo clara a influência do calcitriol na contagem de plaquetas.

Figura 9. Plaquetas dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa as plaquetas dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa as plaquetas dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa as plaquetas dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa as plaquetas dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

4.1.6. Enzimas Hepáticas dos camundongos Balb-c

Após a ultima administração dos tratamentos, todos os camundongos tratados pelo calcitriol firmaram o TGO sérico acima dos camundongos controle, confirmando a tendência de maior aumento da enzima nos grupos tratado pelo calcitriol com o decorrer das semanas (Figura 10 e Anexo H, Tabela 9). O TGO dosado em todos os grupos durante o tratamento apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade para o TGO, que é entre 69 a 191UI/L. Contudo, não foi demonstrado diferença entre o grupo controle e calcitriol ao final. Por outro lado, o grupo calcitriol teve níveis de TGP similares no período de 06 semanas de tratamento, enquanto que foi observado maior amplitude de elevação no grupo controle igualando o mesmo nível de TGP para todos os grupos ao final do tratamento (Figura 11 e Anexo I, Tabela 10). Todos os grupos apresentaram, em média, seus

níveis de TGP dentro dos parâmetros da normalidade, entre 26 a 120UI/L, ao final do tratamento (Suckow et al., 2001). Não foi evidenciando hepatotoxicidade.

Figura 10. TGO sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa o TGO sérico dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa o TGO sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa o TGO sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa o TGO sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

Figura 11. TGP sérico dos camundongos Balb-c em tratamento por solução salina ou calcitriol. O boxplot amarelo representa o TGP sérico dos camundongos Balb-c tratados com solução salina. O boxplot vermelho representa o TGP sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,02 microgramas de calcitriol. O boxplot verde representa o TGP sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,04 microgramas de calcitriol. O boxplot azul representa o TGP sérico dos camundongos Balb-c tratados com 0,06 microgramas de calcitriol.

4.2. Características das amostras e xenoenxertos e seleção para estudo

Foram implantadas amostras de 17 tumores, porém, alguns foram excluídos devido critérios a seguir descritos. Uma fatia de cada amostra foi destinada para caracterização do tipo histológico e porcentagem de células malignas. As amostras T1 e T5 foram insuficientes para fornecer uma fatia para exame histológico de controle, pois foram subdivididas, respectivamente, em 05 e 04 segmentos para implante em camundongos. Então, 15 amostras foram avaliadas quanto ao tipo histológico, demonstrando-se que 86,7% eram carcinoma ductal invasivo e as demais foram carcinoma invasivo colóide (6,7%) ou carcinoma ductal in situ (6,7%). A amostra T18 era constituída apenas por carcinoma ductal in situ. As amostras T17, T19 e T20 não reverteram em tumor palpável até o Dia 42, início do tratamento, o mesmo ocorrendo com um dos xenexertos das

amostras T9, T10 e T15, não permitindo a comparação entre o controle e o tratado. Assim, sobrou oito amostras das quais foram consideradas para análise do peso dos camundongos, diâmetro dos xenoenxertos e calcemia (T3, T7, T8, T11, T12, T13, T14 e T16). Entretanto, a amostra T3 gerou tumoração palpável compatível com estroma hialino e necrose e as amostras T8, T12, T13 e T14 evoluíram com carcinoma invasivo, somente, em um dos grupos de tratamento, ou com ínfima proporção tumoral (2-8% de células malignas das amostras), inviabilizando estudo adicional. Portanto, 3 amostras originaram tumoração palpável diagnosticadas como carcinoma invasivo para análise (T7, T11 e T16) (Figura 3).

Figura 12. Seleção de amostras para estudo. Oito amostras foram consideradas para análise do peso dos camundongos, diâmetro dos xenoenxertos e calcemia (T3, T7, T8, T11, T12, T13, T14 e T16). Três amostras originaram tumoração palpável diagnosticadas como carcinoma invasivo para análise (T7, T11 e T16).

4.3. Efeitos colaterais do calcitriol em Camundongos Nude

No decorrer de 11 semanas de experimento não houve alterações do turgor da mucosa ocular, motricidade e comportamento dos camundongos.

Para avaliar o peso dos camundongos foram considerados 12 camundongos do grupo calcitriol e 10 do grupo controle, considerando somente os que puderam formar pares para comparação por amostra.

Foi observado que não houve alteração do peso no decorrer do tratamento os camundongos do grupo controle ($p=0,121$, Teste de Friedman) e do grupo tratado por calcitriol ($p=0,145$, Teste de Friedman). (Figuras 13 e 14, Anexo J e Anexo K, Tabela 12).

Figura 13. Peso semanal dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol. Início do tratamento na 6ª semana e fim do tratamento na 11ª semana.

Caracteriza-se, de fato, que os camundongos de ambos os grupos de tratamento mantiveram a massa corporal.

A dosagem do cálcio sérico foi avaliada em 10 camundongos controles e 12 tratados por calcitriol com a finalidade de observar possível efeito tóxico do calcitriol. O grupo tratado por calcitriol (8,17mg/dL, $\pm$ 1,75 mg/dL) apresentou maior calcemia em relação ao grupo de camundongos controle (6,40mg/dL, $\pm$ 1,08mg/dL) ($p=0,014$, Teste de Mann-Whitney), atendendo a expectativa em relação a atividade biológica do calcitriol (Figuras14 e Anexo K, Tabela 13) Foi observado que a maioria dos camundongos apresentaram calcemia dentro da faixa de normalidade entre 9,00 a 12,00 mg/dL (Suckow et al., 2001), demonstrando que a administração intra-tumoral, semanal, por 06 semanas, não causa toxicidade aguda em camundongos nude.

Figura 14. Cálcio sérico dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol. Início do tratamento na 6ª semana e fim do tratamento na 11ª semana.

4.4. Diâmetro do tumor em camundongos nude

Para avaliar o diâmetro tumoral foram considerados os mesmos 12 camundongos do grupo calcitriol e 10 do grupo controle.

Foi observado que não houve alteração do diâmetro no decorrer do tratamento os camundongos do grupo controle ($p=0,098$, Teste de Friedman) e do grupo tratado por calcitriol ($p=0,967$, Teste de Friedman). (Figuras 15 e Anexo K, Tabela 13). Procedemos a análise da presença de tumores na sexta semana após implante de tumor mamário (início do tratamento) ou presença de células malignas semana 11 de experimento em relação a tipo histológico, grau histológico, receptores hormonais (ER e PR), HER-2 e Ki67 da amostra implantada não encontramos associação.

Figura 15. Diâmetro semanal dos camundongos nude em tratamento por veículo ou calcitriol. Início do tratamento na 6ª semana e fim do tratamento na 11ª semana.

4.5. Características histológicas das amostras e xenoenxertos selecionados

A amostra T7 foi caracterizada como um carcinoma ductal invasivo, grau histológico 3, ER positivo, PR positivo, HER-2 negativo e Ki67 positivo em 99% das células malignas. As células malignas representaram 60% da amostra pré-xenoenxerto, enquanto, o xenoenxerto recuperado do animal demonstraram no grupo controle média de 70% de células malignas e no grupo tratado por calcitriol obteve em média 60% (Anexo N, Figura 16; Anexo O, Tabela 16).

A amostra T11 apresentou um carcinoma ductal invasivo, grau histológico 2, ER negativo, PR negativo, HER-2 positivo e Ki67 positivo em 85% das células malignas. A porcentagem de células malignas na amostra pré-enxerto foi de 60%. O xenoenxerto do grupo tratado pelo calcitriol apresentou, somente, carcinoma ductal in situ, enquanto que o tratado com veículo apresentou carcinoma ductal invasivo com 95% de células malignas (Anexo O, Tabela 16; Anexo P, Figura 17).

A amostra T16 foi um carcinoma ductal invasivo, grau histológico 3, ER positivo, PR positivo, HER-2 negativo e Ki67 positivo em 99% das células malignas. A amostra foi composta de 95% de células malignas. A porcentagem de células malignas foi menor no grupo tratado pelo calcitriol (98%) que o grupo controle (100%) (Anexo O, Tabela 16; Anexo Q, Figura 18).

4.6. Expressão de VDR nas amostras e xenoenxertos selecionados

Detectou-se expressão de VDR nas amostras T7, T11 e T16, tanto nuclear quanto citoplasmática, ocorrendo o mesmo em seus xenoenxertos, tanto os tratados por calcitriol quanto os controles. A expressão de RNAm do VDR não apresentou diferença entre o grupo controle e o tratado por calcitriol ($p=0,289$, Teste de Mann-Whitney) (Anexo N, Figura 16; Anexo P, Figura 17; Anexo N, Figura 16; Anexo Q, Figura 18; Anexo N, Figura 16; Figura 19; Anexo W, Tabela 17; Anexo Y, Tabela 18).

Figura 19. Expressão relativa do mRNA do VDR entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.

4.7. Avaliação da proliferação e apoptose nas amostras e xenoenxertos

Ao avaliar a proliferação, não foi encontrada, entre a amostra pré-enxerto, grupo controle e de tratamento com calcitriol, diferença da expressão de Ki67 ($p=0,148$, Teste de Kruskal-Wallis), e p27 ($p=0,736$, Teste de Kruskal-Wallis). O mesmo não se evidenciou, entre ambos os grupos de tratamento, para a incorporação do BrdU ($p=0,146$, Teste de Mann-Whitney) (Anexo R, Figura 20; Anexo S, Figura 21; Anexo T, Figura 22; Anexo W, Tabela 17). Mostrou-se tendência a correlação positiva entre a incorporação do BrdU e a expressão do Ki67 ($r=0,448$, $p=0,265$, $N=8$), a incorporação do BrdU e a expressão do p27 ($r=0,154$, $p=0,716$, $N=8$) e correlação negativa entre a expressão do Ki67 e a expressão do p27 ($r=-0,263$, $p=0,435$, $N=11$) (Figura 23).

Figura 23. Correlação de Pearson. (A) Correlação de Pearson entre a incorporação do BrdU e a expressão do Ki67. (B) Correlação de Pearson entre a expressão de CDKN1B e a expressão do Ki67. (C) Correlação de Pearson entre a expressão de BCL-2 e a expressão do Ki67. (D) Correlação de Pearson entre a expressão de Caspase 3 ativada e a expressão do Ki67. (E) Correlação de Pearson entre a expressão de CDKN1B e a incorporação do BrdU. (F) Correlação de Pearson entre a expressão de BCL-2 e a incorporação do BrdU. (G) Correlação de Pearson entre a expressão de Caspase 3 ativada e a incorporação do BrdU. (H) Correlação de Pearson entre a expressão de CDKN1B e a expressão do BCL-2. (I) Correlação de Pearson entre a expressão de Caspase 3 ativada e a expressão do BCL-2. (J) Correlação de Pearson entre a expressão de CDKN1B e a expressão do Caspase 3 ativada.

Ao analisar marcadores de apoptose não foi demonstrado, entre a amostra pré-enxerto, o grupo tratado por veículo e por calcitriol, diferença de expressão de BCL-2 ($p=0,952$, Teste de Kruskal-Wallis) e caspase 3 ativada ($p=0,659$, Teste de Kruskal-Wallis) (Anexo U, Figura 24, Anexo V, Figura 25 e Anexo X, Figura 26; Anexo W, Tabela 17). Porém, observou-se tendência a correlação positiva entre a expressão do BCL-2 e a expressão da caspase 3 ativada ($r=0,613$, $p=0,079$, $N=9$) (Figura 21).

Foi realizado, também, correlação entre marcadores de proliferação e apoptose e encontrou-se correlação positiva entre a expressão do p27 e a expressão do BCL-2 ($r=0,726$, $p=0,011$, $N=11$). Entretanto, houve tendência a correlação positiva entre a incorporação do BrdU e a expressão do BCL-2 ($r=0,284$, $p=0,495$, $N=8$), a expressão do p27 e a expressão da caspase 3 ativada ($r=0,302$, $p=0,429$, $N=9$) e a expressão do Ki67 e a expressão da Caspase 3 ativada ($r=0,183$, $p=0,637$, $N=9$) e correlação negativa entre a incorporação do BrdU e a expressão da Caspase 3 ativada ($r=-0,140$, $p=0,764$, $N=7$) e Ki67 e BCL-2 ($r=-0,037$, $p=0,913$, $N=11$) (Figura 23).

4.8. Avaliação da ativação genômica pelo Calcitriol

Observou-se aumento da expressão de RNAm de CYP24A1 nos xenoenxerto tratados com calcitriol, porém, não ocorreu diferença de expressão de RNAm de CYP24A1 entre os grupos de tratamento. (Figura 27; Anexo Y, Tabela 18).

Figura 27. Expressão relativa do mRNA do CYP24A1 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.

4.9. Avaliação da expressão dos genes envolvidos no controle da proliferação celular e potenciais alvos do Calcitriol

Ao avaliar a expressão do RNAm do TGF- β 2 pelo calcitriol, demonstrou expressão no grupo controle e no grupo do calcitriol, mas, não houve diferença entre o grupo controle e o tratado por calcitriol na expressão do RNAm do TGF- β 2 ($p = 0,513$, Teste de Mann-Whitney) (Figura 28; Anexo Y, Tabela 18).

Figura 28. Expressão relativa do mRNA do TGF-B2 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.

Quanto a expressão do RNAm do CDKN1B pelo calcitriol, observou-se expressão no grupo controle e no grupo do calcitriol, ocorrendo semelhança entre o grupo controle e o tratado por calcitriol ($p=0,564$, Teste de Mann-Whitney) (Figura 29; ; Anexo Y, Tabela 18).

Figura 29. Expressão relativa do mRNA do CDKN1A entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.

Em relação a expressão do RNAm do IGFBP3, encontrou-se expressão tanto no grupo controle e no grupo do calcitriol, sem distinção na magnitude da expressão entre o grupo controle e o tratado ($p=0,724$, Teste de Mann-Whitney) (Figura 30; Anexo Y, Tabela 18).

Figura 30. Expressão relativa do mRNA do IGFBP3 entre os xenoenxerto tratados com veículo e calcitriol.

5. DISCUSSÃO

O calcitriol tem efeito antiproliferativo em vários tipos de cânceres, inclusive mamário em concentrações suprafisiológicas, que podem causar hipercalcemia e hipercalcúria em seres humanos. Estes estudos priorizaram linhagens celulares, as quais são isentas da influência do microambiente tumoral. Milani e colaboradores utilizaram a cultura organotípica de tecido tumoral mamário, com microambiente preservado e demonstraram a indução da expressão do RNAm da CYP24A1 pelo calcitriol.

Nosso estudo propõe a avaliação do efeito da vitamina D em câncer mamário derivado de pacientes com em modelo experimental de transplante em camundongos imunodeprimidos, para avaliar os efeitos antiproliferativo e pró-apoptóticos do calcitriol.

Em um estudo clínico de fase I em pacientes de câncer avançado demonstrou mínima toxicidade com a dose máxima de 2,8 µg/kg de calcitriol, sendo esta dose utilizada como referência para o presente estudo (Beer et al., 2001), optando-se pela administração por injeção via intratumoral, na tentativa de se obter uma alta concentração no tumor.

O primeiro passo foi realizar um estudo para avaliar a toxicidade em camundongos Balb-c em tratamento com dose de 0,02, 0,04 e 0,06µg de calcitriol, semanal, via subcutânea, por 06 semanas. Ao termino, não houve toxicidade pela administração do calcitriol em todas as doses ao avaliar calcemia, hemograma, enzimas hepáticas, função renal e sem perda de peso ou alterações de comportamento ou de mucosa ocular, turgor da pele e motricidade, devido a boa tolerabilidade do camundongo aos tratamentos.

Assim, foi escolhido a dose de 0,06µg, pela segurança demonstrada, para ser utilizada no tratamento de tecido mamário transplantado (xenoenxerto), por 06 semanas, por via intratumoral semanal. A dose de 0,06µg de calcitriol apresentou-se bem tolerada pelo camundongo nude, com manutenção do peso e sem alterações de comportamento e mucosa. Apesar do cálcio sérico estar aumentado no grupo tratado pelo calcitriol, manteve-se dentro da faixa de normalidade, demonstrando que a

administração intra-tumoral, semanal, por 06 semanas, não comprometeu a homeostase da calcemia do camundongos nude.

Os camundongo foram também avaliados quanto a dimensão tumoral e observamos que não houve diferença entre o seu implante ao início do tratamentos. Alguns fatores podem ter influenciado a cinética de crescimento da dimensão dos xenoenxerto, como tipo e grau histológico, perfil molecular e a porcentagem de células, assim como o tempo decorrido entre a retirada do fragmento de tumor do paciente até o implante no camundongo.

Não foi observado diferença do diâmetro entre os camundongos tratados com veículo e calcitriol. Em avaliação clínica da ação do calcitriol n diâmetro tumoral mamário, por ultrassom, em pacientes tratadas com calcitriol via oral, durante 01 mês, não se identificou diferença do tamanho tumoral entre o início e o fim do tratamento, porém, identificou-se a redução da expressão do KI-67, nos tumores estudados, demonstrando efeito antiproliferativo (Lyra et al.,2008). O efeito antiproliferativo do calcitriol é amplamente observado em estudos in vivo e in vitro. Redução da dimensão do xenoenxerto de linhagem mamária (MCF-7) foi descrita em camundongos nude que receberam suplementação de calcitriol (5000UI/Kg) por via oral ou calcitriol 0,05µg por via intraperitoneal (Swami et al., 2011).

É fato que 9 das 17 amostras implantadas geraram pelo menos um ou mais xenoenxertos com carcinoma invasivo, tornando o modelo satisfatório para aquisição de tecidos para estudo. Os implantes tumorais foram realizados no panículo mamário, ortotopicamente, de camundongas nude fêmeas, com a intenção de reduzir a rejeição do tecido tumoral mamário pelo hospedeiro. O camundongo nude é desprovido da resposta imune mediada por células (alteração do gene FOXP1), por não produzir células T. Em contrapartida, Landis e colaboradores afirma o avanço alcançado pelo uso dos camundongos SCID, os quais apresentam imunodeficiência combinada severa devido a comprometimento da imunidade mediada pelas células B e T. Porém, é enfático em defender que imunossupressão adicional não é necessária para o estabelecimento do xenoenxerto e pode comprometer interações importantes do microambiente tumoral.

Lewis e colaboradores, agregaram ao seu estudo o uso de depósitos de estrogênio (pellet), instalados no subcutâneo do animal, assim, promovendo a proliferação do xenoenxerto. Não consideramos a necessidade de estímulo estrogênico adicional ao entender que o pâncreas mamário dos camundongos nude expressam aromatase, enzima que converte precursores androgênicos em estrogênio, assim favorecendo o efeito proliferativo em xenoenxertos mamários (Swami et al., 2011).

Parece que melhores taxas de estabelecimento do xenoenxerto estão relacionadas aos tumores ER negativo, PR negativo e HER-2 negativo (DeRose et al., 2013). Todavia, em nosso estudo 76,47% das amostras enxertadas foram ER positivas. Realizamos a análise da presença de tumores na sexta semana após implante de tumor mamário (início do tratamento) ou presença de células malignas semana 11 de experimento em relação a tipo histológico, grau histológico, receptores hormonais (ER e PR), HER-2 e Ki67 da amostra implantada não encontramos associação.

Os xenoenxertos recuperados foram submetidos a estudo imunohistoquímico e molecular. Contudo, somente três amostras puderam ser selecionadas para estudo comparativo, pois possuíam fragmentos teciduais prévios ao implante e de ambos os grupos de tratamento de tratamento. Todas as amostras selecionadas e seus xenoenxertos foram tipo histológico carcinoma ductal invasivo, a exceção de um xenoenxerto tratado com calcitriol caracterizado como carcinoma ductal in situ. As amostras apresentavam antes do implante Ki67 elevados. O estabelecimento do xenoenxerto foi bem sucedido e permitiu a avaliação molecular.

O calcitriol exerce sua ação através de seu receptor (VDR) e ao avaliar todas as amostras selecionadas foi detectada a expressão do VDR, assim, como foi demonstrada a presença deste receptor em seus xenoenxertos, mas ao comparar a expressão do gene do VDR não demonstrou diferença entre os grupos tratados por veículos quanto calcitriol. A presença do VDR nestes tumores poderia favorecer o efeito antiproliferativo e pró-apoptótico relacionado a ação da vitamina D, contudo, não foi observado este efeito.

A ativação genômica, foi caracterizada pela indução da CYP24A1, no grupo do calcitriol, entretanto não houve diferença entre ambos os grupos de tratamento. Também não houve diferença da expressão dos genes TGF- β 2, CDKN1B e o IGFBP3, em ambos os grupos de tratamento. Em avaliação da apoptose (caspase 3 ativa e BCL-2) e proliferação (Ki67, BrdU e CDKN1B), não foi encontrado diferença entre o grupos controle e o grupo calcitriol. Encontrou-se correlação positiva entre o p27 e BCL-2, mas seria esperado correlação inversa para a ação da vitamina D, com aumento da parada do ciclo e redução do efeito anti-apoptótico.

Entre as amostras selecionadas dois dos tumores eram ER positivos e um HER-2. Os tumores ER positivos são mais responsivos a vitamina D, porém podem apresentar alterações das vias de sinalização do VDR. Assim, Peng demonstrou que alterações das vias de sinalização do VDR podem conferir mais resistência aos efeitos antiproliferativos. Ele observou que os cofatores nucleares (CoRs, que causam a condensação da cromatina, e CoAs, que causa a abertura da cromatina) apresentavam com baixa expressão, ocasionando alteração da função do VDR em células MDAMB231 transfectadas com receptores de estrogênio, as quais tiveram resistência aos efeitos antiproliferativos da vitamina. A vitamina D provoca o reposicionamento dos cofatores Cors por CoAs, abrindo a cromatina e ativando a transcrição. Apesar, da resistência houve indução da CYP24A1, aspecto que o autor não elucidou (Peng 2007). Então, levanta-se a possibilidade de alteração das vias de sinalização do receptor da vitamina D, interferindo na ação da vitamina D em genes alvos (TGF- β 2, CDKN1B e o IGFBP3) e no não aoplamento destas vias as vias de apoptose.

Contudo, acredita-se que o modelo de xenoenxerto não exerça alterações nas vias de sinalização das células malignas. Zhang e colaboradores demonstrou que os xenoenxerto apresentam consistência genômica, transcriptômica e proteômica com o tumor de origem, inclusive em reimplantes, mostrando estabilidade histológica e funcional.

Apesar do calcitriol não ter induzido a expressão dos genes alvos, bem como a falta de efeitos antiproliferativo e pró-apoptóticos esperados, os

tecidos tumorais estudados possibilitaram a avaliação da expressão proteica e do RNAm, demonstrando este modelo ser um instrumento adicional de investigação pré-clínica.

6. CONCLUSÃO

As doses de calcitriol aplicadas ao experimento não levaram a toxicidade tanto nos camundongos balb-c nas doses de 0,02µg, 0,04µg e 0,06µg.

As doses de calcitriol aplicadas ao experimento não levaram a toxicidade tanto nos camundongos nude na dose de 0,06µg.

Ocorreu o estabelecimento de xenoenxerto em camundongos nude. Foi evidenciado a presença do receptor da vitamina D em todas as amostras selecionadas e seus xenoenxerto.

Houve indução da expressão do RNAm da CYP24A1.

Não houve diferença de expressão de marcadores de apoptose (caspase 3 ativada e BCL-2) entre os camundongos tratados por veículo e calcitriol.

Não houve diferença de expressão de marcadores de proliferação (Ki67, BrdU e CDKN1B) entre os camundongos tratados por veículo e calcitriol. Não houve diferença de expressão de genes alvos da vitamina D (TGF-β2, CDKN1B e o IGFBP3) entre os camundongos tratados por veículo e calcitriol.

Não foi observado efeito antiproliferativo ou pró-apoptótico do calcitriol em xenoenxertos de tumores derivados de pacientes.

7. ANEXOS

Anexo A, Tabela 2 – Peso dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
	g	g	g	g	g	g	g
Controle	18,53	18,53	20,66	22,05	22,87	22,59	22,47
Controle	19,06	19,06	21,10	22,70	22,31	22,21	21,96
Controle	18,70	18,70	20,88	21,78	21,68	22,11	22,33
VD (0,02µg)	22,80	21,50	23,80	23,66	25,16	24,75	24,92
VD (0,02µg)	22,60	22,25	24,33	24,11	24,01	24,04	22,39
VD (0,02µg)	23,15	21,98	24,09	24,18	24,79	24,24	23,73
VD (0,04µg)	23,20	22,25	23,87	24,07	24,42	24,07	24,14
VD (0,04µg)	23,10	21,85	24,55	25,54	25,04	25,41	24,64
VD (0,04µg)	24,05	24,07	25,54	25,00	25,15	25,17	24,38
VD (0,06µg)	22,25	21,30	23,87	24,91	23,78	24,00	24,78
VD (0,06µg)	22,18	21,47	23,53	23,57	23,04	23,28	22,44
VD (0,06µg)	21,16	21,10	22,78	23,64	23,49	23,35	22,68
VD (0,06µg)	21,20	20,66	22,67	23,65	22,87	23,15	23,04

VD – Calcitriol; g - Gramas

Anexo B, Tabela 3 – Cálcio sérico dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Solução Salina	6,50	6,50	7,00	7,50	8,00	8,50
Solução Salina	7,00	6,00	7,50	7,50	8,00	8,60
Solução Salina	6,50	6,00	7,00	7,00	8,50	8,90
VD (0,02µg)	7,00	7,00	7,50	8,30	9,00	10,10
VD (0,02µg)	7,50	7,50	8,00	8,60	9,50	10,30
VD (0,02µg)	7,00	8,00	8,50	8,00	9,00	10,00
VD (0,04µg)	8,00	8,50	8,00	8,50	9,50	10,00
VD (0,04µg)	8,50	8,50	8,50	8,90	9,60	10,50
VD (0,04µg)	8,00	9,00	9,00	9,10	10,00	10,50
VD (0,06µg)	8,50	9,00	9,00	9,60	10,10	10,30
VD (0,06µg)	8,00	8,50	9,50	9,60	10,00	10,30
VD (0,06µg)	8,50	9,00	9,50	9,80	10,50	10,60
VD (0,06µg)	9,00	9,00	9,50	9,50	10,50	10,80

VD – Calcitriol; mg/dL – Miligramas por decilitro

Anexo C, Tabela 4 – Uréia sérica dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Solução Salina	30,00	28,00	31,00	35,00	28,00	30,00
Solução Salina	31,00	30,00	31,00	32,00	30,00	31,00
Solução Salina	26,00	28,00	30,00	31,00	35,00	29,00
VD (0,02µg)	28,00	31,00	29,00	30,00	30,00	32,00
VD (0,02µg)	29,00	30,00	29,00	29,00	36,00	31,00
VD (0,02µg)	30,00	29,00	30,00	31,00	40,00	40,00
VD (0,04µg)	29,00	31,00	31,00	35,00	29,00	31,00
VD (0,04µg)	31,00	31,00	33,00	33,00	30,00	32,00
VD (0,04µg)	30,00	32,00	35,00	36,00	31,00	39,00
VD (0,06µg)	29,00	33,00	35,00	38,00	31,00	39,00
VD (0,06µg)	30,00	31,00	31,00	33,00	42,00	40,00
VD (0,06µg)	29,00	31,00	35,00	35,00	39,00	40,00
VD (0,06µg)	27,00	28,00	31,00	31,00	30,00	31,00

VD – Calcitriol; mg/dL – Miligramas por decilitro

Anexo D, Tabela 5 – Creatinina sérica dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
Solução Salina	0,80	0,80	0,80	0,90	0,90	0,80
Solução Salina	0,90	1,00	1,10	1,00	0,90	0,90
Solução Salina	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	0,90
VD (0,02µg)	1,00	1,10	1,10	1,10	1,00	1,20
VD (0,02µg)	1,00	1,10	1,00	1,00	0,90	1,10
VD (0,02µg)	0,90	1,00	1,00	1,10	1,00	1,20
VD (0,04µg)	0,80	0,90	0,90	1,00	1,00	1,00
VD (0,04µg)	0,90	0,80	0,90	1,00	0,90	1,10
VD (0,04µg)	1,00	1,00	1,00	1,10	1,00	1,00
VD (0,06µg)	1,10	1,00	1,00	1,00	0,90	0,90
VD (0,06µg)	1,00	1,10	1,10	1,00	0,90	0,90
VD (0,06µg)	0,90	0,90	1,00	1,10	1,00	0,90
VD (0,06µg)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,10	1,10

VD – Calcitriol; mg/dL – Miligramas por decilitro

Anexo E, Tabela 6 – Eritrócitos dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	10 ⁶ células/mm ³	10 ⁶ células/mm ³	10 ⁶ células/mm ³	10 ⁶ células/mm ³	10 ⁶ células/mm ³	10 ⁶ células/mm ³
Solução Salina	4,80	5,10	5,20	5,00	4,80	4,60
Solução Salina	4,85	5,20	5,10	5,00	4,85	4,45
Solução Salina	5,00	5,10	5,10	4,89	4,75	4,35
VD (0,02µg)	5,10	4,75	4,40	4,25	4,12	3,98
VD (0,02µg)	4,99	4,85	4,30	4,10	4,05	3,79
VD (0,02µg)	5,20	4,80	4,45	4,25	4,10	4,00
VD (0,04µg)	4,67	4,70	4,35	4,15	4,15	3,88
VD (0,04µg)	4,85	4,85	4,70	4,20	4,10	3,84
VD (0,04µg)	5,15	5,10	5,00	4,75	4,35	4,00
VD (0,06µg)	4,00	4,30	4,35	4,15	4,00	3,78
VD (0,06µg)	4,10	4,00	4,20	4,10	4,00	3,76
VD (0,06µg)	4,20	4,10	4,25	4,05	3,98	3,85
VD (0,06µg)	4,20	4,20	4,30	4,15	4,06	3,80

VD – Calcitriol; mm³ – Milímetros cúbicos.

Anexo F, Tabela 7 – Leucócitos dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	10 ³ células/µL	10 ³ células/µL	10 ³ células/µL	10 ³ células/µL	10 ³ células/µL	10 ³ células/µL
Solução Salina	8,10	8,00	8,50	8,30	8,60	8,80
Solução Salina	7,80	8,10	8,00	8,10	8,30	8,50
Solução Salina	7,50	7,80	7,60	8,00	8,10	8,30
VD (0,02µg)	6,70	7,80	8,10	8,60	9,10	10,00
VD (0,02µg)	8,00	9,10	9,30	9,90	10,10	10,00
VD (0,02µg)	6,50	7,00	7,50	7,60	8,10	9,30
VD (0,04µg)	5,80	6,30	6,90	7,50	7,90	8,60
VD (0,04µg)	6,30	6,10	6,60	7,00	7,30	8,10
VD (0,04µg)	6,80	6,90	7,10	7,30	7,40	7,90
VD (0,06µg)	7,00	6,80	7,30	7,50	7,70	8,30
VD (0,06µg)	7,10	7,00	7,20	7,10	7,60	8,00
VD (0,06µg)	7,70	7,50	7,90	8,10	8,30	8,40
VD (0,06µg)	6,90	6,80	7,00	7,00	7,60	8,10

VD – Calcitriol; µL – Microlitros.

Anexo G, Tabela 8 – Plaquetas dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	10 ³ células/μL	10 ³ células/μL	10 ³ células/μL	10 ³ células/μL	10 ³ células/μL	10 ³ células/μL
Solução Salina	930,00	938,00	963,00	979,00	989,00	986,00
Solução Salina	911,00	940,00	936,00	945,00	947,00	958,00
Solução Salina	887,00	896,00	901,00	938,00	971,00	991,00
VD (0,02μg)	938,00	987,00	991,00	1010,00	1081,00	1064,00
VD (0,02μg)	921,00	987,00	1030,00	1027,00	1191,00	1916,00
VD (0,02μg)	838,00	921,00	971,00	1008,00	1090,00	1101,00
VD (0,04μg)	910,00	998,00	1000,00	998,00	1000,00	991,00
VD (0,04μg)	829,00	901,00	991,00	1050,00	1071,00	1056,00
VD (0,04μg)	841,00	954,00	1030,00	1061,00	1085,00	1100,00
VD (0,06μg)	945,00	971,00	1002,00	1171,00	2005,00	1916,00
VD (0,06μg)	931,00	991,00	1018,00	1081,00	1690,00	2000,00
VD (0,06μg)	871,00	989,00	1022,00	1118,00	1345,00	1390,00
VD (0,06μg)	893,00	936,00	1008,00	1200,00	1740,00	1661,00

VD – Calcitriol; μL – Microlitros.

Anexo H, Tabela 9 – TGO dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l
Solução Salina	65,00	63,00	60,00	58,00	66,00	78,00
Solução Salina	73,00	69,00	70,00	69,00	75,00	86,00
Solução Salina	81,00	79,00	76,00	73,00	76,00	81,00
VD (0,02μg)	76,00	81,00	80,00	79,00	81,00	88,00
VD (0,02μg)	68,00	73,00	70,00	71,00	72,00	87,00
VD (0,02μg)	89,00	93,00	89,00	85,00	87,00	95,00
VD (0,04μg)	83,00	89,00	86,00	89,00	88,00	99,00
VD (0,04μg)	86,00	87,00	83,00	83,00	79,00	89,00
VD (0,04μg)	80,00	81,00	79,00	80,00	82,00	97,00
VD (0,06μg)	71,00	73,00	80,00	83,00	80,00	94,00
VD (0,06μg)	82,00	84,00	90,00	91,00	95,00	102,00
VD (0,06μg)	90,00	93,00	91,00	90,00	92,00	99,00
VD (0,06μg)	91,00	90,00	89,00	93,00	96,00	100,00

VD – Calcitriol; UI/l – Unidades internacionais por litro

Anexo I, Tabela 10 – TGP dos camundongos Balb-c

Balb/c	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35
	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l
Solução Salina	20,00	23,00	30,00	32,00	35,00	33,00
Solução Salina	19,00	24,00	29,00	31,00	30,00	31,00
Solução Salina	21,00	20,00	28,00	30,00	31,00	32,00
VD (0,02µg)	23,00	21,00	26,00	28,00	30,00	30,00
VD (0,02µg)	29,00	31,00	29,00	31,00	35,00	35,00
VD (0,02µg)	30,00	34,00	28,00	26,00	29,00	31,00
VD (0,04µg)	29,00	31,00	28,00	29,00	30,00	30,00
VD (0,04µg)	26,00	26,00	29,00	29,00	30,00	31,00
VD (0,04µg)	21,00	23,00	28,00	27,00	30,00	32,00
VD (0,06µg)	26,00	21,00	25,00	27,00	31,00	32,00
VD (0,06µg)	31,00	30,00	33,00	35,00	35,00	37,00
VD (0,06µg)	29,00	30,00	32,00	32,00	30,00	33,00
VD (0,06µg)	26,00	30,00	30,00	31,00	30,00	32,00

VD – Calcitriol; UI/l – Unidades internacionais por litro

Anexo J, Tabela 11 – Peso dos camundongos nude tratados por veículo

Paciente	PesoD0	PesoD7	PesoD14	PesoD21	PesoD28	PesoD35	PesoD42	PesoD49	PesoD56	PesoD63	PesoD70	PesoD77
3	21	21	21	21	21	21	21	21	20	21	20	19
3	20	20	20	20	19	19	19	18	19	19	18	18
7	19	20	20	20	20	21	21	21	20	22	23	22
7	20	20	21	21	21	22	23	21	20	21	23	23
8	22	23	23	23	22	21	20	23	23	25	22	22
11	19	17	16	19	22	22	24	23	23	22	24	22
12	16	15	14	17	19	17	21	21	20	20	20	20
13	14	17	20	23	20	21	22	22	22	21	22	22
14	19	20	17	18	19	19	19	20	18	19	21	20
16	19	19	18	19	19	18	18	20	21	20	20	19
16	20	20	21	21	19	20	20	21	21	19	20	20

Anexo K, Tabela 12 – Peso dos camundongos nude tratados por calcitriol

Tumor	PesoD0	PesoD7	PesoD14	PesoD21	PesoD28	PesoD35	PesoD42	PesoD49	PesoD56	PesoD63	PesoD70	PesoD77
1	18	18	18	19	19	19	19	18	19	19	19	19
1	19	19	19	19	20	20	20	19	20	20	20	20
1	18	19	18	18	19	19	19	18	19	19	19	19
3	21	21	21	21	21	21	20	20	20	20	20	20
3	21	22	22	22	21	21	21	22	21	21	21	21
3	20	20	20	21	20	20	20	19	20	19	19	20
5	22	22	21	21	21	21	22	25	23	20	23	21
5	23	23	24	24	24	24	25	25	24	23	24	22
7	20	20	20	21	21	22	21	20	21	20	23	22
7	20	19	20	20	20	21	21	20	20	19	22	21
7	20	21	21	21	21	23	23	23	22	23	24	23
8	22	23	22	22	22	21	21	22	23	24	22	22
9	19	19	19	19	19	19	21	19	20	19	19	21
10	22	22	22	21	21	20	22	22	22	22	23	24
11	18	19	20	22	24	20	22	19	20	22	22	23
12	14	15	16	18	20	18	20	19	18	17	18	19
13	14	17	21	23	21	21	21	22	22	22	22	22
14	18	22	19	20	20	21	22	20	19	20	20	20
16	19	18	18	19	18	19	19	18	20	21	18	19
17	20	18	20	22	21	20	20	22	21	20	19	19
18	20	18	20	22	22	22	22	22	19	18	20	20
19	21	20	19	20	22	20	21	21	22	21	20	20
20	20	20	20	20	19	20	22	21	21	22	21	21

Anexo K, Tabela 13 – Cálcio sérico dos camundongos nude com xenoenxerto tratados por veículo e calcitriol

Tumor	Controle	Calcitriol
1	6	7
1	8	13
1		10
3	7	11
3	7	10
3		9
5	8	8
5	8	8
7	8	6
7	6	5
7		10
8	7	8
9		11
10		10
11	6	8
12	6	7
13	7	8
14	6	9
15		7
16	4	7

Anexo L, Tabela 14 – Diâmetro dos xenoenxertos tratados por veículo

Paciente	DiametroD0	DiametroD7	DiametroD14	DiametroD21	DiametroD28	DiametroD35	DiametroD42	DiametroD49	DiametroD56	DiametroD63	DiametroD70	DiametroD77
3	15	11	11	10	12	12	10	11	12	10	11	14
3	15	15	13	12	12	12	10	11	10	11	11	13
7	5	5	6	6	6	6	5	6	5	5	6	6
7	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11
8	6	6	6	6	7	7	7	7	7	6	7	7
11	10	5	11	10	11	12	7	5	5	5	11	15
12	8	5	9	9	7	6	6	5	5	6	5	5
13	5	7	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6
14	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
16	10	10	10	8	8	7	8	9	9	10	10	9
16	9	9	6	6	5	0	0	0	0	0	0	0

Anexo M, Tabela 15 – Diâmetro dos xenoenxertos tratados por calcitriol

Tumor	DiametroD0	DiametroD7	DiametroD14	DiametroD21	DiametroD28	DiametroD35	DiametroD42	DiametroD49	DiametroD56	DiametroD63	DiametroD70	DiametroD77
1	8	6	8	8	11	11	11	11	11	10	10	11
1	8	6	9	8	10	9	8	9	9	9	9	9
1	8	6	7	12	10	9	8	9	7	7	7	7
3	15	13	13	10	12	12	11	12	14	15	13	11
3	15	11	11	12	12	12	12	14	15	13	14	14
3	15	13	15	15	15	15	13	15	14	15	13	10
5	12	12	7	8	7	7	8	6	6	7	7	7
5	8	7	9	10	9	10	11	11	10	10	10	10
7	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	8	7
7	12	12	12	12	12	11	11	11	11	10	9	14
7	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	6	6
8	6	6	6	6	7	7	7	7	6	6	6	6
9	6	6	6	6	6	7	7	7	6	7	7	6
10	7	7	7	7	8	8	8	7	6	7	7	7
11	10	5	11	10	9	10	11	11	10	10	10	10
12	7	5	10	8	6	5	5	6	6	6	5	7
13	5	7	9	7	6	6	5	7	6	6	6	6
14	5	6	4	5	5	5	5	4	5	5	5	5
16	10	10	9	9	8	7	6	6	8	10	14	11
19	12	11	8	7	4	4	0	0	0	0	0	0
20	10	8	7	6	4	0	0		0	0	0	0

(Anexo N, Figura 16)

Figura 16. H&E e expressão de VDR por imunohistoquímica do tumor 7. (A) H&E de tumor mamário pré-implante. (B) Expressão de VDR por imunohistoquímica. (C) H&E do xenoenxerto tratado por veículo. (D) H&E do xenoenxerto tratado por Calcitrol.

Anexo O, Tabela 16 – Características dos xenoenxertos

TUMOR	XENOENXERTO	HISTOLOGICO	GRAU	TUMOR %	ESTROMA %
1	T1D1	Estroma Hialino			
	T1D2	CDI	2	10	90
	T1D3	Infiltrado Inflamatório			
	T1C1	Estroma Hialino			
	T1C2	Estroma Hialino			
3	T3D1	Estroma Hialino			
	T3D2	Estroma Hialino			
	T3D3	Estroma Hialino			
	T3C1	Necrose			
	T3C2	Necrose			
5	T5D1	Linfonodo			
	T5D2	Linfonodo			
	T5C1	Estroma Hialino			
	T5C2	Estroma Hialino			
7	T7D1	CDI	3	40	60
	T7D2	CDI	3	80	20
	T7D3	Estroma Hialino			
	T7C2	CDI	3	70	30
	T7C3	CDI	3	70	30
8	T8D1	Estroma Hialino			
	T8C1	CDI	2	5	95
9	T9D1	Estroma Hialino			
10	T10D1	Estroma Hialino			
11	T11D1	CDIS			
	T11C1	CDI	3	95	5
12	T12D1	Infiltrado Inflamatório			
	T12C1	CDI	2	2	98
13	T13D1	CDI	2	5	95
	T13C1	CDI	2	8	92
14	T14D1	Coloide	2	2	98
	T14C1	Infiltrado Inflamatório			
15	T15C1	CDI	2	5	95
16	T16D1	CDI	3	98	2
	T16C1	CDI	3	100	0

Anexo P, Figura 17. H&E e expressão de VDR por imunohistoquímica do tumor 11. (A) H&E de tumor mamário pré-implante. (B) Expressão de VDR por imunohistoquímica. (C) H&E do xenoenxerto tratado por veículo. (D) H&E do xenoenxerto tratado por Calcitrol.

Anexo Q, Figura 18. H&E e expressão imunohistoquímica do VDR do tumor 16. (A) H&E de tumor mamário pré-implante. (B) Expressão de VDR por imunohistoquímica. (C) H&E do xenoenxerto tratado por veículo. (D) H&E do xenoenxerto tratado por Calcitrol.

Anexo R, Figura 20. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 7. (A) Expressão do Ki67 no pré-enxerto. (B) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por calcitriol. (D) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por veículo. (E) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por calcitriol. (F) Expressão do CDKN1B no pré-enxerto. (G) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por veículo. (H) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por calcitriol.

Anexo S, Figura 21. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 11. (A) Expressão do Ki67 no pré- enxerto. (B) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por calcitriol. (D) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por veículo. (E) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por calcitriol. (F) Expressão do CDKN1B no pré-enxerto. (G) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por veículo. (H) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por calcitriol.

Anexo T, Figura 22. Imunohistoquímica da expressão do Ki67, CDKN1B e da incorporação do BrdU do tumor 16. (A) Expressão do Ki67 no pré-enxerto. (B) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do Ki67 no xenoenxerto tratado por calcitriol. (D) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por veículo. (E) Expressão da incorporação do BrdU no xenoenxerto tratado por calcitriol. (F) Expressão do CDKN1B no pré-enxerto. (G) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por veículo. (H) Expressão do CDKN1B no xenoenxerto tratado por calcitriol.

Anexo U, Figura 24. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 7. (A) Expressão da Caspase 2 ativada no pré-enxerto. (B) Expressão do Caspase 2 ativada no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do Caspase 2 ativada no xenoenxerto tratado por calcitriol. (D) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por veículo. (E) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por calcitriol.

Anexo V, Figura 25. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 11. (A) Expressão do BCL-2 no pré-enxerto. (B) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por calcitriol.

Anexo X, Figura 26. Imunohistoquímica da expressão da Caspase 3 ativada e BCL-2 do tumor 16. (A) Expressão da Caspase 2 ativada no pré-enxerto. (B) Expressão do Caspase 2 ativada no xenoenxerto tratado por veículo. (C) Expressão do Caspase 2 ativada no xenoenxerto tratado por calcitriol. (D) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por veículo. (E) Expressão do BCL-2 no xenoenxerto tratado por calcitriol.

ANEXO W, TABELA 17 – Imunohistoquímica nas amostras e xenoenxertos selecionados

Tumor	VDR	Ki67	BrdU	P27	Caspase	BCL-2	Anexina
PRÉ-T7	95%	99%	NR	80%	20%	99%	90%
T7C2	NR	98%	20%	60%	60%	90%	70%
T7C3	50%	80%	15%	60%	60%	95%	70%
T7D1	60%	60%	25%	70%	30%	75%	40%
T7D2	NR	90%	75%	80%	10%	99%	80%
PRÉ-T11	100%	85%	NR	75%	NR	1%	80%
T11C	50%	50%	20%	80%	NR	NR	20%
T11D	30%	60%	10%	98%	0%	70%	5%
PRÉ-T16	60%	99%	NR	10%	1%	0%	95%
T16C	100%	70%	0%	2%	0%	0%	70%
T16D	2%	85%	40%	0%	5%	0%	100%

NV - Não viável; ST – Sem Tumor; NR – Não realizado

ANEXO Y, Tabela 18 – Expressão relativa de genes

GENES	TRATAMENTO	N	Média
CYP24A1	Controle	4 [*]	0,579 ± 0,614
	Calcitriol	4 [*]	10,045 ± 11,245
VDR	Controle	3 ^{**}	1,956 ± 0,627
	Calcitriol	4 [*]	2,237 ± 3,322
TGF-β2	Controle	3 ^{**}	0,974 ± 0,932
	Calcitriol	3 ^{**}	0,600 ± 0,299
CDKN1B	Controle	4 [*]	0,666 ± 0,747
	Calcitriol	4 [*]	0,620 ± 0,643
IGFBP3	Controle	3 ^{**}	0,069 ± 0,061
	Calcitriol	3 ^{**}	0,116 ± 0,115

*4 casos (7C2; 7C3; 7D1; 7D2; 11C; 11D; 16C; 16D)

**3 casos (7C2; 7C3; 7D1; 7D2; 11C; 11D)

ANEXO Z. CAMUNDONGO (FIGURA 31)

8. REFERÊNCIAS

Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of post-menopausal breast cancer--results of a large case-control study. *Carcinogenesis*. 2008 Jan;29(1):93-9

Ainsleigh HG. Beneficial effects of sun exposure on cancer mortality. *Prev Med*. 1993; 22:132-40. Review

Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*. 2000; 25:144-6.

Anderson LN, Cotterchio M, Kirsh VA, Knight JA. Ultraviolet sunlight exposure during adolescence and adulthood and breast cancer risk: a population-based case-control study among Ontario women. *Am J Epidemiol*. 2011 Aug1;174(3):293-304. Epub 2011 Jun 9. PubMed PMID: 21659351.

Barbosa EM, Nonogaki S, Katayama ML, Folgueira MA, Alves VF, Brentani MM. Vitamin D3 modulation of plasminogen activator inhibitor type-1 in human breast carcinomas under organ culture. *Virchows Arch*. 2004; 444:175-82.

Bareis P, Kallay E, Bischof MG, Bises G, Hofer H, Potzi C, Manhardt T, Bland R, Cross HS. Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase, of 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase, and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: effects of epidermal growth factor and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *Exp Cell Res*. 2002; 276: 320-7.

Barger-Lux MJ, Heaney RP, Dowell S, Chen TC, Holick MF. Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int*. 1998; 8: 222-30.

Beer TM, Munar M, Henner WD. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer*. 2001 Jun 15; 91(12): 2431-9.

Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, Redfern CH, Fehrenbacher L, Saleh MN, Waterhouse DM, Carducci MA, Vicario D, Dreicer R, Higano CS, Ahmann FR, Chi KN, Henner WD, Arroyo A, Clow FW; ASCENT Investigators. Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: a report from the ASCENT Investigators. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 20;25(6):669-74

Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14: 1991-7.

Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricker A, Eberle C, Barnhill R. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 195-9

Bortman P, Folgueira MA, Katayama ML, Snitcovsky IM, Brentani MM. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Jan;35(1):1-9. Review.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*. 1995; 16: 200-57. Review.

Bower M, Colston KW, Stein RC, Hedley A, Gazet JC, Ford HT, Combes RC. Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet*. 1991 Mar 23;337(8743):701-2. Erratum in: *Lancet* 1991; 337: 1618.

Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, von Eschenbach AC, Chung LW. Fibroblast-mediated acceleration of human

epithelial tumor growth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jan;87(1):75-9. PubMed PMID: 2296606; PubMed Central PMCID: PMC53202.

Canadian Council on Animal Care. Anesthesia, Chapter XI. Euthanasia, Chapter XII. [CCAC, guide vol 1, (2nd Ed.) 1993] Edited by: Ernest D. Olfert, DVM; Brenda M. Cross, DVM; and A. Ann McWilliam.

Chakravarti S, Collins WP, Forecast JD, Newton JR, Oram DH, Studd JW. Hormonal profiles after the menopause. Br Med J. 1976; 2: 784-7.

Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ Vitamin D3 and calcium To prevent hip fractures in the elderly women N Engl J Med. 1992; 327: 1637-42.

Chavhan SG, Brar RS, Banga HS, Sandhu HS, Sodhi S, Gadhave PD, Kothule VR, Kammon AM. Clinicopathological Studies on Vitamin D(3) Toxicity and Therapeutic Evaluation of Aloe vera in Rats. Toxicol Int. 2011 Jan;18(1):35-43. PubMed PMID: 21430919; PubMed Central PMCID: PMC3052582.

Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Pettinger M, Wactawski-Wende J, Rohan T, Rossouw J, Lane D, O'Sullivan MJ, Yasmeen S, Hiatt RA, Shikany JM, Vitolins M, Khandekar J, Hubbell FA; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2008 Nov 19;100(22):1581-91.

Colston KW, U. Berger, R.C. Coombes, Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation, Lancet. 1989; 28: 188-191.

Cooper L, Clifton-Bligh PB, Nery ML, Figtree G, Twigg S, Hibbert E, Robinson BG. Vitamin D supplementation and bone mineral density in early postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 2003 May;77(5):1324-9.

Crew KD, Gammon MD, Steck SE, Hershman DL, Cremers S, Dworakowski E, Shane E, Terry MB, Desai M, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM.

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

Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med*. 1997; 337: 670-6.

de Lyra EC, da Silva IA, Katayama ML, Brentani MM, Nonogaki S, Goes JC, Folgueira MA. 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ serum concentration and breast tissue expression of 1 α -hydroxylase, 24-hydroxylase and Vitamin D receptor in women with and without breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Aug;100(4-5):184-92.

Dobrolecki LE, Landis MD, Zhang X, Huang J, Lai Q, Wong H, Hollier B, Mani S, Contreras A, Chang JC, and Lewis MT. Novel stably transplantable xenograft models of human breast cancer for evaluation of experimental therapeutics. 2009 San Antonio Breast Cancer Symposium. Available at

Eigeliene N, Harkonen P, Erkkola R. Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on morphology, proliferation and apoptosis of human breast tissue in organ cultures. *BMC Cancer*. 2006 Oct 18;6:246

Eil C, Liberman UA, Marx SJ. The molecular basis for resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D: studies in cells cultured from patients with hereditary hypocalcemic 1,25(OH)₂D₃-resistant rickets. *Adv Exp Med Biol*. 1986; 196: 407-22.

Eisman JA, Macintyre I, Martin TJ, Frampton RJ, King RJ. Normal and malignant breast tissue is a target organ for 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1980; 13: 267-72

Eisman JA, Suva LJ, Martin TJ, Significance of 1,25 dihydroxy vitamin D₃ receptor in primary breast cancer, *Cancer Res*. 1986; 46: 5406-5408.

Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zeveren A, Peelman LJ. Development of a new set of reference genes for normalization

of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. BMC Biotechnol. 2006 Oct 9;6:41.

Escaleira MT, Brentani MM, Vitamin D3 receptor (VDR) expression in HC-11 mammary cell: regulation by growth-modulatory agents, differentiation, and Ha-ras transformation, Breast Cancer Reserch and Treatment. 1999; 54: 123-133.

Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Local regulation of human breast xenograft models. J Cell Physiol. 2010 Sep;224(3):795-806. doi:10.1002/jcp.22190. PubMed PMID: 20578247; PubMed Central PMCID: PMC2897719.

Friedrich,M.; Reichrath,J.; Chen,T.; Gherson,I.; Tilgen,W.; Schmidt,W.; Holick,M.F. Expression of 1 α Hydroxylase for 25-Hydroxyvitamin D3 in Breast Cancer . Eleventh Workshop on Vitamin D, 27 de maio a 1 de junho,2000, EUA, Nashville, Tennessee, Abstracts, p. 38.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. Am J Public Health. 2006 Feb;96(2):252-61. Review.

Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. Prev Med. 1990; 19: 614-22

Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N. Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. J Clin Oncol. 2009 Aug 10;27(23):3757-63.

Grant WB. An ecological study of cancer mortality rates in the United States with respect to solar ultraviolet-B doses, smoking, alcohol consumption and urban/rural residence. Dermatoendocrinol. 2010 Apr;2(2):68-76. PubMed PMID:21547102; PubMed Central PMCID: PMC3081680.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1474-81. PubMed PMID: 10334533.

Holick MF, Kleiner-Bossaller A, Schnoes HK, Kasten PM, Boyle IT, De Luca HF. 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃. A metabolite of vitamin D₃ effective on intestine, *J Biol Chem*. 1973; 248: 6691-96.

Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*. 1981 Jul;77(1):51-8.

Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 Sep;92(1):49-59.

Hussain-Hakimjee EA, Peng X, Mehta RR, Mehta RG. Growth inhibition of carcinogen-transformed MCF-12F breast epithelial cells and hormone-sensitive BT-474 breast cancer cells by 1 α -hydroxyvitamin D₅, *Carcinogenesis*. 2006 Mar;27(3):551-9.

Inaba M, Okuno S, Koyama H, Nishizawa Y, Morii H. Effects of uremic serum on 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1991; 37 Suppl: S93-103.

Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS. Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk *Public Health Nutrition*. 1999; 2: 283-291.

Katayama MLH, Pasini FS, Folgueira MAAK, Snitcovsky IFML, Brentani MM, Molecular targets of 1,25(OH)₂D₃ in HC11 normal mouse mammary cell line, *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003; 84: 57-69.

Kerner SA, Scott RA, Pike JW. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 4455-9.

Kim HJ, Lee YM, Ko BS, Lee JW, Yu JH, Son BH, Gong GY, Kim SB, Ahn SH. Vitamin D deficiency is correlated with poor outcomes in patients with luminal-type breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jul;18(7):1830-6. Epub 2010 Dec 14. PubMed PMID: 21573699; PubMed Central PMCID: PMC3115047.

Konety BR, Somogyi G, Atan A, Muindi J, Chancellor MB, Getzenberg RH. Evaluation of intraprostatic metabolism of 1, 25-dihydroxyvitamin D (3) (Calcitriol) using a microdialysis technique. *Urology*. 2002 Jun; 59(6): 947-52.

Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011 Feb 10;51:311-36. Review. PubMed PMID: 20936945.

Landis MD, Lehmann BD, Pietersen JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res*. 2013 Jan 22;15(1):201. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23339383; PubMed Central PMCID: PMC3672825.

Lewis MT. ES2-3: Patient-derived xenograft models for preclinical breast cancer research: Not just "Basal" anymore. *Cancer Res* 2011;71(24 Suppl):Abstract nr ES2-3.

Li Z, Huang X, Li J, Ke Y, Yang L, Wang Y, Yao L, Lu Y. Human breast carcinoma xenografts in nude mice. *Chin Med J (Engl)*. 2002 Feb; 115(2): 222-6.

Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996; 10: 142-153.

Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, Colston W. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentration, vitamin D receptor genotype

and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 1164-69.

Lyra, E. C., Katayama, M. H., Basso, R. A., Assis, P. E., Brentani, M., Alves, E. M., Neto, J. Guidugli, Milani, C., Goes, J. S., Folgueira, M. A. Ki67 tumor expression in breast cancer post-menopausal patients following calcitriol supplementation *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008 26: 14612.

Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2000 Aug 4;87(3):214-20.

Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, de Plater L, Guyader C, De Pinieux G, Judde JG, Rebucci M, Tran-Perennou C, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Delattre O, Diéras V, Poupon MF. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 1; 13(13): 3989-98.

Matsui I, Hamano T, Tomida K, Inoue K, Takabatake Y, Nagasawa Y, Kawada N, Ito T, Kawachi H, Rakugi H, Imai E, Isaka Y. Active vitamin D and its analogue, 22-oxacalcitriol, ameliorate puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Aug;24(8):2354-61. Epub 2009 Mar 18. PubMed PMID:19297354.

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*. 1997; 82: 118-22

Milani C, Welsh J, Katayama ML, Lyra EC, Maciel MS, Brentani MM, Folgueira MA. Human breast tumor slices: A model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 Mar 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20307664.

Muindi JR, Peng Y, Potter DM, Hershberger PA, Tauch JS, Capozzoli MJ, Egorin MJ, Johnson CS, Trump DL. Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: results from a phase 1 trial of calcitriol and paclitaxel. Clin Pharmacol Ther. 2002 Dec;72(6):648-59. PubMed PMID: 12496746.

Murillo G, Mehta RG. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1 α -hydroxyvitamin D₃. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005; 97(1-2): 129-36.

Nakagawa K, Sasaki Y, Kato S, Kubodera N, Okano T. 22-Oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer. Carcinogenesis. 2005 Jun;26(6):1044-54.

Ohyama Y, Ozono K, Uchida M, Shinki T, Kato S, Suda T, Yamamoto O, Noshiro M, Kato Y. Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. J Biol Chem. 1994; 269: 10545-50.

Ooms ME, Roos JC, Bezemer PD, van der Vijgh WJ, Bouter LM, Lips P. prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial. J Clin Endocrinol Metab. 1995; 80: 1052-8.

Peng X, Jhaveri P, Hussain-Hakimjee EA, Mehta RG. Overexpression of ER and VDR is not sufficient to make ER-negative MDA-MB231 breast cancer cells responsive to 1 α -hydroxyvitamin D₃. Carcinogenesis. 2007 May;28(5):1000-7. Epub 2006 Nov 27. PubMed PMID: 17130524.

Palmieri C, MacGregor T, Girgis S, Vigushin D. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in early and advanced breast cancer. J Clin Pathol. 2006 Dec;59(12):1334-6.

Schwartz GG, Hulka BS Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). Anticancer Res. 1990; 10: 1307-11

Segersten U.; Hewison M.; Hellman P.; Carling T.; Akerstrom G.; Westin G. 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase is expressed in the parathyroid

glands. Eleventh Workshop on Vitamin D 27 de maio a 1 de junho,2000-EUA, ABSTRACTS.

Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Actions of vitamin D₃, analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 1995 Jan;136(1):20-6.

Smedby KE, Hjalgrim H, Melbye M, Torrang A, Rostgaard K, Munksgaard L, Adami J, Hansen M, Porwit-MacDonald A, Jensen BA, Roos G, Pedersen BB, Sundstrom C, Glimelius B, Adami HO. Ultraviolet radiation exposure and risk of malignant lymphomas. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 199-209.

Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1339-45

Sobral RA, Honda ST, Katayama ML, Brentani H, Brentani MM, Patrão DF, Folgueira MA. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and RSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. *Acta Vet Scand*. 2008 Jul 4;50:27.

Suckow MA Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse. 2001

Swami S, Krishnan AV, Feldman D. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 3371-9.

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*. 2003; 80: 49-62

Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA, Feldman D. Inhibitory effects of calcitriol on the growth of MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice: selective modulation of aromatase expression in

vivo. *Horm Cancer*. 2011 Jun;2(3):190-202. PubMed PMID: 21686077; PubMed Central PMCID: PMC3114631.

Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Albertelli MA, Feldman D. Dietary vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology*. 2012 Jun;153(6):2576-87. Epub 2012 Mar 27. PubMed PMID: 22454149; PubMed Central PMCID: PMC3359605.

Tilyard MW, Spears GF, Thomson J, Dovey S, Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium, *N Engl J Med*. 326 (1992) 357-362 van den Bemd GJ, Pols HA, van Leeuwen JP. Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs. *Curr Pharm Des*. 2000; 6: 717-32.

Urata YN, Lyra EC, Katayama ML, Basso RA, Assis PE, Cardoso AP, Roela RA, Nonogaki S, Sampaio Góes JC, Brentani MM, Folgueira MA. Calcitriol supplementation effects on Ki67 expression and transcriptional profile of breast cancer specimens from post-menopausal patients. *Clin Nutr*. 2013 Apr 9. doi:pil:S0261-5614(13)00101-5. 10.1016/j.clnu.2013.04.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23623780.

Valrance ME, Brunet AH, Welsh J. Vitamin D receptor-dependent inhibition of mammary tumor growth by EB1089 and ultraviolet radiation in vivo. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4887-94. Epub 2007 Jul 12. PubMed PMID: 17628009.

Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Pottern L, Prentice RL, Robbins J, Rohan TE, Sarto GE, Sharma S, et al; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2006 ;354: 684-96. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006; 354: 1102.

Wang YZ, Li H, Bruns ME, Uskokovic M, Truitt GA, Horst R, Reinhardt T, Christakos S, Effect of 1,25,28-trihydroxyvitamin D₂ and 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ on intestinal calbindin-D_{9K} mRNA and protein: is there a correlation with intestinal calcium transport?, *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 1483-1490.

Wang JY, Swami S, Krishnan AV, Feldman D. Combination of calcitriol and dietary soy exhibits enhanced anticancer activity and increased hypercalcemic toxicity in a mouse xenograft model of prostate cancer. *Prostate.* 2012 Mar 27. doi: 10.1002/pros.22516. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22457201; PubMed Central PMCID: PMC3389566.

Wilson JD & Foster DW. *Williams Textbook of Endocrinology*, 8th ed. 1992.

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.* 1999; 38: 2654-60.

Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, Landis MD, Wiechmann L, Schiff R, Giuliano M, Wong H, Fuqua SW, Contreras A, Gutierrez C, Huang J, Mao S, Pavlick AC, Froehlich AM, Wu MF, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Chen ES, Zuloaga P, Shaw CA, Rimawi MF, Perou CM, Mills GB, Chang JC, Lewis MT. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res.* 2013 Aug 1;73(15):4885-97. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4081. Epub 2013 Jun 4. PubMed PMID: 23737486; PubMed Central PMCID: PMC3732575.