
Eduardo Carneiro de Lyra

**Influência da vitamina D na proliferação e na
expressão de genes alvo em câncer de mama de
pacientes pós-menopausadas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

São Paulo
2008

“Domine, adauge nobilis fidem”

Thomas More

Dedicatória

-

Dedico este trabalho a minha família , aos meus amigos da faculdade,
do IBCC e as minhas pacientes.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Dra Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira pela perfeição na condução e no entendimento deste trabalho e a sua disponibilidade em atender todas as dúvidas que surgiram, meu muito obrigado.

À Prof. Dra Maria Mitzi Brentani agradeço pelo incentivo e atenção a mim deferidas e pelas palavras de orientação do trabalho e da vida.

À Dra Maria Lucia Hirata Katayama agradeço sua especial atenção e ajuda na elaboração deste trabalho e seu sorriso sempre maternal a nos acolher.

A amiga Cíntia Milani agradeço pela colaboração no laboratório e apoio sempre que o desânimo surgia.

Aos amigos do laboratório que me acolheram desde o primeiro momento e ajudaram durante a elaboração do mesmo: Patrícia B. Rozenchan, Flavia R. R. Mangone, Fátima S. Pasini, Rosimeire Ap. Roela, Simone Maistro, Sra Maria José G. Benevides, Sra Cristina P. Grandal

À especial atenção da Sra Elizangela Nirvando Dias e a Sra Rosilene Arruda....

Ao Dr Ricardo Basso pela colaboração na leitura de imunohistoquímica.

À Dra Eloá M de Freitas Alves na coleta de todos os tumores.

À Dra Ana Paula Shor pela colaboração na leitura de imunohistoquímica

Ao Paulo E. Assis no exame de ultrassonografia das pacientes.

Agradecimentos

Aos médicos do departamento de imagem do IBCC em nome de todos o Dr Carlos Aranha pela acolhida em seu departamento

Ao Dr Marcelo Alvarenga Calil diretor do IBCC pela ajuda e colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus amigos médicos do IBCC que me apoiaram e ajudaram neste trabalho em especial Dra Cíntia Flores , Dra Stana Helena Giorgi Grosso , Dra Karina , Alice Ap. Francisco, Rafael Martini, Eurípides Carlos Filho,

À enfermeira Débora Montezelo e enfermeiro Alexandre Pereira pelo apoio.

Ao Sr Valentim Biazotti diretor administrativo do IBCC pelo apoio e colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado

Aos funcionários do IBCC em nome a Sra Fernanda e Sra Gislei

A Dra Célia Tosello de Oliveira pela ajuda e orientação este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Dr João Guidugli Neto e Dra Débora Krueman Zveibil que mostraram o caminho para leitura das lâminas e abriram seu laboratório para mim como se fosse minha casa para que pudesse lá com todo sossego ler as laminas de Ki67, o meu muito obrigado

Ao Prof Antonio Rosas que apoio-me para seguir este caminho de ciência.

Ao mestre Prof Dr João Sampaio Góes Jr. com emoção e saudade agradeço a orientação para seguir este caminho, muito obrigado!

Agradecimentos

Ao amigo Prof Dr João Carlos Sampaio Góes agradeço o apoio e colaboração para realização deste estudo que foi feito no IBCC graças a sua visão atual da medicina.

Agradeço a equipe de trabalho da Clínica Sampaio Góes Dr Renato C. P. Gomes, Dr Waldyr M. Oliva Filho, Sra Marilurdes Ap. Lopes, Sra Jeane R. Loureiro, Sra Andréia , Sra Luciana

Agradeço especialmente a Dra Renata Sampaio Góes pela ajuda vital que me forneceu para que fosse possível a realização desse trabalho me cobrindo o tempo todo, muito obrigado!

À FAPESP processo nº 2007/04799-2 pelo financiamento do projeto.

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Resumo.....	v
Summary.....	vi
1-Introdução.....	pág 1
2-Objetivos.....	pág 10
3-Casuística.....	pág 12
4-Métodos.....	pág 16
5-Resultados.....	pág 33
6-Discussão.....	pág 48
7-Referências Bibliográficas.....	pág 58
8-Anexo.....	pág 70

Lista de Figuras

Figura 01.....pág 22

Identificação das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S em gel de agarose de amostras. A(antes da suplementação), P (após suplementação com 1,25(OH)₂D₃ – 0,25µg/d).

Figura 02.pág 24

Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de PCR em tempo real.

Figura 03.....pág 32

Curva de eficiência representativa de um transcrito.

Figura 04.pág 36

Concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)₂D₃ pré e pós suplementação de calcitriol 0,25 ou 0,50 µg/dia.

Figura 05.pág 37

Concentração sérica individual de 1,25(OH)₂D₃ antes (pré) e 25(OH)₂D₃ após (pós) suplementação de calcitriol 0,25 (l. tracejada)ou 0,50 µg/dia (l. contínua).

Figura 06.pág 39

Concentração sérica de 25(OH)₂D₃ (ng/ml) e 1,25(OH)₂D₃ (pg/ml) antes e após suplementação de calcitriol 0,25 ou 0,50 µg/dia.

Figura 07.....pág 40

Diâmetro tumoral (mm) (DT pré) e pos (DT pós) suplementação de calcitriol 0,25 ou 0,50 µg/dia, avaliados pelo ultra-som.

Figura 08.pág 41

Dimesão tumoral (mm) ao exame físico pré biópsia (DTC) e ao exame histopatológico do produto da peça cirúrgica (DTP).

Figura 09.pág 43

Expressão de Ki67 avaliada por ensaio imuno-histoquímico em amostras de câncer de mama pré e pós suplementação de calcitriol 0,25 µg/dia (pacientes 1 -10) ou 0,50 µg/dia (pacientes 11-24).

Figura 10.pág 44

Expressão de Ki67 em amostras de câncer de mama (A) antes da suplementação e (B) após suplementação com calcitriol (aumento 10x).

Figura 11.pág 45

Varição percentual da expressão de Ki67 (%) entre amostas pré e pós suplementação em relação à dose total de calcitriol recebida (tempo x dose).

Figura 12.....pág 46

Expressão relativa de genes avaliada por RT-PCR em tempo real em amostras de câncer de mama coletadas antes e após suplementação com calcitriol.

Lista de Tabelas

Tabela 01.....pág 27

Desenho dos *primers* dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto.

Tabela 02.pág 35

Característica das pacientes.

Tabela 03.pág 35

Característica das pacientes e dos tumores.

Tabela 04.pág 36

Concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pré e pós suplementação de calcitriol.

Tabela 05.....pág 38

Concentração sérica de $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/ml) antes e após suplementação de calcitriol 0,25 ou 0,50 $\mu\text{g}/\text{dia}$.

Tabela 06.....pág 42

Dimensão tumoral avaliada à USG da mama antes e após suplementação de calcitriol.

Tabela 07.....pág 42

Expressão de Ki67 pré e pós suplementação de calcitriol.

Tabela 08.....pág 46

Expressão relativa de genes avaliada por RT-PCR em tempo real em amostras de câncer de mama coletadas antes e após suplementação com calcitriol (teste-*t*, pareado).

.

Tabela 09.....pág 47

Correlação entre expressão tumoral de genes alvo pré e pós suplementação de calcitriol.

.

Lista de Abreviaturas

µg - microgramas

µl - microlitros

µM - micromolar

cDNA – DNA complementar

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxiribonucleotídeos

DO - densidade ótica

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

Hb4a – linhagem celular epitelial mamária humana derivada de mamoplastia imortalizada pela transfecção do antígeno T grande do vírus SV40

M - molar

ml - mililitro

mM - milimolar

pb - pares de bases

Resumo

Lyra E.C. *Influência da vitamina D na proliferação e na expressão de genes alvo em câncer de mama de pacientes pós-menopausadas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 80p.

Pacientes com câncer de mama apresentam menores níveis de 1,25(OH)₂D₃ ou 25(OH)D₃ em relação às mulheres sem a doença. Embora linhagens de câncer de mama apresentem inibição do crescimento em concentrações supra-fisiológicas de 1,25(OH)₂D₃, forma ativa da vitamina D, ainda não se demonstrou se o hormônio exerce efeito antiproliferativo, em concentrações fisiológicas, em tumores de seres humanos. A suplementação de calcitriol pode ser indicada a mulheres pós-menopausadas para prevenir a perda óssea. Nosso objetivo foi avaliar em pacientes com câncer de mama, pós menopausadas, a dimensão do tumor, taxa de proliferação (expressão de Ki67), concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)D₃, expressão gênica tumoral do receptor de vitamina D (VDR) e alguns genes alvos como, CYP24A1, CYP27B1, IGFBP3, PHB, TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, MYC, CAMP, TXNRD2, antes e após um mês de suplementação oral de calcitriol. Foram estudadas 24 pacientes com doença operável, idade mediana de 57 anos. As primeiras 10 pacientes e as 14 seguintes receberam 0,25 e 0,50µg/dia de calcitriol, respectivamente, por um período mediano de 31 dias. Três quartos das pacientes apresentavam nível sérico de insuficiência de 25(OH)D₃ ou insuficiência relativa (<30ng/ml) e após a suplementação, nenhuma paciente apresentou elevação dos níveis séricos de 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)D₃. Embora a dimensão tumoral, mensurada por ultrasonografia, não apresentasse variação, a imuno-expressão de Ki67 sofreu uma redução relativa mediana de 40%. A expressão relativa de VDR, CYP24A1, CYP27B1, IGFBP3, PHB, TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, MYC, CAMP, TXNRD2 não se alterou com a suplementação. Nossos dados indicam que tumores de mama expressam VDR, e que após suplementação oral de calcitriol, ocorre uma redução da proliferação. Este efeito merece ser elucidado, desde que genes alvo clássicos da 1,25(OH)₂D₃ não parecem ser mediadores do efeito anti-proliferativo, em amostras de câncer de mama de pacientes pós menopausadas.

Descritores: Neoplasias mamárias, vitamina D, calcitriol, antígeno Ki67, imunohistoquímica, pós-menopausa, expressão gênica, reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.

Summary

Lyra E.C. *Vitamin D influence on proliferation and expression of target genes in post-menopausal breast cancer patients* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 80p.

Breast cancer patients present lower 1,25(OH)₂D₃ or 25(OH)D₃ serum levels than unaffected women. Although breast cancer cell lines are growth inhibited by vitamin D supra-physiological concentrations, there is much uncertainty about the anti-proliferative effect of physiological concentrations of 1,25(OH)₂D₃, the active form of vitamin D, in breast cancer specimens *in vivo*. Vitamin D supplementation to post-menopausal women may be indicated to reduce bone loss. Our aim was to evaluate tumor dimension, proliferation rate (Ki67 expression), 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ serum concentration, and tumor expression of vitamin D receptor (VDR), and of some target genes as CYP24A1, CYP27B1, IGFBP3, PHB, TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, MYC, CAMP, TXNRD2, before and after a one month calcitriol supplementation to post-menopausal breast cancer patients. Twenty four patients with operable disease, median age 57 years, were enrolled. The first ten patients were supplemented with calcitriol 0.25µg/d and the next 14 patients, with 0.50µg/d, for a median period of 31 days. Three fourths of the patients presented 25(OH)D₃ insufficiency or relative insufficiency (<30 ng/mL) and after calcitriol supplementation, none of them presented an elevation of 1,25(OH)₂D₃ or 25(OH)D₃ serum concentration. Although tumor dimension, evaluated by ultrasonography, did not vary, a median relative reduction of 40% in Ki67 immuno-expression, was observed. No differences in VDR, CYP24A1, CYP27B1, IGFBP3, PHB, TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, MYC, CAMP, TXNRD2 mRNA relative expression were detected between pre and post-supplementation samples. No differences in VDR, CYP27B1 and CYP24A1 tumor relative expression were detected following supplementation. Our data indicate that VDR expression is detected in breast cancer samples and that growth inhibition takes place after calcitriol oral supplementation. This anti-proliferative effect deserves further investigation, as classical target genes do not seem to be involved.

Descriptors: Breast neoplasms, vitamin D, calcitriol, Ki67 antigen, immunohistochemistry, postmenopause, gene expression, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

1. Introdução

Estima-se que em 2008 ocorrerão 466.730 novos casos de câncer no Brasil, dos quais 234.870 em mulheres (Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer, INCA), sendo 49.400 de câncer de mama. Entre as neoplasias, o câncer de mama é atualmente a primeira causa de morte em mulheres no Brasil, responsável por 15,55% dos óbitos, desde o final da década de 90.

A exposição hormonal, caracterizada por maior número de ciclos ovulatórios, bem como a história familiar, constituem-se em fatores predisponentes para o câncer de mama, entretanto, várias mulheres desenvolvem a doença sem que fatores de risco possam ser identificados.

Dados epidemiológicos sugerem que menor nível de exposição solar relacionado à deficiência mesmo leve da forma precursora da vitamina D, esteja associado a um maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer bastante comuns na atualidade, como mama, cólon (Garland et al., 1990) e próstata (Schwartz et al., 1990). Além disso, estudos recentes 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 diagnóstico de melanoma e maior exposição solar apresentem melhor prognóstico em relação àqueles expostos a menor insolação (Berwick et al., 2005). Dados epidemiológicos indicam ainda que, a suplementação de vitamina D via dieta, ou conseqüentemente à exposição solar, relacionada à gênese da vitamina D, pode ser um fator protetor contra o câncer (Ainsleigh, 1993).

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). Entretanto a associação entre vitamina D e câncer em seres humanos ainda não está clara e estudo clínico prospectivo mostrou que a reposição de vitamina D e cálcio não reduziu a incidência de câncer colorretal (Wactawski-Wende et al., 2006). Neste estudo foram incluídas 36.282 mulheres, metade das quais realizou suplementação de cálcio e vitamina D (400 IU). No início do estudo, a ingestão média de vitamina D, incluindo dieta e suplementos, era de 367 IU, relativamente alta nos dois grupos, quando se considera a população em geral, e praticamente atingiu aquela preconizada nos Estados Unidos. Cerca de 60% e 70% das mulheres participantes tomou pelo menos 80% da medicação prevista durante 6 anos. Determinação da concentração sérica de 25(OH)D₃, após 2 anos de seguimento, revelou que esta foi 28% maior no grupo que realizou a suplementação, em relação ao grupo que recebeu placebo (n=220 em cada grupo). Apesar disso, após seguimento médio de 7 anos não se observou diferença na incidência de câncer colorretal entre os dois grupos. Dentre os fatores que podem ser aventados para a negatividade do estudo está o tempo de seguimento curto, visto que o tempo de latência de evolução do câncer colorretal pode ser longo, entre 10 a 20 anos, e dose de suplementação, que pode ter sido baixa visto que estudos posteriores sugerem uso de doses mais altas.

Por outro lado, realizou-se a dosagem sérica de 25(OH)D₃ de mulheres em amostras de sangue de 306 pacientes que desenvolveram câncer colorretal e igual número de mulheres que não desenvolveram a doença, as quais foram pareadas quanto à idade, etnia e data da coleta do sangue. Nesta análise observou-se uma tendência a maior incidência de câncer colorretal em mulheres que apresentavam menor nível sérico inicial de 25(OH)D₃ favorecendo a hipótese de um efeito protetor de vitamina D no desenvolvimento do câncer.

A 1,25(OH)₂D₃ (metabólito ativo da vitamina D) pode ser obtida através de alimentos como peixe e derivados de leite enriquecidos com vitamina D. No entanto, ela é produzida predominantemente de maneira endógena a partir de um precursor existente na pele, o 7 deidrocolesterol, que através de uma fotólise química, sob ação dos raios ultravioleta da luz solar transforma-se em colecalciferol ou pré-vitamina D₃.

A pré-vitamina D₃ 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. Além disso, tanto a vitamina D₃ (colecalciferol), de origem animal, quanto 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 (Henry et al., 1986).

A vitamina D ao atingir o fígado sofre uma hidroxilação na posição C-25, para formar o 25-hidroxicolecalciferol ou $25(\text{OH})\text{D}_3$, o qual é a principal forma circulante da vitamina D no organismo. Nos rins ocorre uma segunda hidroxilação na posição C-1, que permite a transformação da 25-hidroxivitamina D_3 em $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pela ação de 1 alfa hidroxilase (Bouillon et al., 1995). Em indivíduos normais a concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é 36-144 pmol/l e a de $25(\text{OH})\text{D}_3$ é de 20-100 nmol/l (Wilson et al., 1992).

A vitamina D é um hormônio secosteróide lipossolúvel que regula o desenvolvimento e metabolismo ósseo, participando da homeostase do cálcio agindo em ossos, rins, trato digestório, paratireóide, sendo responsável pela absorção de cálcio no intestino e reabsorção óssea (Holick, 1981). A concentração sérica de vitamina D declina com a idade, sendo necessária a suplementação na maioria das mulheres idosas. Além disso, 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, resulta em aumento dos níveis séricos do hormônio e benefício na densidade mineral óssea (Dawson-Hughes et al., 1997, Ooms et al., 1995, Chapuy et al., 1992). Por outro lado, é possível que o mesmo benefício não ocorra em mulheres no início do período pós menopausal, com níveis séricos

normais de vitamina D (Cooper et al., 2003). A suplementação ideal de vitamina D, entretanto, não está bem determinada e a reposição de 400–800 IU/dia parece insuficiente para alguns autores, que sugerem que as necessidades diárias variem de 3.000 a 5.000 UI (Barger-Lux et al., 1998). Além disso, demonstrou-se benefício clínico da suplementação de calcitriol a mulheres pós-menopausadas, em redução de incidência de fraturas vertebrais (Tilyard et al., 1992).

Avaliamos a funcionalidade da via da vitamina D em pacientes com carcinoma de mama e observamos que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mas não a $25(\text{OH})\text{D}_3$ sérica, foi menor em pacientes com câncer de mama quando comparadas a mulheres sem câncer de mama. A expressão tecidual de VDR, 1α hidroxilase e 24 hidroxilase foram similares no tumor de pacientes com câncer em relação a tecido mamário de mulheres sem câncer (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) 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 autores sugerem que níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ou $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parecem 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). Por outro lado, estudo prospectivo de suplementação de cálcio e

vitamina D a mulheres pós menopausadas não demonstrou redução na incidência de câncer de mama, mas a maior ingestão de vitamina D, associou-se a menor risco de câncer de mama no grupo placebo, e os tumores observados no grupo de suplementação foram menores que os do grupo controle (Cheblowski 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). O hormônio exerce seus efeitos via mecanismo genômico onde tem papel central, o receptor de vitamina D (VDR), fosfoproteína que é membro da super família de receptores nucleares (Van den Bemd et al., 2000). VDR, forma heterodímero com o receptor de ácido retinóico RXR, age como um fator transcricional, ligando-se a elementos de resposta à vitamina D (VDRE), isto é, duas seqüências de seis nucleotídios repetidas, mas separadas por três nucleotídios aleatórios, seqüências estas contidas em regiões promotoras de genes responsivos a vitamina D, entre eles, osteocalcina (Kerner et al., 1989), p21(waf1) (Liu et al., 1996), TGF β 2 (Wu et al., 1999), 24hidroxilase (Ohyama et al., 1994).

Como a ação da 1,25(OH) $_2$ D $_3$ é mediada por seu receptor VDR, é interessante analisar esta expressão em tecidos normal e tumoral para elucidar potenciais alvos deste hormônio. 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 varia de 58% a 80% (Eisman et al. 1986, Bortman et al., 2002) mas a correlação com o prognóstico

da doença é incerta, relatando-se que as pacientes portadoras de tumores VDR positivos apresentem melhor 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 em outros tecidos e órgãos, que não o rim. Demonstrou-se em rim a presença tanto de 1 α hidroxilase, responsável pela ativação do hormônio, quanto de 24hidroxilase, enzima que promove uma oxidação no carbono 24 dando origem a metabólitos 24,25(OH)₂D₃, ou 1,24,25(OH)₃D₃, 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 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 a 24 hidroxilase pode estar hiperexpressa 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 $25(\text{OH})\text{D}_3$. Portanto, em mulheres com câncer de mama, alterações da via da vitamina D foram demonstradas e podem estar relacionadas ao desenvolvimento do tumor.

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). Em células mamárias normais este efeito não está claro, relatando-se por vezes inibição da proliferação somente com concentrações acima daquelas utilizadas para o tratamento de linhagens cancerosas (Escaleira et al., 1999; Hussain-Hakimjee et al., 2006).

O efeito antiproliferativo da vitamina D pode ser mediado pela indução de expressão de $p21^{\text{waf1}}$ (CDKN1A) (Katayama et al., 2003) e regulação da expressão de moléculas que controlam a progressão do ciclo celular como $p27^{\text{kip1}}$ (CDKN1B), ciclina G1, ciclina G2, ciclina I e fatores de crescimento, como TGF β e EGF (Swami et al., 2003) e seus moduladores, como IGFBP-3 (Katayama et al., 2003). A vitamina D pode influenciar também os processos de invasão e metástases modulando a expressão de 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 (MCF7, MDA-MB-231 e MCF12F transformada com nitrosometilurea) (Swami et al., 2003; Hussain-Hakimjee et al., 2006).

Em suma, observamos em estudo prévio que pacientes com câncer de mama apresentam menor nível sérico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que mulheres sem câncer (Lyra et al., 2006) e até o momento não se sabem se a suplementação oral de vitamina D é ou não suficiente para a redução da proliferação e modulação da expressão gênica. Logo, nosso objetivo é avaliar a influência da suplementação oral de calcitriol na proliferação das células malignas e indução de genes alvo (24-hidroxilase, p21, p27, IGFBP3) em amostras de câncer de mama de pacientes pós-menopausadas.

2. Objetivos específicos

1. Determinar a concentração sérica $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ em mulheres pós-menopausadas com diagnóstico de câncer de mama, antes e após 1 mês de suplementação de calcitriol.
 2. Determinar se a suplementação de calcitriol por via oral tem atividade anti-proliferativa (expressão de Ki67).
 3. Determinar a expressão tumoral de VDR e se a suplementação de calcitriol oral altera a expressão de genes alvo como 24 hidroxilase (CYP24A1), 1α hidroxilase (CYP27B1), p21(CDKN1A), p27(CDKN1B), IGFBP3, MYC, TGFB, TNXRD2, Proibitina (PHB).
-

3. Casuística

O recrutamento das pacientes foi realizado no ambulatório de mastologia do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBCC e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP. Todas as pacientes foram instruídas sobre a pesquisa e concordaram em dela participar ao assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram incluídas 24 pacientes de modo prospectivo. Estas pacientes tiveram diagnóstico comprovado por exame histopatológico de carcinoma invasivo da mama estadio clínico II e não haviam sido submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Foram incluídas pacientes pós menopausadas, sem metástase à distância, não tratada previamente para o câncer de mama e excluídas pacientes com história de nefropatias, cálculo renal, ou hipercalcemia. Os critérios de inclusão ou exclusão estão descritos abaixo.

Critérios de inclusão

1. Pacientes pós menopausadas
 2. Carcinoma invasivo de mama, comprovado por exame histopatológico de congelação na ocasião da biópsia incisional
 3. Pacientes não submetidas a tratamento neoadjuvante do câncer
-

Menopausa foi definida como idade > 50 anos e pelo menos 1 ano após a última menstruação ou ooforectomia bilateral comprovada por laudo de exame histopatológico ou ultrassonografia transvaginal (com mais de 1 ano sem menstruação (Davis, 1967) ou estrógeno sérico \leq 13pg/ml (Chakravarti et al., 1976) e FSH sérico em nível pós menopausal.

Critérios de exclusão

1. História de cálculo renal ou hipercalcemia
2. Uso atual de corticosteróides
3. Pacientes que realizaram quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia prévias
4. Pacientes que participam de outros estudos clínicos enquanto admitido neste protocolo
5. Pacientes com doença de paratireóide
6. Paciente que apresentava qualquer outra condição ou terapia que possa indicar um risco a paciente ou interferir nos objetivos do estudo.

As pacientes responderam a um questionário onde constavam os seguintes itens: dados pessoais: cor , sexo, idade, idade da menarca, idade da menopausa, antecedentes obstétricos, antecedentes de uso de vitamina D, antecedentes de uso de cálcio, terapêutica de reposição hormonal, antecedentes de nefropatia, hipertensão arterial, diabetes, cardiopatia, antecedentes de câncer como: colo uterino, pele e outros, antecedentes familiares de câncer.

Por ocasião do diagnóstico foi realizado o exame clínico com mensuração do tumor e palpação de linfonodos regionais. As lesões foram mensuradas com régua e o estadiamento clínico foi realizado de acordo com os critérios da AJCC, 6^a. edição.

A pesquisa de metástase à distância foi realizada por RX de tórax, cintilografia óssea e USG de abdome. Foram realizados os seguintes exames de sangue: hemograma com diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas, uréia, creatinina, bilirrubinas, TGO, TGP, FA, cálcio.

4. Métodos

Coleta e Transporte das Amostras

Foram coletados 15 ml de sangue das pacientes (após jejum de 12 horas) antes (por ocasião da biópsia) e após suplementação de calcitriol (por ocasião da cirurgia). O sangue foi centrifugado e o soro estocado em freezer a -20°C até o momento da dosagem sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

As pacientes foram orientadas a iniciar o uso de calcitriol (Rocaltrol®) (Hoffmann-La Roche Ltd., Basileia, Suíça) 0,25µg (10 primeiras pacientes) VO 1 vez ao dia ou calcitriol 0,25 µg a cada 12 horas (próximas 14 pacientes). As pacientes realizaram a suplementação no período em que realizavam a avaliação pré operatória, por cerca de 1 mês. As pacientes foram orientadas a continuar a suplementação de vitamina D após o tratamento operatório definitivo.

Amostras de tumor foram colhidas antes (biópsia) e após (cirurgia) a suplementação de calcitriol (cerca de 1cm³, conservação em formol 10% tamponado e em nitrogênio líquido).

A qualidade do fragmento no momento da biópsia incisional e da amostra tumoral da peça cirúrgica foi avaliada pela médica patologista Dra Eloá Muniz de Freitas Alves. A amostra foi seccionada sendo metade conservada para estudos e metade submetida a exame histopatológico (congelamento e parafina) confirmando a natureza neoplásica da lesão.

Dosagem sérica de 1,25(OH)₂D₃

As determinações de 1,25(OH)₂D₃ foram realizadas de uma só vez. Para determinação quantitativa de 1,25(OH)₂D₃ em soro humano, utilizamos o método competitivo de radioimunoensaio da DiaSorin (DiaSorin S.A, Antony, França, Stillwater, MN EUA).

O procedimento consiste de duas partes, o primeiro passo consiste da extração e purificação dos metabólitos de vitamina D a partir do soro. Após a extração a amostra tratada é então analisada usando um procedimento de radioimunoensaio competitivo com anticorpo policlonal que é específico para 1,25(OH)₂D₃ marcados com ¹²⁵I. A amostra e o anticorpo foram incubados entre 20 - 25 °C. Após 2 horas para separação das fases utiliza-se um segundo anticorpo de precipitação entre 20 - 25°C. Após 20 minutos de incubação centrifuga-se, e a fração ligada foi quantificada em um contador de raios gama. Os valores foram calculados a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas. A concentração final de 1,25(OH)₂D₃ em soro foi expressa em pg/ml.

Determinação da expressão de Ki67 por reação de Imuno-histoquímica

As lâminas foram feitas a partir de cortes de 3 µm de espessura de tecido parafinado. Para a desparafinização, foram expostas a 3-aminopropiltriétoxi-silano (Sigma, EUA) e deixadas por 24 horas em estufa

a 60°C. A seguir foram tratadas sequencialmente em xilol (60°C por 20 minutos e a 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 lâminas foram fervidas, sob pressurização, em solução de tampão citrato 10mM pH6.0 por 4 minutos e então em água corrente por 10 minutos. A seguir houve o bloqueio da peroxidase endógena pela exposição a H₂O₂ 3% por 4 vezes, durante 5 minutos. Após nova lavagem com água, as lâminas foram lavadas com PBS 10mM pH7.4 por 5 minutos e incubadas com o anticorpo primário específico contra Ki-67 (IgG gerado em camundongo, clone MIB-1, DAKO M7240) em diluição pré determinada de 1:50 em tampão PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA, Invitrogen, EUA) e 1% de azida sódica por 18 horas a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 3 min e incubadas com o complexo EnVision Labeled Plymer HRP (Dako corporation, k1491-1, Dinamarca) por 1 hora a 37°C e novamente lavadas. Incubou-se a reação por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz, em solução substrato: 60mg% de 3,3' tetrahydrocloreto de diaminobenzidina (DAB, D5637, Slgma, EUA); 1ml de H₂O₂ 6%; 100ml de PBS. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 min, lavadas em água (corrente e destilada), imersas em água amoniacal a 0,5%, lavadas novamente em água e desidratadas sequencialmente em etanol e xilol, sendo montadas com Entellan (Merk, Alemanha). Todas as reações foram realizadas de uma só vez para manter os mesmos parâmetros.

A leitura das lâminas foi realizada por três observadores, Dr. Ricardo Basso, e Dra Ana Paula Torres Shor (patologistas) e pelo pesquisador.

Selecionou-se a região do tumor a ser analisada em aumento 4x e 10x e a avaliação da porcentagem de células marcadas foi realizada em aumento 40x. Foram analisados 10 campos onde foram contadas 100 células por campo totalizando 1000 células. O resultado foi expresso em porcentagem de positividade.

Houve correlação entre as três leituras (RB, 1; APS, 2; e ECL, 3) (1 vs 2: n= 46, r=0,468, p=0,001; 2 vs 3: n=45, r=0,475, p=0,001; 1 vs 3: n=47, r=0,897, p<0,001, correlação de Pearson) e calculou-se o valor médio entre as três contagens para uso nas análises.

Extração de RNA total

Os tecidos tumorais congelados foram submetidas à extração do RNA total pelo reagente Trizol® (solução monofásica de fenol e isocianato de guanidina (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), que é uma modificação do método desenvolvido por Chomezynsky & Sacchi (1987).

Aproximadamente 100 mg de tecido congelado foi pulverizado com Biopulverizer (Bio-Pulverizer™ BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA) e transferido para um microtubo contendo 1,5ml de Trizol®, homogeneizado por inversão e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, antes de ser submetido a centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos. Neste mesmo

tubo foi adicionado 200µL de clorofórmio, prosseguiu-se à homogeneização por inversão e, novamente centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C.

A fase aquosa contendo o RNA foi recuperada e transferida para tubo novo, ao qual foi acrescentado 500µL de álcool isopropílico homogeneizado por inversão e mantido à temperatura de -20° C durante 12 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado em 1 mL etanol 75%. Prosseguiu-se a nova centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos. A partir daí recuperou-se o material precipitado (RNA) o qual foi dissolvido em 20µl de água miliQ autoclavada e tratada com dietildicarbonato 0,002%(DEPEC) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria *Gene Quant pro* (Amersham-GE Healthcare Life Sciences, St. Giles, Reino Unido) em comprimento de onda de 260 nm (uma densidade ótica equivalente a 40µg de RNA por mL). A qualidade do RNA extraído foi verificada pela razão de absorbância a 260 nm pela absorbância 280 nm, que se manteve dentro dos limites preconizados ($A_{260/280} = 1,78$ a 2,0). Para verificar a integridade do RNA as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% contendo MOPS 1X e 5,1% de formaldeído. O RNA foi previamente desnaturado em tampão contendo 7% de glicerol, 10% de MOPS 10X (MOPS 2M, acetato de sódio 0,5M, EDTA 0,1M – pH 7,0), 53% de formamida, 17% de formaldeído, 6% de azul de bromofenol e incubação

a 65° C por 15 minutos. A partir da identificação das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18A e 28S, a amostra era considerada íntegra. (Figura 1).

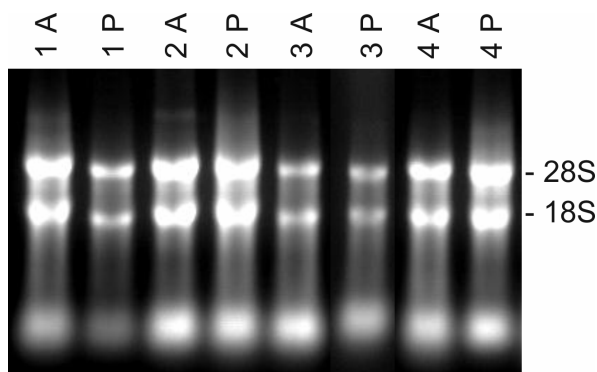


Figura 1. Identificação das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28S em gel de agarose de amostras. A(antes da suplementação), P (após suplementação com 1,25(OH)2D3 – 0,25µg/d).

Reação da Transcriptase Reversa (RT) para obtenção do cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA total diluído em 20 µl de água ultra pura (Water, Molecular Biology Grade) Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) na qual foram adicionados 2µl de hexâmeros iniciadores (0,5 µg/µl) (Amersham-GE Healthcare Life Science, St. Giles, Reino Unido). Após 10 minutos de aquecimento a 70° C para desnaturação das fitas de RNA e, posteriormente, colocada

imediatamente no gelo por 2 minutos. A esta solução foi acrescentado 7 μ l de uma mistura contendo 4 μ l de tampão da enzima *Super Script III* (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA); 2 μ l de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) a 2,5mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) 1 μ L de dietiltreitol (DTT) a 100mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA). Após o período de aquecimento a 55° C por 10 minutos foi acrescentado 1 μ L da enzima transcriptase reversa *Super Script III* (5UI/ μ L) (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) e novamente procedeu-se incubação da reação a 55°C por 1 hora, para se obter a síntese da primeira fita de cDNA. Posteriormente, o tubo foi aquecido a uma temperatura de 70° C por 15 minutos, para inativação da enzima. Após este procedimento, o cDNA obtido foi submetido à leitura em espectrofotômetro por meio da leitura da absorbância em 260 e 280nm e utilizado para a amplificação da região de interesse ou estocado a -20°C.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real pelo sistema *SYBR Green I*

A PCR em tempo real avalia o acúmulo do produto DNA dupla fita na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde (cDNA) existente no início da reação, sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica.

Utilizamos o sistema de detecção por *SYBR Green I*, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente que, quando intercalada à dupla fita do DNA, emite fluorescência e então é possível quantificar o total de moléculas de DNA produzidas. Durante os ciclos iniciais da reação de PCR, não há acúmulo de fitas duplas suficientes para que a fluorescência emitida possa ser detectada; entretanto, no decorrer dos ciclos da reação há o aumento do produto amplificado e conseqüentemente o aumento do sinal de emissão de fluorescência, passando este a ser detectável. A figura 2 representa o gráfico de amplificação em tempo real, onde observamos uma linha basal (nesta fase não é possível identificar fluorescência pela pequena quantidade de amplificação), uma fase logarítmica (aonde a quantidade de produto amplificado dobra a cada ciclo), uma fase linear (observa-se um pequeno aumento de produto) e uma fase *plateau* (quando não há mais amplificação do produto).

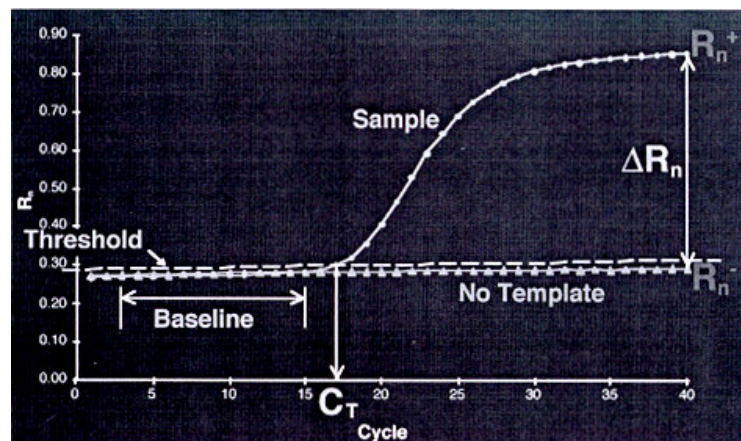


Figura 2. Representação da amplificação de moléculas de DNA na reação de PCR em tempo real.

A metodologia que utiliza o *SYBR Green I* exige cuidadosa padronização, uma vez que este fluorocromo se intercala a qualquer molécula de dupla fita presente na reação. A especificidade da detecção de fluorescência com *SYBR Green I* pode ser comprometida pela formação de dímeros de oligonucleotídeos, pela concentração inadequada de oligonucleotídeos e pela formação de produtos inespecíficos de amplificação. Todos estes fatores levam à formação de moléculas de dupla fita não esperadas, as quais incorporam o *SYBR Green I* e têm sua fluorescência registrada.

Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de desnaturação (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação. Cada fragmento amplificado possui uma T_m específica, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes.

Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e atinge um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. Este é um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formado traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se ciclo

limiar (*Ct: threshold cycle*). Amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e exibem valores de *Ct* mais baixos. Quando a eficiência da reação de PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação.

Desenho dos *primers*

Os primers dos transcritos dos genes VDR, CYP27B1, CYP24A1, CDKN1A, CDKN1B, IGFBP3, TXNRD2, TGF β 2, CAMP (CATELICIDIN), MYC, e dos genes referência GAPDH, RPLPO e ACTB (β ACTINA) (Quadro 1) foram desenhados a partir da seqüência de mRNA descrita no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. A seqüência do mRNA foi analisada no endereço <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat> e com as informações obtidas escolhemos a região de interesse para a construção do *primer*, ou seja, uma região com presença de grandes íntrons entre éxons de interesse contidos no DNA do gene (assim diminuimos a chance de reação cruzada com o DNA genômico, pois a DNA polimerase não sintetiza fragmentos de grande tamanho). O desenho dos *primers* foi realizado utilizando-se o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e a homologia dos *primers* construídos em relação às diversas seqüências depositadas foi verificada no endereço www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Este passo determinou se a utilização do

mesmo iria amplificar só a região de interesse ou poderia amplificar também outras inespecíficas que poderiam intervir no resultado. Também

verificamos se os *primers* selecionados formavam estruturas estáveis indesejadas (secundárias) e para isso utilizamos o programa OligoTech versão 1.00, Copyright (1995).

Tabela 1. Desenho dos *primers* dos transcritos dos genes alvo e tamanho do produto.

<i>Gene</i>	<i>Número de Acesso do banco de gene</i>	<i>Primer direto (5'-3')</i>	<i>Primer Indireto (5'-3')</i>	<i>Tamanho do produto pb</i>
VDR	NM_001017535	AGATTGGAGAAGCTGGACGA	GCCCACCATAAGACCTACGA	203
CDK1A	NM_078467	CAGGTCCACATGGTCTTCCT	GACACCACTGGAGGGTGA	172
IGFBP3	NM_0005984	AGGCTGCCCATACTTATCCA	CCTGCCGTAGAGAAATGGAA	141
TXNRD2	NM_006440.3	CTTACCCTCAGCAGCCTGTC	GCAGGCGAAGTTACTCAAGG	169
CDK1B	NM_004064	TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA	AGATGTCAAACGTGCGAGTG	154
CAMP	NM_004345.3	GGTCACTGTCCCCATACACC	GCTAACCTCTACCGCCTCCT	160
MYC	NM_002467.3	AGCAAGGGCTACCAAGGATT	GGAGGGCAGTCAGTCTCAAG	200
TGFB2	NM_003236	CTCCATTGCTGAGACGTCAA	CCGGAGGTGATTTCATCTA	222
CYP27B1	NM_000785	CGCCAATAGCAACTCTGTCA	TGTTTGCAATTTGCTCAGAGG	173
CYP24A1	NM_000782	TATTTGCGGACAATCCAACA	GGCAACAGTTCTGGGTGAAT	249
RPLPO	NM_001002.3	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACACAGCCTTC	149
ACTB	NM_001101.3	AGAAAATCTGGCAACAACC	AGAGGCGTACAGGGATAGCA	188
GAPDH	NM_002046.3	CTGCCAACGTGTCAAGTGGT	CAGTGTGGTGGGGGACTGAG	400

Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

A reação de PCR foi a partir de um volume inicial de 15 μ L contendo uma mistura de 2 μ L de tampão para PCR 10X (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) 0,8 μ L de cloreto de magnésio 50mM (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), 1,6 μ L de deoxinucleotídeos trifosfatatos 2,5 μ M (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA), 0,4 μ L de cada um dos *primers* (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) 10 μ M, 1 μ L de

dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, 0,2 µL do fluorocromo *SYBR Green I* na diluição 1:100 (Roche Diagnostic, Basel, Suíça) e 0,3 µL da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen Corporation). A esta mistura foi adicionado 1 µL de cDNA (molde) da amostra de interesse, o que correspondia a 0,1-1,0 µg de cDNA.

As reações foram preparadas em duplicata e submetidas às condições adequadas de temperatura em termociclador (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália). Inicialmente os tubos contendo a mistura dos reagentes foram submetidos a 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguido do pareamento do *primer* à fita molde a 60°C por 60 segundos e então extensão de polimerização da molécula de DNA a 72°C por 60 segundos.

Todas as amostras foram analisadas pelo programa *Rotor-Gene 6 System* (Corbett Research, Mortlake, Sydney, Austrália) e a média dos valores de ciclos limiares de cada amostra (Ct) foi utilizada para quantificação da expressão dos genes de interesse. A variação entre os Ct das reações em duplicata não excedeu 1,5 ciclo.

Análise dos resultados de expressão gênica por PCR em tempo real

Normalização dos dados de qRT-PCR

Determinamos inicialmente quais os genes cuja expressão seria utilizada como fator de normalização. A expressão de seis genes foi

avaliada pelo programa geNorm (<http://medgen.ugent.be>), para determinar quais os genes mais estáveis nestas amostras como descrito por Vandesompele et al (2002).

O programa de geNorm determina os genes constitutivos mais estáveis de uma amostra de um conjunto de genes candidatos, calculando a partir da eficiência de cada sonda elevado ao delta Ct da referência menos o delta Ct da amostra de cada candidato (Goossens et al, 2005; Erkens et al, 2006), como demonstrado na formula abaixo:

$$E_{\text{constitutivo}}^{(\Delta\text{ct ref})-(\Delta\text{ct amostra})}$$

A estabilidade dos genes constitutivos é determinada partindo-se do princípio de que dois genes ideais possuem razão de expressão idêntica em qualquer amostra a ser analisada. O programa geNorm avalia a razão de expressão de cada gene constitutivo em relação aos demais sempre aos pares permitindo o cálculo do desvio padrão desses valores transformado em escala logaritmo, então a média do desvio padrão de cada gene em relação aos demais é calculado fornecendo uma medida de estabilidade de expressão do gene (M). O gene com a expressão mais estável tem o valor de M mais baixo, permitindo então a exclusão dos genes menos estáveis (Vandesompele et al, 2002).

A cada gene normalizador excluído, o programa atribui automaticamente um novo valor referente à estabilidade dos demais sobre as amostras. Esse processo se repete até que permaneçam apenas os genes cuja expressão seja mais estável, determinado a combinação adequada a ser utilizado na análise de qRT-PCR.

Preconiza-se que nesta análise se utilize no mínimo três genes constitutivos estáveis para se obter o Fator de Normalização confiável. Um valor menor que 1,5 foi estabelecido para a razão de expressão, se esse valor for maior é necessário a inclusão de um novo gene constitutivo (Vandesompele et al, 2002).

A partir disso resulta o fator de normalização de expressão do gene para cada amostra analisadas em qRT-PCR, baseado na média geométrica de um número definido como operador de genes constitutivos, resultando um valor chamado de Fator de Normalização (FN) (Vandesompele et al, 2002).

A expressão diferencial dos transcritos de interesse (genes alvo) foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação ao Fator Normalizador derivado dos genes constitutivos já citado anteriormente. A quantificação gênica dos tecidos tumorais foram realizados utilizando HB4a (linhagem mamária normal humana) como amostra referência.

Avaliação da expressão dos genes

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), e vastamente utilizado (Radonic et al , 2003), sendo:

$$R = E_{\text{alvo}}^{(\Delta \text{ct ref}) - (\Delta \text{ct amostra})} / E_{\text{constitutivo}}^{(\Delta \text{ct ref}) - (\Delta \text{ct amostra})}$$

onde: o **E** corresponde a eficiência da amplificação dos iniciadores específicos para o transcrito alvo. As eficiências de amplificação dos iniciadores específicos para os transcritos alvos e o tecido de referência

foram calculadas de acordo com a equação: **E= 10 (-1/slope)**. Onde: Slope corresponde a inclinação da curva obtida quando se analisa a variação dos Cts dos genes alvos ou constitutivos em função do *logaritmo na base 10*, de diferentes concentração de cDNA. Foram utilizadas 5 diferentes concentrações de cDNA da célula HB4a. A inclinação da curva é dada

como o valor de M. O $\Delta\text{ct amostra}$ corresponde a média dos CTs do gene alvo na amostra alvo e $\Delta\text{ct ref}$ corresponde a média do gene alvo no amostra de referência .

Neste trabalho o calculo da expressão diferencial foi realizado substituindo o denominador [$E_{\text{constitutivo}}^{(\Delta\text{ct ref})-(\Delta\text{ct amostra})}$] pelo Fator de Normalização, como sugerido por Vandesompele et al (2002), ficando então:

$$R = E_{\text{alvo}}^{(\Delta\text{ct ref})-(\Delta\text{ct amostra})} / \text{FN}$$

Onde: **FN** corresponde ao Fator de Normalização que é calculado a partir do delta ct de cada candidato, baseado na média geométrica de um número definido como operador de genes constitutivos, derivado do programa geNorm que determina os genes constitutivos mais estáveis de um conjunto de genes testados.

Para o cálculo da eficiência foram utilizadas quatro diferentes quantidades de cDNA obtidas por meio da diluição seriada da amostras de cDNA original, que foi sintetizada a partir de 5 µg de RNA total. As quantidades utilizadas foram: 1200, 600, 300, 150 e 75 ng de cDNA (figura 3)

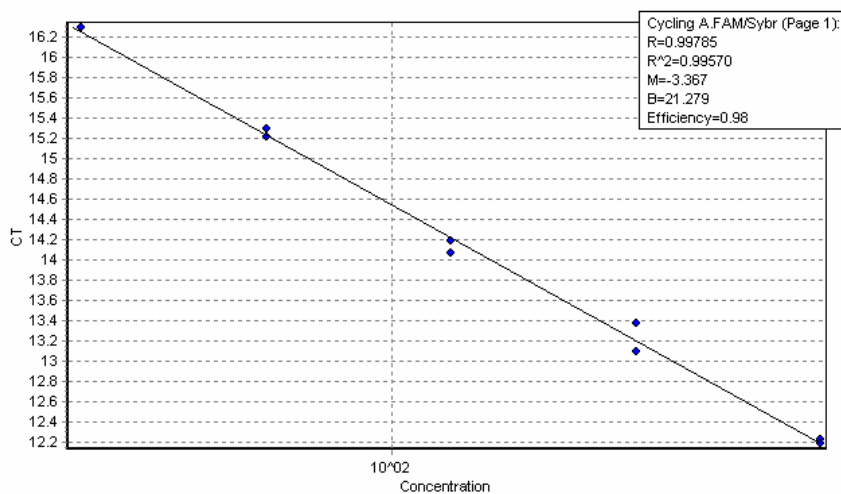


Figura 3. Curva de eficiência representativa de um transcrito.

Análise estatística

Os resultados são apresentados pela média e desvio padrão. Utilizamos o teste t pareado ou teste t de Student para verificar a significância das diferenças. Para análise da correlação entre variáveis calculamos o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância foi bicaudado e $\leq 0,05$. Utilizamos o programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences, versão 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para as análises.

5. Resultados

Características das pacientes

A idade mediana das pacientes ao diagnóstico foi de 57 anos (variação 49 -66), e a idade mediana da menopausa foi 50 anos (variação 24 – 55). Três pacientes referiram história familiar de câncer de mama em parentes de 1º. grau (tabela 2).

Apenas uma paciente de 52 anos havia realizado terapia de reposição hormonal por 6 meses, a qual havia sido interrompida há 2 anos. Três pacientes referiam reposição de cálcio prévia, que havia sido interrompida há pelo menos 8 meses da data da consulta de inclusão no trabalho (tabela 2).

A maioria das pacientes apresentou doença estágio clínico IIA (TNM, “American Joint Committee on Cancer”, AJCC, 6ª. edição, 2002) (tabela 3). O exame histopatológico dos tumores revelou predominância de carcinoma ductal infiltrativo (79,16%), e o grau histológico foi II em 65,22% e III em 34,78% dos tumores. O exame imuno-histoquímico mostrou expressão de receptor de estrogênio em 54,16% e hiper-expressão de HER2 em 37,5% dos tumores (tabela 3).

		<i>n</i>	%
	Cor		
Branca		17	70,8
Parda		7	29,16
	TRH		
Sim		1	4,16
Não		23	95,83
	História familiar de câncer de mama		
Presente		3	12,5
Ausente		21	87,5

Tabela 2. Características das pacientes

ID	Dpre	Dpos	EC	HP	ER	PR	HER2	GH	LN
1	21	23	2B	CDI	+	+	-	3	12
2	14	16	2A	CLI	+	+	-	2	3
3	25	18	2B	CDI	+	+	-	2	71
4	26	29	2B	CDI	+	+	+	3	30
5		38	2B	CDI	-	-	-	3	11
6	33	33	2B	CDI	+	+	-	2	0
7	30	34	2A	CLI	+	+	-	3	24
8	42	33	2A	CDI	-	-	+	3	0
9	32	35	2A	CDI	-	-	+	2	3
10	41	32	2A	CDI	+	+	-	2	13
11	41	38	2A	CDI	+	+	-	2	18
12	25	18	2A	CDI	-	+	-	3	4
13	33	35	2A	CDI	+	+	+	2	0
14	24	29	2A	CM	-	-	+		0
15	26	37	X	CDI	+	+	+	2	0
16	32	18	2A	CLI	+	-	-	3	0
17	46	53	2A	CDI	-	-	-	2	17
18	22	28	2B	CDI	+	+	-	3	0
19	23	12	2A	CDI	+	+	+	2	3
20	36	32	2A	CDI	-	-	+	2	5
21	14	15	2A	CDI	-	-	-	2	0
22	16	29	2B	CDI				2	20
23	18		2A	CLI	-	+	-	2	36
24	16	16	2B	CDI	-	+	+	2	12

Tabela 3: Características das pacientes e dos tumores.

ID identificação, Id:idade, Dpre: diâmetro pré calcitriol, Dpos: diâmetro pos calcitriol, E C: estágio clínico AP histopatológico, CDI: carcinoma ductal invasivo, CLI: cacinima lobular invasivo, CM carcinoma metaplasico, GH: grau histológico, ER: receptor de estrogênio, PR: receptor de progesterona, HER2: erbB2, +: positivo, -: negativo, LN: linfonodos comproetidos

Concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)D₃

A concentração sérica média de 1,25(OH)₂D₃ pré suplementação foi de 69,11 pg/ml e pós suplementação foi de 55,32 pg/ml (tabela 3), isto é menor que a inicial. Observamos uma correlação positiva entre os valores pré e pós suplementação (figura 4).

	<i>Pré</i>	<i>Pós</i>	<i>N</i>	<i>p</i>
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)	69,11±30,88	55,30±26,55	19	0,039
25(OH)D ₃ (ng/mL)	30,10±9,51	25,68±8,02	19	0,019

Tabela 4. Concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ e 25(OH)D₃ pré e pós suplementação de calcitriol.

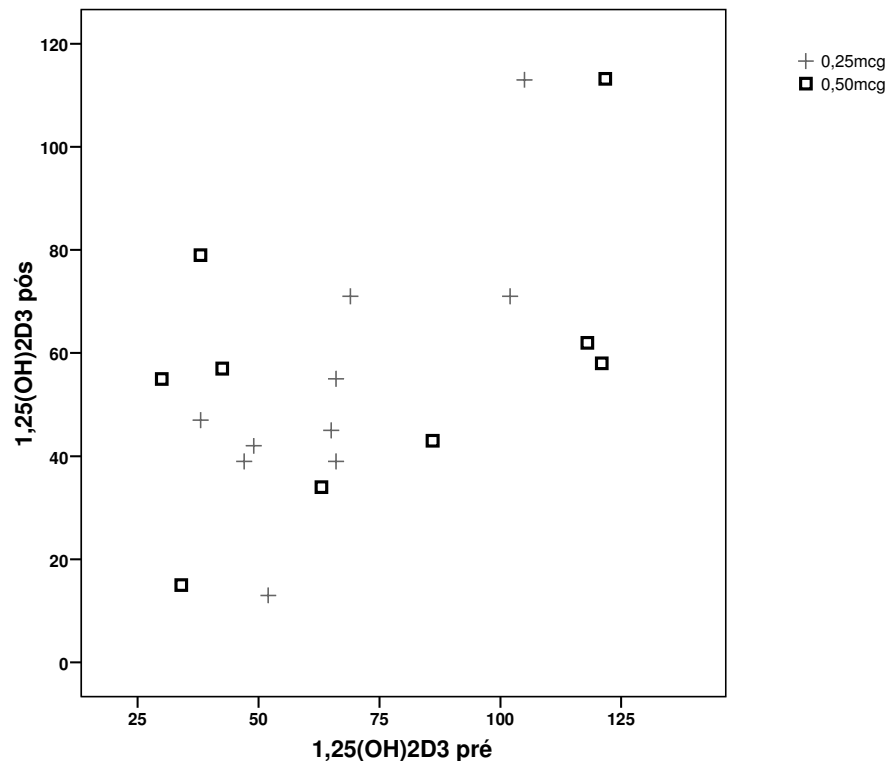


Figura 4. Concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ pré e pós suplementação de calcitriol 0,25 ou 0,50 µg/ dia (n=19, r=0,567; p=0,011, correlação Pearson).

O período médio de suplementação com calcitriol foi de 32,4 dias, variando de 23 a 49 dias. As primeiras dez pacientes receberam 0,25 µg/d e as próximas pacientes receberam 0,50 µg/dia de suplementação.

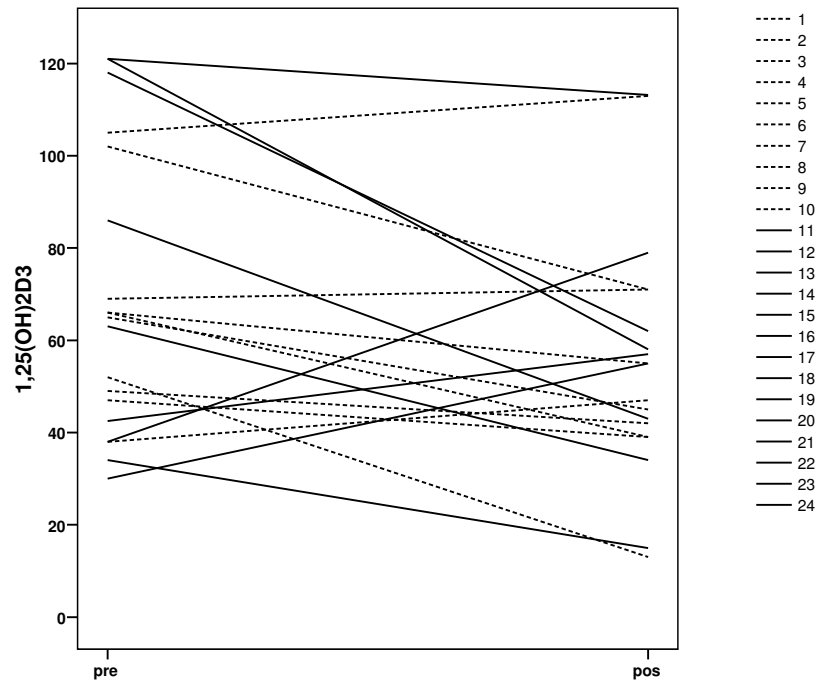


Figura 5 Concentração sérica individual de 1,25(OH)₂D₃ antes (pré) e após (pós) suplementação com calcitriol 0,25µg/d (linha tracejada) ou 0,50µg/d (linha contínua).

Nenhuma das pacientes apresentou concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ menor que 16 pg/mL, considerado limite inferior da normalidade do teste, tanto pré, quanto pós suplementação. Seis pacientes apresentaram alta concentração de 1,25(OH)₂D₃, isto é acima de 56 pg/mL, em ambas as determinações (pré e pós suplementação),

enquanto cinco e três pacientes apresentaram concentração sérica elevada apenas pré ou pós suplementação, respectivamente (figura 5).

Dentre as dez pacientes que receberam calcitriol 0,25µg ao dia, observamos uma correlação positiva entre concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ pré e pós suplementação (n=10; r=0,788, p=0,007, correlação de Pearson) e menor concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ pós intervenção (tabela 5).

No grupo de pacientes que recebeu 50µg de calcitriol ao dia, também observamos correlação positiva entre as concentrações de 1,25(OH)₂D₃ pré e pós suplementação, entretanto, não detectamos variação da concentração sérica de 1,25(OH)₂D₃ pós suplementação (tabela 5).

Suplementação Calcitriol/dia	Concentração sérica				
		Pré supl.	Pós supl	n	p
0,25µg	1,25(OH) ₂ D ₃ pg/ml	65,9±22,25	53,5±26,79	10	0,042
	25(OH)D ₃ ng/ml	35,0±8,44	28,9±8,41	10	0,036
0,50µg	1,25(OH) ₂ D ₃ pg/ml	72,68±39,51	57,35±27,74	9	0,242
	25(OH)D ₃ ng/ml	24,66±7,76	22,11±6,15	9	0,309

Tabela 5. Concentração sérica de 25(OH)D₃ (ng/ml) e 1,25(OH)₂D₃ (pg/ml) antes e após suplementação de calcitriol 0,25µg/d ou 0,50µg/d (teste-t , pareado).

A concentração sérica de 25(OH)D₃ apresentou-se em nível de suficiência (≥ 30 ng/mL) nas duas condições, isto é, pré e pós suplementação, em apenas 4 pacientes, e em nível de insuficiência (≤ 20ng/mL) tanto pré quanto pós suplementação, em três pacientes. Logo, a maioria das pacientes apresentava níveis de 25(OH)D₃ de relativa

insuficiência (<30ng/ml), em pelo menos uma das mensurações (pré ou pós suplementação).

A concentração média sérica de 25(OH)D₃ foi menor após a suplementação de calcitriol (tabela 4), havendo correlação positiva entre as dosagens pré e pós intervenção (n=19, r=0,647, p=0,003, correlação de Pearson). Houve correlação entre as concentrações séricas de 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃ (figura 6), mas não houve correlação entre a concentração sérica pré suplementação e a idade das pacientes (n=22, r=0.203, p=0.365, correlação Person).

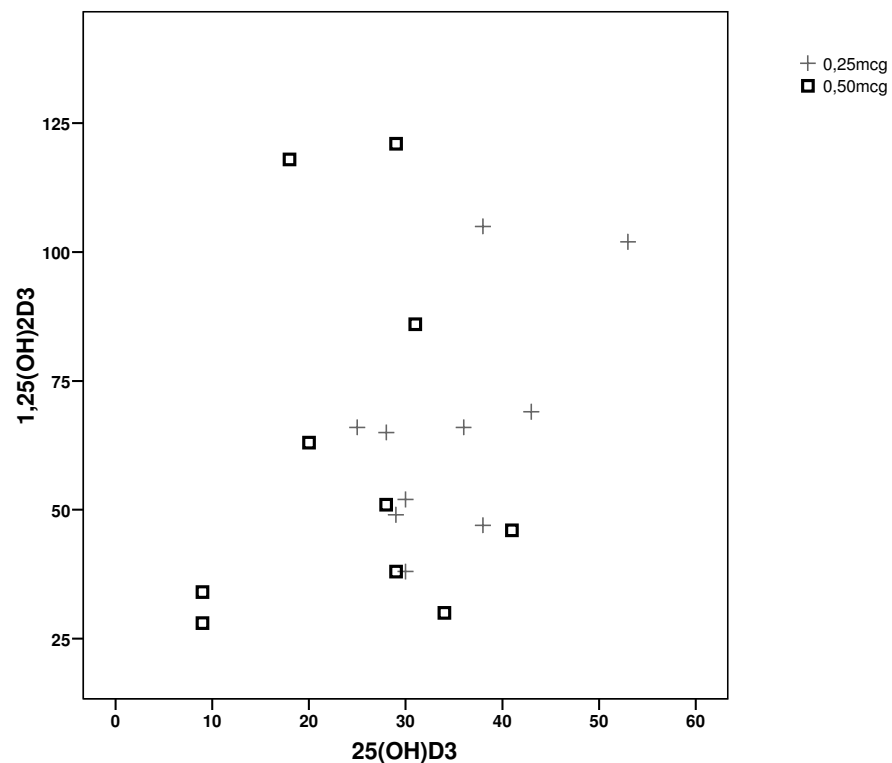


Figura 6 Concentração sérica de 25(OH)D₃ (ng/ml) e 1,25(OH)₂D₃ (pg/ml) antes e após suplementação de calcitriol 0,25µg/d ou 0,50µg/d.

Dimensão do tumor

Houve correlação positiva entre o diâmetro tumoral pré e pós suplementação avaliados pela ultrassonografia (figura 7) e entre a dimensão tumoral avaliada ao exame físico pré biópsia e o exame histopatológico do produto da operação (figura 8). A dimensão tumoral pós suplementação avaliada pela ultrassonografia também se correlacionou com a dimensão histopatológica do produto cirúrgico ($n=23$, $r=0,534$, $p=0,009$).

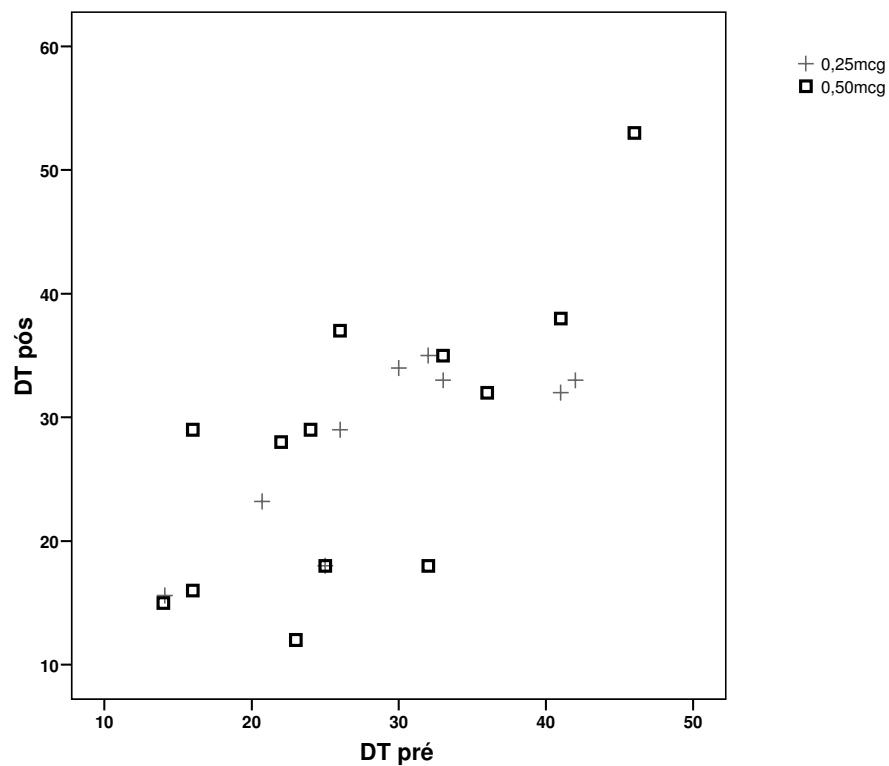


Figura 7 Diâmetro tumoral (mm)(DTpre) pré e pos (DTpós) suplementação de calcitriol 0,25 μ g/d ou 0,50 μ g/d, avaliados pelo ultrassom ($n=23$, $r=0,733$, $p<0,001$; correlação de Pearson).

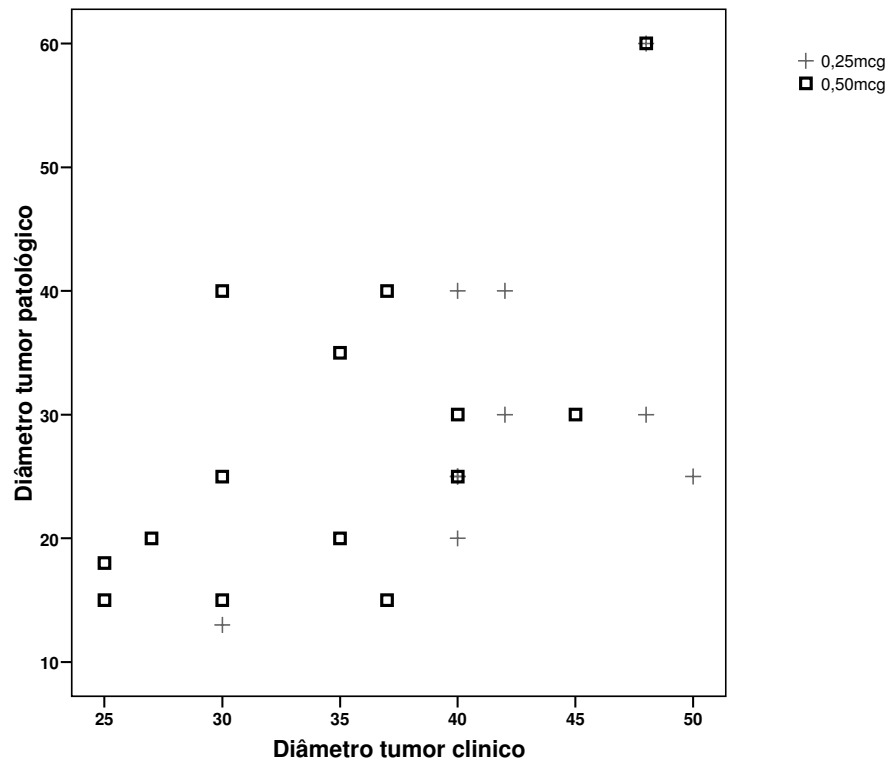


Figura 8: Dimensão tumoral (mm) ao exame físico pré biópsia (DTC) e ao exame histopatológico do produto da peça cirúrgica (DTP) (n=24, r=0,566, p=0,004, Correlação pearson)

Não observamos alteração da dimensão média do tumor ao exame ultrassonográfico antes e após a suplementação de calcitriol (tabela 6). A diferença percentual média da dimensão pré e pós intervenção foi de 11,86.

Quatro tumores tiveram dimensão que variou acima de 30% nas avaliações ultrassonográficas pré e pós suplementação. Em dois tumores com aparente aumento de dimensão ultrassonográfica pós intervenção (16 → 29 mm, e 26 → 37 mm, pré e pós) o exame histopatológico revelou tumores menores, isto é, de 20 e 30 mm, respectivamente. Em dois casos

de possível redução, ao exame ultrassonográfico (32 →18 e 23→12mm), o exame histopatológico confirmou a presença de tumor pequeno de 15 mm.

<i>Suplementação de Calcitriol</i>	<i>Média ±DP (mm)</i>
antes	28,08 ± 9,36
após	27,85 ± 9,92

Tabela 6 Dimensão tumoral avaliada à USG da mama antes e após suplementação de calcitriol (n=23; p=0.468, teste t pareado)

Expressão de Ki67

Dez pacientes apresentaram expressão de Ki67 acima de 10% na amostra pré suplementação, sendo que três delas persistiram com tumor com alto índice de proliferação (>10%) após a suplementação. Duas pacientes apresentaram expressão tumoral de Ki67 > 10% apenas na amostra pós suplementação (figura 9).

Observou-se uma redução da expressão de Ki67, que foi de 9,72% em amostras pré, para 5,89% em amostras pós suplementação (tabela 7, figura 10).

<i>Ki67</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>DP</i>
pré	24	9,72	6,80
pós	24	5,89	4,73

Tabela 7. Expressão de Ki67 pré e pós suplementação de calcitriol, p=0,020, test *t* de student.

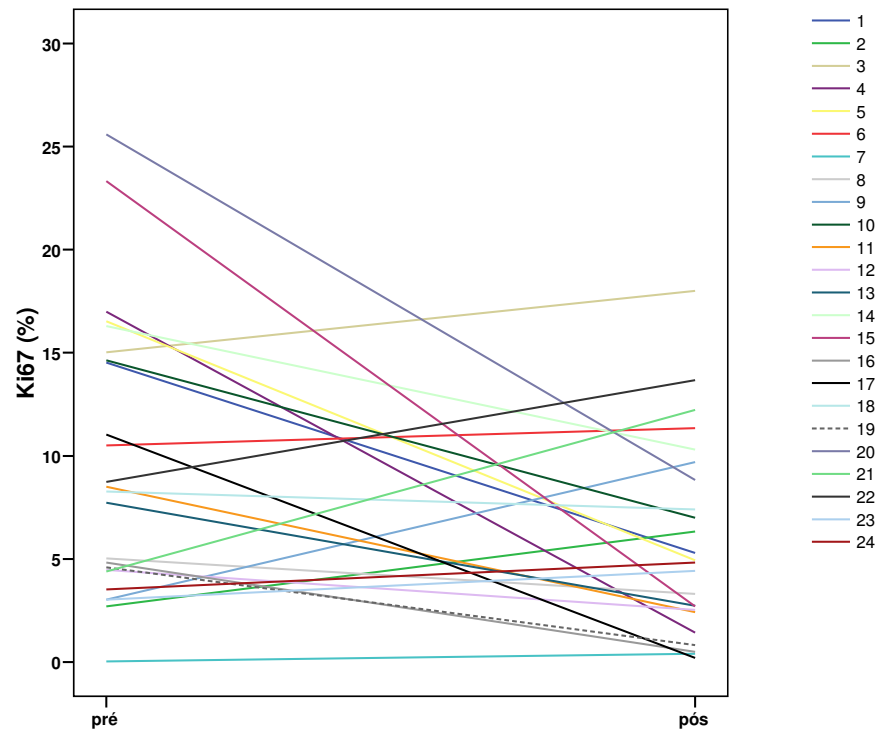


Figura 9. Expressão de Ki67 avaliada por ensaio imunohistoquímico em amostras de câncer de mama pré e pós suplementação de calcitriol 0,25µg/d (pacientes 1-10) e 0,50µg/d (pacientes 11-24)

Não houve correlação entre expressão tumoral de Ki67 e concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($n=38$, $r=0,074$, $p=0,657$) bem como não houve correlação entre expressão de Ki67 e concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ ($n=42$, $r= -0,034$, $p=0,832$). A expressão tumoral de Ki67 pós suplementação também não se correlacionou à dose total de calcitriol recebida (figura 11).

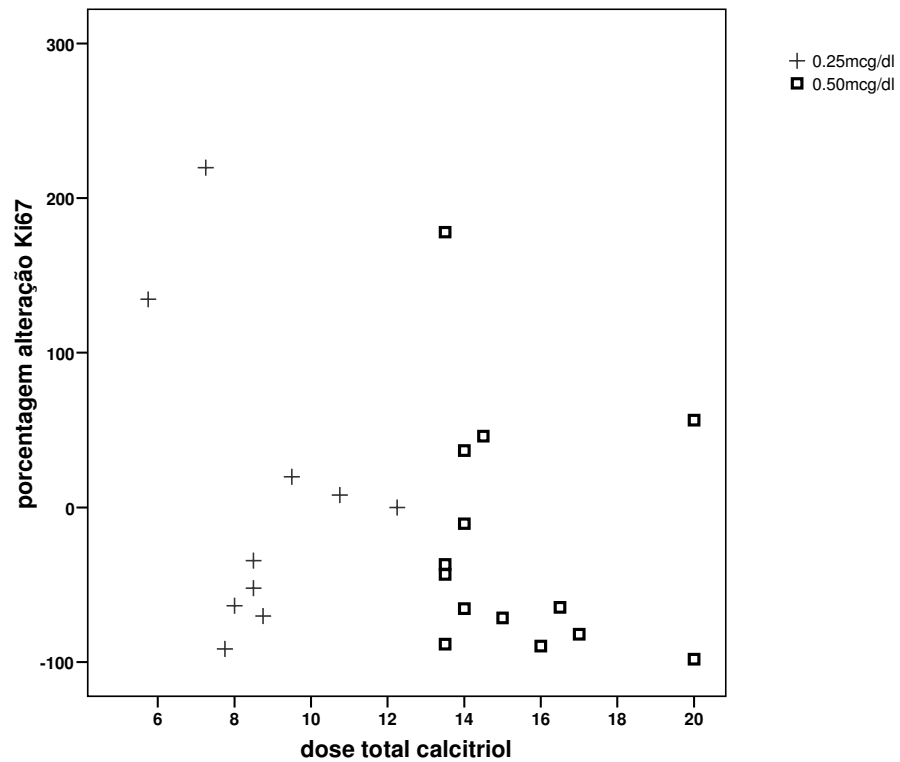


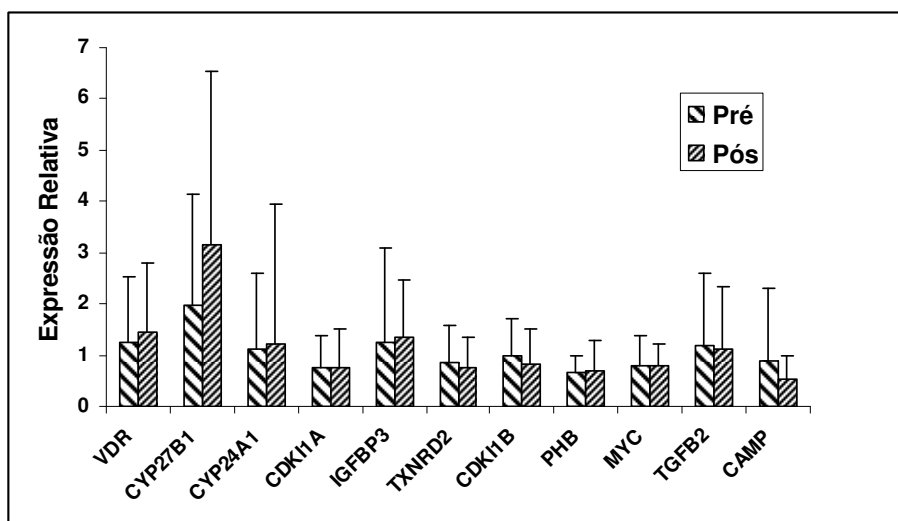
Figura 11. Variação percentual da expressão de Ki67(%) entre amostras pré e pós suplementação em relação à dose total de calcitriol recebida (tempo x dose).

Expressão de genes alvo

Avaliamos a expressão relativa dos genes VDR, CYP24A1, IGFBP3, PHB, TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, MYC em amostras coletadas antes e após a suplementação com calcitriol, e não observamos qualquer variação (figura 12 e tabela 8).

	Pré	Pós	n	p
VDR	1,25 ± 1,29	1,46 ± 1,34	18	0,926
CYP27B1	1,97 ± 2,17	3,17 ± 3,37	18	0,170
CYP24A1	1,13 ± 1,45	1,22 ± 2,74	16	0,418
CDK11A	0,74 ± 0,65	0,75 ± 0,75	15	0,940
IGFBP3	1,24 ± 1,86	1,35 ± 1,13	18	0,741
TXNRD2	0,86 ± 0,71	0,77 ± 0,57	17	0,400
CDK11B	0,98 ± 0,74	0,83 ± 0,67	16	0,359
PHB	0,66 ± 0,34	0,68 ± 0,60	16	0,918
MYC	0,78 ± 0,60	0,80 ± 0,40	18	0,896
TGFB2	1,18 ± 1,40	1,13 ± 1,20	18	0,896
CAMP	0,90 ± 1,41	0,52 ± 0,46	15	0,317

Tabela 8 e Figura 12. Expressão relativa de genes avaliada por RT-PCR em tempo real em amostras de câncer de mama coletadas antes e após suplementação com calcitriol (teste-*t*, pareado).



A expressão de VDR foi detectada com valor de CT médio de 20,92 ($\pm 2,93$) e a expressão de CYP24A1 foi baixa, representada pelos valores de CT mais altos ($26,26 \pm 2,24$) em relação aos demais genes alvo e genes referência GAPDH ($12,24 \pm 2,24$), ACTB ($12,37 \pm 2,85$) e RPLP0 ($11,89 \pm 2,30$).

Houve correlação positiva da expressão de VDR, CYP24A1, IGFBP3, TXNRD2, bem como tendência a correlação da expressão de PHB, em amostras pré e pós suplementação. Entretanto, não houve correlação da expressão de TGFB2, CDKN1A, CDKN1B, CYP27B1, e MYC, entre amostras pré e pós intervenção (tabela 9).

	n	r	p
VDR	18	0,499	0,035
CYP24A1	17	0,817	0,001
IGFBP3	18	0,810	0,001
CYP27B1	18	0,174	0,490
TXNRD2	18	0,696	0,001
PHB	18	0,458	0,056
TGFB2	18	0,355	0,149
CDKI1A	18	0,275	0,270
CDKI1B	18	0,174	0,490
MYC	18	-0,048	0,851

Tabela 9. Correlação entre expressão tumoral de genes alvo pré e pós suplementação de calcitriol.

6. Discussão

Trabalho prévio de nosso grupo indica que a concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é menor em pacientes com câncer de mama em relação a mulheres sem câncer. Determinamos agora se a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ altera a proliferação e expressão de genes alvo em células malignas em pacientes pós menopausadas.

A concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ neste grupo de pacientes pós-menopausadas foi aparentemente mais alta que aquela encontrada por nós em outro grupo de mulheres com câncer de mama (Lyra et al. 2006) e nenhuma dessas mulheres apresentou níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ abaixo do limite inferior da normalidade, estabelecido pelo teste.

Em nossas pacientes não observamos elevação da concentração sérica de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ após a suplementação de calcitriol. Estes resultados pode ser atribuídos ao fato que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ apresenta rápida taxa de desaparecimento do plasma, em conseqüência da sua alta afinidade pelo receptor e metabolismo. Mason et al., (1980) demonstraram que após administração oral de $4\mu\text{g}$ de calcitriol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o pico da concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ocorre em 4 horas, com retorno ao nível basal em 27 horas. De acordo com estes dados, Smith et al., (1999) mostraram que a administração de doses mais elevadas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($2-10\mu\text{g}$) por via subcutânea levam a pico de concentração plasmática mais precoce que a via oral, isto é, em 1-2 horas, com meia vida de 10-16

minutos, sem alteração na concentração de equilíbrio dinâmico entre os dias 1 e 7 da administração.

Acreditamos que, apesar de a concentração sérica de equilíbrio de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não ter se elevado após suplementação, que as células tenham sido expostas a níveis mais altos do hormônio, que ocorrem por cerca de 12 horas após a ingestão oral de calcitriol. Além disso, estudos indicam que o efeito biológico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece persistir por 7 a 8 dias (Brickman et al., 1974; Rosen et al., 1977).

Não observamos variação do diâmetro tumoral avaliado por mensuração ultrassonográfica. De acordo com nossos dados, Colston et al., (1989) demonstraram que, em ratos com tumor de mama induzido por nitrosometiluréia, a administração de um precursor de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por 30 dias, leva à estabilização da doença. Além disso, estudo clínico em pacientes com câncer de próstata metastático que progrediu após hormonioterapia, indica uma tendência a maior sobrevida global no grupo que recebeu calcitriol associado a docetaxel, em relação àquela tratado apenas com o quimioterápico, apesar de PSA sérico e taxa de resposta semelhantes nos dois grupos (Beer et al., 2007).

A vitamina D tem também ação quimiopreventiva, ao retardar e inibir o aparecimento de tumores. Deste modo, Murillo et al., (2005) demonstraram que a administração de análogo da vitamina D, que se inicia antes e é mantida após a exposição a carcinógenos químicos, causa redução na incidência e maior latência no aparecimento do câncer de mama. Entretanto, estudo clínico prospectivo mostrou que a suplementação

de vitamina D e cálcio não reduziu a incidência de câncer colorretal (Wactawski-Wende et al., 2006) e mamário. Por outro lado, no grupo que recebeu placebo, uma maior ingestão de vitamina D associou-se a menor risco de câncer de mama. Além disso, os tumores observados no grupo de suplementação foram menores que os do grupo controle (Cheblowski et al., 2006).

Detectamos uma menor expressão tumoral de Ki67 nas amostras pós suplementação com calcitriol, em relação ao seu par pré suplementação, sugerindo uma redução da proliferação tumoral. De acordo com estes dados Gibbs et al., (1996) descreveram em modelo de cultura de queratinócitos humanos tratados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ uma diminuição da expressão de Ki67.

A determinação da expressão de Ki67 tem sido utilizada como um marcador de proliferação durante a hormonioterapia administrada a pacientes com câncer de mama. Deste modo, Dowsett et al., (2005) analisaram a expressão tumoral de Ki67 em pacientes pós menopausadas com tumor hormônio-responsivo antes e duas semanas após o uso de tratamento neoadjuvante com anastrozol, tamoxifeno ou ambos. Observaram que a maioria dos tumores apresentava inicialmente marcação em 0-20% das células e que após duas semanas ocorria uma redução média de 65%. De acordo com estes dados, em amostras tumorais ora analisadas, a expressão de Ki67 foi de 0-26% e a variação percentual mediana entre amostras pré e pós suplementação foi de 40,04%.

Vários estudos, inclusive do nosso grupo, demonstraram que as ações da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, incluindo o efeito anti proliferativo, dependem do conteúdo intracelular de VDR (Escaleira et al., 1999). A expressão de VDR foi demonstrada em tecido mamário humano normal (Friedrich et al., 2002) e em câncer de mama (Friedrich et al., 1998; Bortman et al., 2002). Em nosso estudo a expressão tumoral de VDR não se alterou com a suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Em nosso trabalho prévio não encontramos correlação entre nível sérico de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e expressão de VDR (Lyra et al., 2006). Além disso, Anderson et al., (2005) não observaram variação da expressão de VDR em linhagens de câncer de mama MCF7 e câncer colônico SW620 tratadas por 48 horas com concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que variaram de 1nM a $1\mu\text{M}$. Por outro lado, Swami e col. (2003) sugerem aumento discreto da expressão de VDR (1.5 a 2 vezes) após tratamento curto (6-24h) com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 50nM, enquanto Escalera & Brentani (1998) indicam uma redução da expressão de VDR mediante tratamento com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10nM de células mamárias imortalizadas não tumorigênicas HC11 por 72 horas. Estes dados sugerem que a exposição de células mamárias normais ou cancerosas apresentam regulação diferencial da expressão de VDR, quando expostas a doses suprafisiológicas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

A enzima 24 hydroxylase (CYP24A1) promove a hidroxilação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, originando metabólitos menos ativos isto é, com menor afinidade por VDR. A expressão de 24 hidroxilase é diretamente induzida pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, pois esta apresenta 2 elementos de resposta à vitamina

D na região promotora do gene (Chen et al., 1994). Entretanto, não observamos alteração da expressão de CYP24 em amostras de câncer de mama, após a suplementação de calcitriol. De acordo com estes dados, não verificamos previamente correlação entre concentração sérica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e expressão de 24 hidroxilase em pacientes com câncer de mama (Lyra et al., 2006).

Demonstrou-se indução precoce da expressão de CYP24 em células de câncer mama MCF-7 e MDA-MB231 tratadas com concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de 1 nM a 1 μM , por períodos que variaram de 2 a 48 horas (Swami et al., 2003, Turunen et al., 2007, Anderson et al., 2005). A regulação da expressão de CYP24 mediante suplementação por um período mais extenso pode envolver mecanismos diversos, pois a enzima atua sobre a forma ativa da vitamina D, que por sua vez é um indutor da expressão da enzima. Além disso, outros autores descrevem um dissociação dos efeitos anti-proliferativos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e da indução da transcrição de CYP24A1 (Peng et al., 2006; Verlinden et al., 2005)

A $25(\text{OH})\text{D}_3$ é convertida à forma ativa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pela ação da enzima 1α hidroxilase (CYP27B1). Esta enzima está expressa principalmente no rim, órgão responsável pela concentração circulante de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, porém a existência da enzima em vários outros órgãos, como o cólon (Ogunkolade et al., 2002) e mama (Hewison et al., 2000, Friedrich et al., 2003, Albertson et al., 2000, Sergersten et al., 2005, Townsend et al., 2005), sugere que a ativação local de $25(\text{OH})\text{D}_3$ esteja associada ao papel parácrino do hormônio (Zehnder et al., 2001). Em rim e fígado, descreve-se a diminuição de mRNA de CYP27 após dose única intra venosa de

1,25(OH)₂D₃ (Axen et al., 1995), desde que foram descritos três VDRE na região promotora do gene CYP27B1, todos com função inibitória (Turunen et al., 2007, Murayama et al., col. 1998, Armbrecht et al., 2003).

No presente estudo nós não observamos variação de expressão de CYP27B1 em amostras de câncer de mama pré e pós suplementação de calcitriol e de acordo com estes dados, Turunen et al., (2007) não detectaram variação da expressão de CYP27 em células MCF-7 tratadas com 1,25(OH)₂D₃ 10nM por períodos de 2-14 horas.

A 1,25(OH)₂D₃ inibe a proliferação ao induzir um bloqueio da fase G0/G1, que pode ser mediado pela indução de expressão de inibidores da atividade de CDK como p21^{waf1} (CDKN1A) (Katayama et al., 2003) p27^{kipi}(CDKN1B) (Yeudall et al., 1995), e regulação da expressão de outras proteínas que controlam a progressão do ciclo celular como 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).

Em células MCF-7 e células mamárias normais HC11 o hormônio induz a expressão de CDKN1A (Jensen et al., 2001; Katayama et al., 2003) e em células de câncer de mama BT-20 e ZR-75 descreve-se aumento de expressão de CDKN1A e de CDKN1B (Wu et al., 1997; Verlinden et al., 1998; Jensen et al., 2001). Por outro lado, Jensen et al. (2001) e Katayama et al. (2003) não observaram indução de CDKN1B, em células MCF7 e HC11 expostas à 1,25(OH)₂D₃. Regulação positiva da expressão de CDKN1A pela 1,25(OH)₂D₃ pode ser explicada pela presença de VDRE na região promotora do gene (Liu et al., 1996) ou pode ser secundária à

indução da via de TGF beta (Koli et al., 1995). Demonstrou-se inclusive, que TGF β 2 é alvo direto da ação do hormônio (Wu et al., 1999, Ammanamanchi et al., 1998). Entretanto, a indução da expressão de TGF β 2 foi observada em alguns estudos (Townsend et al., 2006), mas não em outros (Katayma et al., 2003), que avaliaram células mamárias normais ou tumorais. Nossos dados atuais também não demonstram variação da expressão de TGF β 2 em amostras de câncer de mama pré e pós suplementação de calcitriol.

Outro gene candidato a regulação pela 1,25(OH) $_2$ D $_3$ é IGFBP3 (proteína ligante 3 fator de crescimento insulina símile) , a qual regula a atividade do fator de crescimento insulina símile (IGF), um importante fator mitogênico para epitélio mamário normal e células de câncer de mama (Wood et al., 2000). Em linhagem de câncer de próstata LNCap, o mecanismo para a inibição do crescimento pela 1,25(OH) $_2$ D $_3$ envolve IGFBP-3 e p21^{WAF1/CIP1} (Boyle et al. 2001). Em células HC11 e MCF7, maior expressão de IGFBP-3 e p21^{WAF1/CIP1} foram detectadas mediante exposição a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Katayama et al., 2003; Townsend et al., 2006; Colston et al., 1998). Entretanto o mecanismo molecular pelo qual a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ estimula a expressão de IGFBP3 não está completamente entendido. Descreve-se aumento da transcrição do gene (Kveiborg et al., 2001), mas VDRE não foi demonstrado na região promotora do gene (Albiston et al., 1995; Tsubaki et al., 2002). Nossos dados atuais não demonstram regulação de IGFBP3 pela suplementação oral de calcitriol.

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pode também estar ligada à regulação de genes de resposta precoce, cujos produtos são fatores transcricionais, que modulam o crescimento celular, diferenciação e apoptose, entre eles, MYC (Saunders et al., 1993). Redução da transcrição de MYC foi descrita em células HC11 e MCF7 tratadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Katayama et al., 2003 e Jensen et al., 2001). O mecanismo proposto foi o bloqueio da elongação da transcrição do exon 1 do gene MYC, mediado pela proteína HOXB (Pan et al., 1999). Nestas amostras tumorais não observamos a regulação da expressão do gene MYC.

O gene proibitina (PHB) codifica um transcrito que exerce atividade anti-proliferativa e está expresso em várias linhagens de câncer de mama (Jupe et al., 1996), as quais são alvo da ação antiproliferativa da vitamina D (Peng et al., 2007). A proibitina, por sua vez, é potencial gene alvo do hormônio, desde que apresenta possíveis sítios de ligação a VDR em sua região promotora (Peng et al., 2007).

Não observamos variação da expressão relativa de proibitina entre amostras pré e pós-suplementação, e este fato pode ser em parte atribuído à sua modulação complexa, pois a relação entre regulação da expressão de proibitina e resposta anti-proliferativa à vitamina D também é influenciada por fatores contidos no soro (Peng et al., 2007).

Há indícios que a super-expressão de proibitina, esteja envolvida na ação anti-proliferativa da vitamina D (Peng et al., 2006) e coincidentemente, observamos que este transcrito teve expressão relevante nos tumores analisados, visto que o limiar de detecção da reação

de PCR foi baixo (CT15,6). Como detectamos uma redução de proliferação, mediante a suplementação de calcitriol, é possível que a proibitina seja um dos mediadores desta ação.

Este é o primeiro estudo a avaliar o potencial anti-proliferativo do calcitriol *in vivo*, em amostras de câncer de mama. Neste pequeno número de pacientes pós menopausadas, observamos que a suplementação oral de calcitriol leva a uma redução da expressão tumoral de Ki67. Estes dados merecem investigação adicional para se identificar as vias induzidas por concentrações fisiológicas de calcitriol.

7. Referências

Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D, Chang-Claude J. Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of postmenopausal 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.

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.

Albiston AL, Saffery R, Herington AC. Cloning and characterization of the promoter for the rat insulin-like growthfactor-binding protein-3 gene. *Endocrinology*. 1995 Feb;136(2):696-704

Ammanamanchi S, Kim SJ, Sun LZ, Brattain MG. Induction of transforming growth factor-beta receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through SP1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16527-34.

Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006 Jan;57(2):234-40 2005

Armbrecht HJ, Boltz MA, Hodam TL. PTH increases renal 25(OH)D3-1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) mRNA but not renal 1,25(OH)2D3 production in adult rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 May;284(5):F1032-6

Axen E, Postlind H, Wikvall K. Effects on CYP27 mRNA expression in rat kidney and liver by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3, a suppressor of renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 4;215(1):136-41

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, 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

Bland R, Zehnder D, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase along the nephron: new insights into renal vitamin D metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000 Jan;9(1):17-22. Review

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.

Boyle BJ, Zhao XY, Cohen P, Feldman D. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *J Urol*. 2001 Apr;165(4):1319-24

Brickman AS, Coburn JW, Massry SG, Norman AW, 1,25 Dihydroxy-vitamin D3 in normal man and patients with renal failure, *Ann Intern Med*. 80 (1974) 161-168

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.

Chen ML, Heinrich G, Ohyama YI, Okuda K, Omdahl JL, Chen TC, Holick MF. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA in cultured human keratinocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1994 Oct;207(1):57-61

Chlebowski RT, Johnson KC, Kooperberg C, Hubbell A, Lane D, O'Sullivan M, Cummings S, Rohan T, Yasmeen S, Khandekar J, The women's health Initiative Randomized Trial of calcium plus vitamin D: effects on breast cancer and arthralgias. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, N°. 18S (Supplement), 2006: LBA6

Colston KW, Perks CM, Xie SP, Holly JM. Growth inhibition of both MCF-7 and Hs578T human breast cancer cell lines by vitamin D analogues is associated with increased expression of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Mol Endocrinol*. 1998 Feb;20(1):157-62

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.

Davis, ME. The physiology and management of the menopause. In: Marcus, S.L. & Marcus, C.C. *Advances in Obstetrics and Gynecology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1967.

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.

Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I, Salter J, Detre S, Hills M, Ashley S, Francis S, Walsh G, Smith IE. Biomarker changes during neoadjuvant anastrozole, tamoxifen, or the combination: influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer--a study from the IMPACT trialists. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 10;23(11):2477-92. Epub 2005 Mar 14

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.

Escaleara 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.

Feldman D, McCain TA, Hirst MA, Chen TL, Colston KW. Characterization of a cytoplasmic receptor-like binder for 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol in rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem*. 1979 Oct 25;254(20):10378-84.

Folgueira MA, Federico MH, Katayama ML, Silva MR, Brentani MM. Expression of vitamin D receptor (VDR) in HL-60 cells is differentially regulated during the process of differentiation induced by phorbol ester, retinoic acid or interferon-gamma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998 Aug;66(4):193-201

Folgueira MA, Federico MH, Roela RA, Maistro S, Katayama ML, Brentani MM. Differential regulation of vitamin D receptor expression in distinct leukemic cell lines upon phorbol ester-induced growth arrest. *Braz J Med Biol Res.* 2000 May;33(5):559-68

Friedrich M, Axt-Fliedner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. *Histochem J.* 2002 Jan-Feb;34(1-2):35-40

Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:239-46

Friedrich M, Rafi L, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Expression of 1,25-dihydroxy vitamin D3 receptor in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 1998 Nov;46(11):1335-7

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 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

Gibbs S, Backendorf C, Ponc M. Arch. Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation by all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic acid and 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Dermatol. Res.* 1996 Nov;288(12):729-38.

Henry, H.L.; Norman, A.W. Vitamin D metabolism e biological actions *Ann. Ver. Nutr.* 1986; 6: 527-62.

Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):141-8. Review

Holick MF, Kleiner-Bossaller A, Schnoes HK, Kasten PM, Boyle IT, DeLuca 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.

Jensen SS, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-Sphase-controlling machinery *Mol. Endocrinol*. 2001 Aug;15(8):1370-80.

Jupe ER, Liu XT, Kiehlbauch JL, McClung JK, Dell'Orco RT. Prohibitin in breast cancer cell lines: loss of antiproliferative activity is linked to 3' untranslated region mutations, *Cell Growth Differ*. 1996 Jul;7(7):871-8.

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.

Koli K, Keski-Oja J. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the expression of transforming growth factor beta 1 and its latent form binding protein in cultured breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 1995 Apr 1;55(7):1540-6.

Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M. Transforming growth factor-beta1 stimulates the production of insulin-like growthfactor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrowstromal osteoblast progenitors. *J Endocrinol*. 2001 Jun;169(3):549-61

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 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 1alpha-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.

Mason RS, Lissner D, Posen S, Norman AW. Blood concentrations of dihydroxylated vitamin D metabolites after an oral dose. *Br Med J*. 1980 Feb 16;280(6212):449-50.

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

Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Koderu Y, Hosoya T, Kato S. The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1

alpha,25(OH)2D3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Aug 10;249(1):11-6.

Murillo G, Mehta RG. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1alpha-hydroxyvitamin D5. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97(1-2): 129-36.

Ogunkolade BW, Boucher BJ, Fairclough PD, Hitman GA, Dorudi S, Jenkins PJ, Bustin Expression of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase mRNA in individuals with colorectal cancer.SA. *Lancet.* 2002 May 25;359(9320):1831-2.

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.

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.

Pan Q, Simpson RU. c-myc intron element-binding proteins are required for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulation of c-myc during HL-60 cell differentiation and the involvement of HOXB4. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8437-44.

Peng X, Hawthorne M, Vaishnav A, St-Arnaud R, Mehta RG, 25-Hydroxyvitamin D(3) is a natural chemopreventive agent against carcinogen induced precancerous lesions in mouse mammary gland organ culture, *Breast Cancer Res Treat.* (2008).

Peng X, Mehta R, Wang S, Chellappan S, Mehta RG, Prohibitin is a novel target gene of vitamin D involved in its antiproliferative action in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):7361-9.

Rosen JF, Fleischman AR, Finberg L, Eisman J, DeLuca HF, 1,25-Dihydroxycholecalciferol: its use in the long-term management of idiopathic hypoparathyroidism in children, *J Clin Endocrinol Metab.* 45 (1977) 457-468

Saunders DE, Christensen C, Wappler NL, Schultz JF, Lawrence WD, Malviya VK, Malone JM, Deppe G. Inhibition of c-myc in breast and ovarian carcinoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid and dexamethasone. *Anticancer Drugs*. 1993 Apr;4(2):201-8

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

Segersten U, Holm PK, Bjorklund P, Hessman O, Nordgren H, Binderup L, Akerstrom G, Hellman P, Westin G. 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expression in breast cancer and use of non-1 α -hydroxylated vitamin D analogue. *Breast Cancer Res*. 2005;7(6):R980-6. Epub 2005 Oct 6.

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.

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

Tilyard MW, Spears GF, Thomson J, Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N Engl J Med.* 1992 Feb 6;326(6):357-62.

Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M. Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin. Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3579-86.

Townsend K, Trevino V, Falciani F, Stewart PM, Hewison M, Campbell MJ. Identification of VDR-responsive gene signatures in breast cancer cells. *Oncology.* 2006;71(1-2):111-23. Epub 2007 Mar 21.

Tsubaki J, Hwa V, Twigg SM, Rosenfeld RG. Differential activation of the IGF binding protein-3 promoter by butyrate in prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2002 May;143(5):1778-88

Turunen MM, Dunlop TW, Carlberg C, Väänänen S. Selective use of multiple vitamin D response elements underlies the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated negative regulation of the human CYP27B1 gene *Nucleic Acids Res.* 2007;35(8):2734-47. Epub 2007 Apr 10.

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.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

Verlinden L, Eelen G, Beullens I, Van Camp M, Van Hummelen P, Engelen K, Van Hellefont R, Marchal K, De Moor B, Fojier F, Te Riele H, Beullens M, Bollen M, Mathieu C, Bouillon R, Verstuyf A. Characterization of the condensin component Cnap1 and protein kinase Melk as novel E2F target genes down-regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem.* 280 (2005) 37319-37330.

Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)₂D₃ on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998 Jul 25;142(1-2):57-65.

Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, O'Sullivan MJ, Margolis KL, Ockene JK, Phillips L, Potters L, Prentice RL, Robbins J, Rohan TE, Sarto GE, Sharma S, Stefanick ML, Van Horn L, Wallace RB, Whitlock E, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Bonds DE,

Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Cochrane B, Garland C, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Jackson RD, Johnson KC, Judd H, Kooperberg CL, Kuller LH, LaCroix AZ, Lane DS, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE, Limacher MC, Manson JE; 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.

Wilson, J.D. And Foster, D.W. , Williams, Textbook of Endocrinology, 8th ed. 1992.

Wood TL, Rogler LE, Czick ME, Schuller AG, Pintar JE. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol. Endocrinol.* 2000 Sep;14(9):1472-82.

Wu G, Fan RS, Li W, Ko TC, Brattain MG. Modulation of cell cycle control by vitamin D₃ and its analogue, EB1089, in human breast cancer cells. *Oncogene.* 1997 Sep 25;15(13):1555-63.

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 Mar 2;38(9):2654-60.

Yeudall WA, Jakus J. Cyclin kinase inhibitors add a new dimension to cell cycle control. *Eur. J. Cancer, B, Oral Oncol.* 1995 Sep;31B(5):291-8.

Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):888-94

