



Ana Karina Bartmann

Dosagem sérica de vitamina D como fator preditivo do estado da  
massa mineral óssea em mulheres em uso de inibidores de aromatase

Campinas  
2012



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

Ana Karina Bartmann

Dosagem sérica de vitamina D como fator preditivo do estado da  
massa mineral óssea em mulheres em uso de inibidores de aromatase

Orientador: Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção de título de Doutora em  
Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

Este exemplar corresponde à versão final da tese  
defendida pela aluna Ana Karina Bartmann  
e orientado pelo Prof. Dr. João Francisco  
Marques Neto

Assinatura do Orientador

-----

Campinas  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B284d Bartmann, Ana Karina, 1974-  
Dosagem sérica de vitamina D como fator preditivo  
do estado da massa mineral óssea em mulheres em uso  
de inibidores de aromatase / Ana Karina Bartmann. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : João Francisco Marques Neto.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Osteoporose. 2. Inibidores da aromatase. 3.  
Densidade óssea. 4. Vitamina D. 5. Neoplasias da  
Mama. I. Marques Neto, João Francisco, 1946-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Blood measures of vitamin D are an effective way to follow bone mass reduction of women in treatment for breast cancer with aromatase inhibitors.

**Palavras-chave em inglês:**

Osteoporosis

Aromatase inhibitors

Bone density

Vitamin D

Breast neoplasms

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

João Francisco Marques Neto [Orientador]

José Roberto Provenza

João Carlos Tavares Brenol

Maria Elena Guariento

Cristina Laguna

**Data da defesa:** 28-08-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

**Ana Karina Bartmann**

---

---

Orientador: Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

---

---

### Membros:

---

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Laguna Benetti Pinto

2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elena Guariento

3. Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenot

4. Prof. Dr. José Roberto Provenza

5. Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

---

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 28/08/2012

---

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”

Jean Cocteau

“Ainda falta descobrir a serenidade  
Ainda falta dominar a ansiedade  
E aprender a esperar  
Ainda falta me pacificar  
Deixando o coração ficar mudo  
Ainda falta aprender quase  
Tudo”

Anna Duarte

À minha mãe, por quem me debrucei sobre essa pesquisa, pelo exemplo de  
mulher que estará para sempre impresso em mim

À minha filha, pela profunda transformação que realizou em meu corpo, minha  
mente, minha alma

## Agradecimentos

Ao Luiz Mario, meu verdadeiro amor. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo ouvido, pelo ombro, pela amizade que transcende tudo.

À minha família que unida novamente se fez e assim me permitiu voar.

Ao meu pai, meu amigo, meu exemplo.

À minha irmã pela ajuda com minha filha e com as intermináveis tabelas

A meu “filhão” Léo que deu real sentido à palavra família para mim

Ao meu tio, Flávio Bartmann, que de sua maneira, plantou uma sementinha em mim e me instigou a ser sempre mais.

À Professora Maria Aparecida que me acolheu em sua casa no momento mais difícil deste trabalho

Aos Profs Diniz e Maria Aparecida do Departamento de Estatística da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela imensa ajuda na análise estatística.

Ao querido amigo Jadson Luan dos Santos que realizou a análise estatística dos dados.

À minha querida sogra que fez a tradução para o inglês.

Aos funcionários da DOCUMENTA – Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem pela realização dos exames.

Às pacientes que, em sua dor, aceitaram participar da pesquisa, submetendo-se a exames e a questionamentos. Permanece a esperança de que um dia possamos fornecer-lhes respostas e soluções que amenizem as dificuldades que enfrentam.

À Adriana, secretária da pós-graduação da clínica médica, que atendeu às solicitações mais difíceis e urgentes nesses 4 anos

Finalmente, a meu querido João Francisco, meu grande orientador, que me acolheu quando ninguém mais – nem mesmo eu – acreditava. Obrigada pela luz, pelo sorriso, pelos contos, por ser essa extraordinária pessoa. Obrigada por me deixar voar, guiando-me e aconselhando-me.

## **Resumo**

**Introdução:** O uso de inibidores de aromatase para o tratamento de longo prazo de pacientes com câncer de mama com receptores hormonais positivos tem sido considerado uma boa maneira de controlar a doença em termos de recorrência e metástases. Infelizmente, no entanto, os inibidores de aromatase podem reduzir drasticamente a massa óssea mineral. Devido a este fato, hoje em dia tem sido considerado de extrema importância a realização de exames complementares para a avaliação do status ósseo como marcadores do metabolismo ósseo e densitometrias ósseas. A vitamina D é de especial interesse em termos de câncer, uma vez que poderia ser bom preditor do desenvolvimento não só da osteoporose, mas também de eventual recorrência tumoral.

**Material e Métodos:** A fim de verificar a relação entre a densidade mineral óssea (DMO) e valores de vitamina D foram avaliados níveis de vitamina D e cálcio no sangue, além de densitometrias ósseas e calciúria de 24 horas de 147 pacientes com diagnóstico de câncer de mama - 80 pacientes em uso de inibidores da aromatase e 67 pacientes em uso de tamoxifeno (grupo controle). As pacientes foram estratificadas por tempo de utilização da medicação: <1 ano, 1-2 anos, 2-3 anos, 3-4 anos e 4-5 anos. Vinte e um pacientes com baixa densidade mineral óssea e os valores baixos de vitamina D sérica foram tratadas com suplementação oral de 800 UI/dia de vitamina D durante 1 ano. Os valores de DMO, antes e depois do tratamento, foram comparados.

**Resultados:** Os usuários de inibidores de aromatase apresentaram menor densidade mineral óssea ( $p = 0,0162$  valor), bem como níveis mais baixos de vitamina D ( $p = 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle. Os grupos apresentaram valores de correlação distintos para as variáveis vitamina D e BMD. Como esperado, o grupo controle apresentou uma correlação positiva ( $r = 0,633$  com  $p$ -valor = 0,000). O grupo de utilizadores inibidores de aromatase apresentou um coeficiente de correlação baixa ( $r = 0,287$ , com valor de  $p = 0,01$ ), o qual foi explicado por uma maior diminuição dos valores de vitamina D no tempo quando comparado à diminuição na densidade mineral óssea. Finalmente, notamos uma diferença significativa entre valores de DMO antes e depois de um ano de tratamento com vitamina D.

**Conclusão:** Os resultados permitem sugerir que mulheres em tratamento com inibidores de aromatase que têm baixos níveis de vitamina D devem receber suplementos de vitamina D ainda que apresentem ou não osteoporose e/ou osteopenia.

## **Abstract**

**Introduction:** The use of aromatase inhibitors for long term treatment of patients with positive hormonal receptors breast cancer has been considered a good way to control the disease in terms of recurrence and local/ distant metastasis. Unfortunately however, aromatase inhibitors can reduce severely the mineral bone mass. Because of this fact, nowadays it has been considered of utmost importance to perform bone densitometries and collect samples of blood bone quality markers in the follow up of these patients. Vitamin D is of special interest in terms of cancer, since it could be good predictor of the development not only of osteoporosis but also of bone metastasis and tumoral recurrence in the breast.

**Material and Methods:** We compared levels of blood vitamin D and bone mineral density of 80 patients using aromatase inhibitors and 67 patients using tamoxifen (control group) in order to verify the relation between both variables. Patients were stratified by time of medication use: <1 year, 1-2 years, 2-3 years, 3-4 years and 4-5 years. Twenty-one patients with low BMD and similarly low values of blood vitamin D were treated with oral vitamin D supplementation 800 IU per day dose for 1 year. Values of BMD before and after treatment were compared.

**Results:** Aromatase inhibitors users have smaller BMD (p value = 0.0162) as well as lower levels of vitamin D (p value = 0.0001) in comparison to the control group. Groups presented distinct correlation values for the variables vitamin D and BMD. As expected, the control group showed a significant correlation (r = 0.633 with p-value = 0.000). The group of aromatase inhibitors users presented a low correlation coefficient (r = 0.287 with p-value = 0.01), which was explained by a greater decrease in the values of vitamin D in time when compared to the decrease in BMD. Finally we notice a significant difference between BMD values before and after one-year treatment with vitamin D.

**Conclusion:** We suggest that women in treatment with aromatase inhibitors who have low vitamin D levels receive dietary supplements of it, whether or not they have osteopenia or osteoporosis. Despite the fact that there is no protocol for breast cancer prevention with dietary supplements of vitamin D, we also suggest that women with high risk for breast cancer should undergo blood measurements of vitamin D and receive supplements if blood samples show low levels of it.

**Lista de Abreviações:**

DEXA/DXA – Densitometria óssea

DMO – Densidade Mineral Óssea

ER – *Estrogen Receptor* - Receptor de Estrogênio

FDA – *Food and Drug Administration*

FSH – *Follicle Stimulating Hormone* - Hormônio Estimulador de Folículos

GnRH – *Gonadotropin Releasing Hormone* -Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IL – Interleucina

LH – *Luteinizing Hormone* - Hormônio Luteinizante

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPG - Osteoprotegerina

PTH – Paratormônio

RANK – Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

SERM – Modulador do Receptor de Estrogênio Específico

TNF – *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

VDR – *Vitamin D Receptor* - Receptor da Vitamina D

## **Lista de Ilustrações:**

Figura 1 – Classificação dos Inibidores da Aromatase -----	pág 19
Tabela 1 – Doses equivalentes dos principais inibidores da aromatase usados clinicamente -----	pág 19
Figura 2 – Sítios de ação dos inibidores da aromatase seletivos e não seletivos --	pág 19
Figura 3 – Estrutura química do tamoxifeno -----	pág 20
Figura 4 – Eixo RANK/RANKL/Osteoprotegerina e Inter-relações entre estrogênio, interleucina 6 (IL-6), osteoblastos e osteoclastos ----	pág 24
Figura 5 – Recomendações para realização de DEXAs -----	pág 28
Figura 6 – Biossíntese da Vitamina D -----	pág 33
Figura 7 – Ação da 1,25 (OH) Vitamina D nas células mamárias -----	pág 34
Tabela 2 – Pacientes usuárias de inibidor da aromatase -----	pág 41
Tabela 3 – Pacientes usuárias de tamoxifeno (grupo controle) -----	pág 43
Tabela 4 – Resumo descritivo dos resultados de ambos os grupos -----	pág 48
Gráfico 1 – Blox-plot dos valores de DEXA de coluna lombar e fêmur nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação -----	pág 50
Gráfico 2 – Blox-plot dos valores de Vitamina D nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação -----	pág 51
Gráfico 3 – Blox-plot dos valores de Calcemia nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação -----	pág 51
Gráfico 4 – Blox-plot dos valores de Calciúria de coluna lombar e fêmur nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação -----	pág 52
Gráfico 5 – Blox-plot das idades nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação -----	pág 52
Tabela 5 – Resultados das DMOs de colo de fêmur e coluna lombar antes e após tratamento de 12 meses com 800UI de vitamina D isolada ----	pág 53
Tabela 6 – Teste de Normalidade de Shapiro Wilk para DMO e vitamina D -----	pág 54

Tabela 7 – Determinação da igualdade de variância dos valores de DMO entre os 2 grupos -----	pág 55
Tabela 8 - Determinação do valor de p para comparação das médias de DMO dos 2 grupos -----	pág 55
Tabela 9 – Determinação do valor de p para comparação das médias de Vitamina D dos 2 grupos -----	pág 56
Gráfico 6 – Correlação entre valores séricos de vitamina D e DMO em usuárias de tamoxifeno -----	pág 57
Gráfico 7 – Correlação entre valores séricos de vitamina D e DMO em usuárias de inibidores da aromatase -----	pág 57
Gráfico 8 – Valores das médias de vitamina D e DMO de usuárias de anastrozol e tamoxifeno de acordo com o tempo de utilização da droga -----	pág 58
Gráfico 9 – Queda dos valores de médias de DMO e Vitamina D nos intervalos de tempo de utilização do inibidor da aromatase -----	pág 59
Tabela 10 – Dados da Comparação de médias pré e pós-tratamento com vitamina D -----	pág 60

## SUMÁRIO

Aspectos Éticos da Pesquisa -----	página 14
Introdução -----	página 15
Justificativa -----	página 35
Objetivos -----	página 36
Hipóteses -----	página 37
Sujeitos e Métodos -----	página 38
Resultados -----	página 45
Discussão -----	página 61
Conclusões -----	página 65
Referências Bibliográficas -----	página 66
Anexos -----	página 73
Artigo Publicado -----	página 75

## **Aspectos Éticos da Pesquisa**

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama e indicação para o uso de inibidores de aromatase foram convidadas a participar da pesquisa. Igualmente pacientes com o mesmo diagnóstico mas que tiveram indicação para o uso de tamoxifeno foram selecionadas e convidadas para formar o grupo controle da pesquisa. Indivíduos de ambos os grupos realizaram densitometrias ósseas, dosagens séricas de vitamina D e cálcio (calcemia), além da dosagem urinária de cálcio (calciúria).

Cada paciente recebeu explicações e esclarecimentos sobre a pesquisa de seu médico oncologista e aquelas que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido elaborado especialmente para esse propósito (anexo 1).

Todas as pacientes que assinaram o consentimento livre e esclarecido foram entrevistadas pela pesquisadora responsável com o intuito de explicar mais detalhes do estudo, alocar cada sujeito nos grupos da pesquisa e organizar a realização das dosagens séricas de vitamina D e cálcio, além das densitometrias ósseas. Cada paciente foi também informada de que poderia a qualquer momento, caso assim quisesse, não participar mais da pesquisa, sem que, com isso, tivesse qualquer prejuízo em seu tratamento.

As pacientes dos grupos que iniciaram o uso de inibidores da aromatase ou tamoxifeno que por qualquer motivo tiveram que interromper o uso da medicação ou faleceram na vigência do estudo foram excluídas.

Não houve riscos previsíveis nesta pesquisa no que concerne ao paciente, pois foram realizados apenas exames complementares pouco invasivos (dosagens séricas e densitometrias ósseas). Os eventuais desconfortos dos exames foram minimizados aproveitando-se períodos de realização de exames previstos dentro de seu seguimento normal (as dosagens séricas de cálcio e vitamina D, por ex, foram realizadas juntamente com outros exames de rotina).

Os dados coletados foram analisados sigilosamente. Cada sujeito da pesquisa foi analisado separadamente de acordo com um número de identificação.

## **Introdução**

É consenso que mulheres com diagnóstico de câncer de mama cujos receptores são positivos para estrogênio e/ou progesterona devem ser submetidas a hormonioterapia de longo prazo com a finalidade de reduzir a recidiva da doença, micrometástases e aumentar a sobrevida (1, 2). Existem dois principais tratamentos utilizados na atualidade; são eles: o tamoxifeno e os inibidores da aromatase. Há também a possibilidade da utilização de ambas as drogas (uma seguida da outra) para tratamento superior a cinco anos, já que o uso isolado por período maior que este não evidenciou benefício extra em termos de tempo livre de doença (3). Considere-se também que o risco de recorrência é de 1,5 a 2% entre cinco e 15 anos após o diagnóstico inicial. Além disso, no caso do tamoxifeno, sua utilização por mais de 5 anos demonstrou aumento do risco de câncer de endométrio e eventos tromboembólicos (devido à sua ação parcial sobre alguns tipos de receptores de estrogênio), motivo pelo qual se faz necessária a troca para inibidores de aromatase (3).

Apesar da escolha do uso de tamoxifeno ou inibidores da aromatase ser individualizada conforme muitos critérios (que incluem a idade da paciente, sua condição sócio-econômica, o estadiamento do tumor, etc), mulheres na pós-menopausa costumam ser tratadas com inibidores da aromatase ou tamoxifeno, enquanto as que as jovens são tratadas exclusivamente com tamoxifeno (2).

A incidência de câncer de mama aumenta com a idade e cerca de 75% dos casos ocorrem em mulheres após o climatério. Nesses indivíduos cerca de 80% dos tumores são receptores hormonais positivos (3).

## **Inibidores da Aromatase**

O tratamento de neoplasias hormônio-dependentes baseia-se principalmente na interrupção de seu estímulo hormonal. No caso do câncer de mama com receptores hormonais positivos, se faz necessário verificar o atual estado hormonal da paciente e programar o tratamento de acordo com ele. Na pré-menopausa, a maioria dos estrógenos circulantes é sintetizada no ovário sob influência do eixo hipotálamo-hipófise-ovário e nesse caso está indicada a ablação ovariana, seja por meio da utilização de análogos do GnRH, seja por meio de ooforectomia (4, 5, 6). A partir da menopausa, a síntese de estrógenos depende da enzima aromatase presente em sítios extra-gonadais. O córtex supra-renal passa a ser a principal fonte de esteróides sexuais, produzidos na forma de andrógenos. Estes andrógenos são metabolizados, em tecidos periféricos, pela aromatase, também conhecida como estrógeno sintetase. Esta é, na verdade, um complexo enzimático da família do citocromo P-450, presente em tecidos como gordura, músculo esquelético, fígado e o próprio tumor mamário. A aromatase converte a androstenediona e a testosterona em estrona e estradiol, respectivamente (Fig. 3). Assim, torna-se claro que as glândulas supra-renais e a aromatase são peças fundamentais na manutenção de um ambiente estrogênico na mulher pós-menopausada (7). Por este motivo, a inibição da aromatase e conseqüentemente da síntese de estrógenos, constitui a principal estratégia terapêutica no tratamento do câncer de mama hormônio-dependente (3, 8).

Os inibidores da aromatase são uma classe de drogas utilizada para tratamento e controle do câncer estrogênio-dependente como o câncer de mama e o de ovário. Como o próprio nome indica, os inibidores da aromatase atuam por inibição ou inativação da enzima aromatase responsável pela conversão dos androgênios testosterona e androstenediona em estradiol e estrona respectivamente. Desta forma, ocorre importante redução nas concentrações de estrogênios circulantes de pacientes na pós-menopausa (9, 10).

A utilização de inibidores da aromatase está contra-indicada em pacientes na menacme, pois a diminuição dos níveis de estrogênios gera secundariamente um

aumento da secreção de FSH por feedback positivo, o que faz com que a ação da droga seja muito pequena.

De acordo com a cronologia de aparecimento, os inibidores da aromatase são classificados em primeira, segunda e terceira gerações e, de acordo com sua estrutura química em esteróides e não-esteróides. Os esteróides (ou tipo 1) são análogos da androstenediona que se ligam no sítio ativo da aromatase de modo irreversível. Essa ligação resulta em uma reação de hidroxilação que origina uma ligação covalente permanente e, portanto, inativa a enzima. Os do tipo não-esteróide (ou tipo 2) são imidazóis ou triazóis, que funcionam como inibidores por se ligarem preferencialmente e de um modo reversível à subunidade citocromo P450 da enzima, através da ligação do átomo de ferro do grupo heme com o anel azólico dos inibidores da aromatase. A eficácia destes inibidores depende, portanto, das concentrações e afinidade da enzima e do inibidor.

Atualmente se utilizam quase que exclusivamente os inibidores da aromatase de terceira geração, mais modernos e com efeitos colaterais menores. Desprovidos de efeitos sobre as concentrações basais de cortisol e aldosterona, seus principais representantes são o anastrozol, o letrozol e o exemestano.

O anastrozol (Arimidex®, Anastrolo® - tipo 2) está aprovado para tratamento do câncer de mama avançado pós-menopausa e, após o estudo ATAC (*Arimidex, Tamoxifene, Alone or in Combination*), como adjuvante na terapêutica do câncer de mama em fase inicial, em doentes pós-menopáusicas com receptores de estrogênio positivos (ER), que não toleram o tamoxifeno ou que estejam em risco de desenvolver tromboembolismo ou câncer do endométrio.

O letrozol (Femara® - tipo 2), com base num importante estudo multicêntrico, está aprovado como terapêutica de primeira linha para o câncer de mama avançado e hormônio-dependente, em mulheres na pós-menopausa. Também está aprovado no tratamento do câncer da mama avançado em mulheres na pós-menopausa, natural ou artificialmente induzida, em que houve um tratamento inicial com anti-estrógenos seguido de recidiva ou progressão da doença e na terapêutica adjuvante tardia do câncer da mama hormônio-dependente em fase inicial em

mulheres pós-menopausadas previamente sujeitas a terapêutica adjuvante padrão com tamoxifeno durante 5 anos.

O exemestano (Aromasin® - tipo 1) está aprovado no câncer da mama avançado em mulheres na pós-menopausa, quando outras terapêuticas hormonais (ex: tamoxifeno) não obtiveram resultado.

Tanto para inibidores da aromatase do tipo I quanto do tipo II, a inibição da aromatase é dose-dependente. Os inibidores da aromatase de terceira geração (exemestane, anastrozol e letrozol) têm potência muitas vezes maior do que o inibidor da aromatase de primeira geração, aminoglutetimida. A supressão da aromatização corporal total chega a ser reduzida em mais de 90%, levando a diminuições significativas nos níveis de estrógenos circulantes.

Em relação ao tamoxifeno, os inibidores da aromatase têm apresentado maior eficácia no controle da progressão tumoral, além de menor frequência de efeitos colaterais. Enquanto o tamoxifeno possui o risco potencial do desenvolvimento de câncer de endométrio (11), além de trombose, os inibidores da aromatase cursam principalmente com a redução da massa mineral óssea (12, 13).

Como conclusão, pode-se dizer que os inibidores da aromatase constituem uma importante ferramenta no tratamento do câncer da mama, com receptores hormonais positivos na mulher menopausada tanto na doença avançada quanto na fase inicial da doença. Essa classe de medicamentos é considerada hoje a melhor terapia hormonal para tratamento do câncer de mama (1,3,4, 5, 14, 15).

**Classificação dos inibidores da aromatase**

Geração	Tipo 1	Tipo 2
Primeira		Aminoglutetimida
Segunda	Formestane	Fadrozole* Rogletimide*
Terceira	Exemestano	Anastrozol Letrozol Vorzol*

*\*Não disponíveis comercialmente no Brasil*

Figura 1 – Diferentes tipos de inibidores da aromatase e suas respectivas classificações.

Droga	Dose Diária Equivalente
Anastrozol	1 mg
Letrozol	2,5 mg
Exemestano	25 mg

Tabela 1 – Doses equivalentes dos principais inibidores da aromatase utilizados clinicamente (Saad *et al*, 2002).

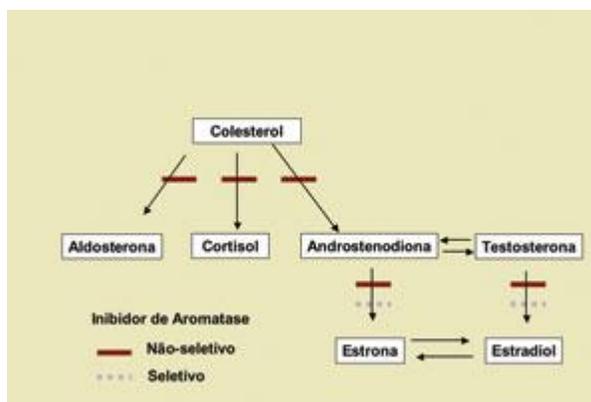


Figura 2 – Sítios de ação dos inibidores da aromatase seletivos e não seletivos.

## Tamoxifeno

As drogas utilizadas para tratamento do câncer de mama hormônio-dependente atuam essencialmente em três locais: o eixo hipotálamo-hipófise-ovário (no caso dos análogos de GnRH), a aromatase (no caso dos inibidores da aromatase) e o próprio receptor de estrogênio, como é o caso do tamoxifeno (5).

O tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM). Além dele existem outros SERMs no mercado brasileiro e mundial tais como o raloxifeno e o toremifene que também são utilizados para tratamento e controle do câncer de mama e a tibolona que é utilizada com o intuito de estimular o receptor estrogênico em terapias de reposição hormonal, efeito oposto ao desejado para o tratamento do câncer (16, 17, 18). O tamoxifeno é o SERM mais antigo e, por isso, o mais prescrito. Além de ser uma droga de fácil administração – via oral em dose única diária -, não tem custo elevado e se mostrou eficaz no controle do câncer estrogênio dependente (1, 3, 5, 6, 14, 19, 20). Atualmente a agência reguladora americana FDA (*Food and Drug Administration*) aprova sua utilização para homens e mulheres com diagnóstico de câncer de mama receptor de estrogênio positivo em estágios iniciais após cirurgia ou quimioterapia e radioterapia para prevenir recidivas; para homens e mulheres com diagnóstico de doença metastática ou avançada receptor de estrogênio positivo; e para mulheres com alto risco de desenvolvimento de câncer de mama.

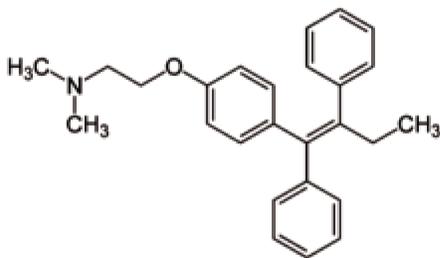


Figura 3 – Estrutura química do tamoxifeno.

Desde sua aprovação pelo FDA em 1988, o tamoxifeno tem sido utilizado para tratar milhares de pacientes com câncer de mama estrogênio positivo. Tanto mulheres na pós-menopausa quanto na pré-menopausa podem fazer uso do tamoxifeno, diferentemente dos inibidores da aromatase que estão indicados apenas para pacientes na pós-menopausa.

O tamoxifeno tem como características a possibilidade de reduzir em 40% o risco de recidiva tanto em pacientes pós-menopausadas quanto em jovens, o tamanho do tumor antes da cirurgia (hormonioterapia neo-adjuvante) caso este seja receptor de estrogênio positivo e o aparecimento de metástases à distância. Além disso, por ser um modulador seletivo do receptor de estrogênio, o tamoxifeno bloqueia a ação do estrogênio em alguns sítios, enquanto ativa em outros. Simultaneamente ao bloqueio da ação do estrogênio no tecido mamário e tumoral, há o estímulo do receptores nos ossos e o fígado. Desta forma, o tamoxifeno diminui a produção de colesterol pelo fígado, além de melhorar a massa mineral óssea (21, 22).

O uso do tamoxifeno como tratamento para o câncer da mama está relacionado a uma série de efeitos colaterais potencialmente sérios que incluem: trombose, acidente vascular encefálico e câncer de endométrio. Outros efeitos colaterais menores são: fogachos, náusea, fadiga, alteração do humor, cefaléia, ressecamento da pele e constipação.

## **Estrogênio e Metabolismo Ósseo**

A osteoporose pós-menopausa é uma doença caracterizada pela perda progressiva da massa óssea, com alterações na microarquitetura e na qualidade do tecido ósseo, que resultam em uma diminuição da força de resistência aos traumas de baixa energia, favorecendo a ocorrência de fraturas. Embora nos casos mais agressivos possam ocorrer mais precocemente, as fraturas ocorrem em períodos que variam entre 10 e 20 após o início da menopausa, caso não sejam tomadas medidas preventivas (16, 23, 24, 25, 26, 27).

Apesar da perda óssea fisiológica com o avançar da idade ser fator importante, e geneticamente determinada, embora sofra a intervenção dos diferentes fatores de risco, deve-se considerar o hipoestrogenismo não compensado fator crítico para a determinação do aumento da reabsorção óssea e da acelerada perda da massa óssea que pontifica como evento primordial na patogênese da doença (23, 28, 29).

Mais de 50% da perda óssea ligada à idade ocorre nos 8-10 anos seguintes à instalação da menopausa, o que demonstra claramente a relação entre carência de estrogênios e osteoporose. O mecanismo anti-reabsortivo pelo qual o estrogênio protege a massa óssea ainda não está totalmente elucidado, porém acredita-se que seja mediado por células do estroma medular e osteoblastos (6, 17).

### **O OSTEOLASTO**

Osteoclasto é uma célula volumosa multinucleada que se mantém em contato com a matriz óssea por meio de pregas da membrana celular, compondo a "borda em escova". É neste ambiente, acidificado pela bomba de prótons do osteoclasto, que os complexos enzimáticos agem, promovendo a reabsorção óssea. Em cada extremidade dessa borda existem zonas de citoplasma desprovidas de organelas e pouco coradas, conhecidas como "zonas claras". O osteoclasto produz enzimas lisossomais como a fosfatase ácida tartarato-resistente e as catepsinas, além de enzimas não lisossomais como a colagenase e a anidrase carbônica tipo II. Essas enzimas, por meio da redução do pH, promovem a reabsorção da matriz calcificada (30).

Já está bem estabelecido que o osteoclasto é originado de células hematopoiéticas da linhagem monócito-macrófago, porém existem divergências quanto ao estágio onde a via de diferenciação de monócitos/macrófagos se separa daquela dos osteoclastos.

Várias citocinas e fatores estimulantes de colônias tem sido implicados no desenvolvimento do osteoclasto e na remodelação óssea. Esta lista inclui as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-11), o fator de necrose tumoral (TNF), entre outros. Por outro lado, existem igualmente substâncias que inibem o desenvolvimento dos osteoclastos e conseqüentemente da remodelação óssea como é o caso do TGF- $\beta$ 3 (*transforming growth factor 3*), o interferon gama e as interleucinas 4 e 18. Assim, está claro que as citocinas representam o ponto final de várias cascatas de eventos envolvendo o status mineral ósseo.

No que tange a ação do estrogênio, existem evidências da expressão dos receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  em células do estroma da medula óssea e em osteoblastos, algo que não ocorre nos osteoclastos (24, 31, 32, 33). Desta forma é possível que essas células – osteoblastos e células estromais da medula – sejam as mediadoras da ação anti-reabsortiva do estrógeno no osso (Fig 5). As células do estroma medular podem também modular o efeito do estrogênio através da liberação ou inibição de fatores, entre eles as citocinas (31).

Essa dinâmica celular ativada por uma complexa rede de citocinas define como mecanismo estropatogênico linear a ativação do eixo RANK/RANKL/Osteoprotegerina. O RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa B - e seu ligante (RANKL) foram recentemente identificados, com importante papel no desenvolvimento dos osteoclastos (34). Membros da superfamília TNF, o RANK é expressado na superfície dos osteoclastos, enquanto o RANKL é expressado na superfície dos osteoblastos e células do estroma e faz ligação com seu receptor (RANK) presente nas células osteoclásticas, impulsionando sinais de diferenciação e ativação em precursores osteoclásticos, promovendo assim a reabsorção óssea. Além disso, o RANK possui função na regulação da resposta imune mediada por células T e na apoptose (34).

Osteoprotegrina (OPG) é um fator que ocorre naturalmente e que antagoniza os efeitos de RANKL, assim preservando a integridade óssea. Portanto, a proporção entre RANKL e OPG (RANKL/OPG) é determinante para regular a atividade osteoclástica e reabsorção óssea. Além disso, tem sido sugerido que a rede interativa de citocinas e hormônios de reabsorção óssea e anti-reabsorção convergem no sistema RANKL/OPG (34).

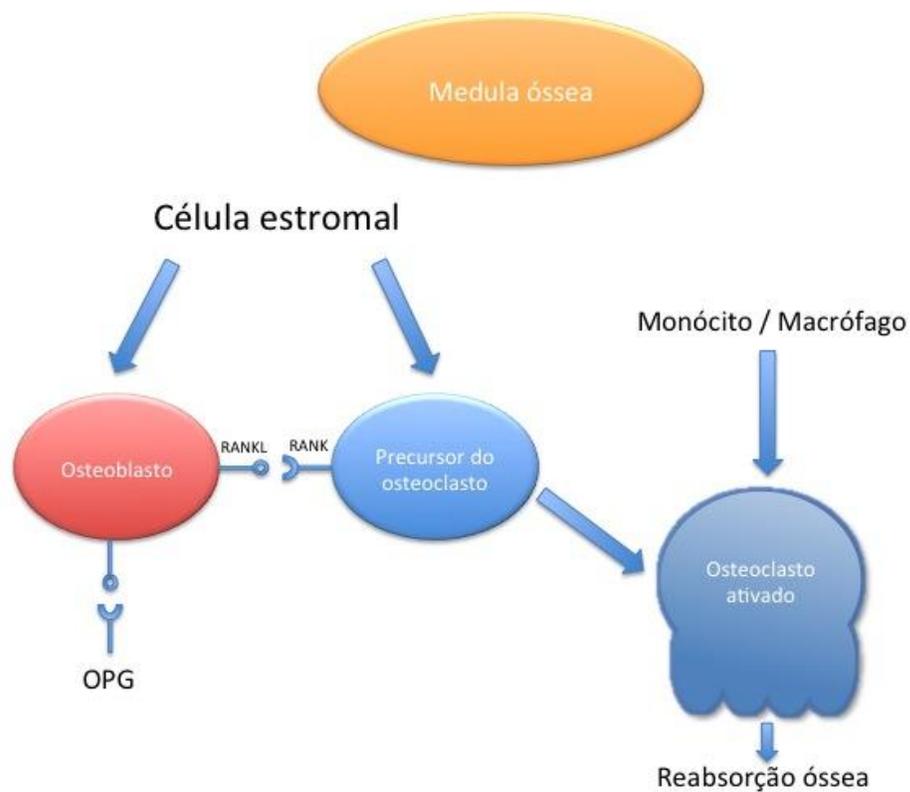


Figura 4 – Eixo RANK/RANKL/Osteoprotegerina e Inter-relações entre estrogênio, interleucina 6 (IL-6), osteoblastos e osteoclastos.

## **Osteoporose e Densitometria Óssea**

A osteoporose é atualmente considerada, nos países desenvolvidos, um dos problemas de saúde mais comuns e mais sérios da população idosa, especialmente a do sexo feminino (29, 35, 36, 37). É caracterizada pela baixa densidade óssea e pela degeneração da microarquitetura óssea, que aumentam a fragilidade óssea e o risco de fratura (38). É reconhecida clinicamente pela ocorrência de fraturas não traumáticas, por fragilidade, especialmente da coluna lombar e do fêmur (39). A perda mais acentuada de massa óssea que ocorre nas mulheres a partir da perimenopausa é associada não só, mas essencialmente relacionada à insuficiência de estrogênio (29).

A incidência da osteoporose vem aumentando no mundo devido, em parte, ao envelhecimento da população e ao sedentarismo (40, 41). A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu, valendo-se de dados sobre a relação entre densidade mineral óssea e risco de fratura, a definição para osteoporose que é hoje a mais utilizada: densidade mineral óssea igual ou abaixo de -2,5 desvios-padrão da densidade média local para o adulto jovem (T score) (38). Abaixo dessa densidade óssea, o risco de fratura não traumática aumenta de forma não linear. Osteopenia foi então também definida como densidade mineral óssea entre -1 e -2,5 desvios-padrão abaixo da média para o adulto jovem (cada desvio-padrão corresponde aproximadamente a 10% de variação). Essa definição de osteoporose foi baseada em dados obtidos em populações de raça branca/caucasiana, com mais de 65 anos de idade (38). Assim, a osteopenia é a perda ou redução da massa mineral óssea e osteoporose é a doença do esqueleto caracterizada por redução absoluta da massa óssea e desorganização da microestrutura óssea com presença de microfraturas (37).

Estudos têm demonstrado que variações no local da realização do exame (sítio ósseo) e de densitômetros resultam em grandes diferenças de valores de massa mineral óssea, algo que pode gerar distorções na capacidade de se considerar determinado indivíduo como sendo portador de osteoporose ou osteopenia (42).

Vários fatores, além da idade, aumentam o risco de a mulher apresentar osteoporose (e fratura osteoporótica): raça caucasiana ou asiática, baixo peso, baixo

índice corporal, menopausa precoce, menarca tardia (baixo pico de massa óssea), sedentarismo, história prévia de fratura após cinquenta anos, história familiar, ingesta deficiente de vitamina D e cálcio, baixa exposição ao sol, além de várias patologias, como o hiperparatireoidismo, e uso de medicamentos, tais como corticóides (41, 43, 44, 45, 46).

Estima-se que o risco de fratura osteoporótica no decorrer da vida após a menopausa, para uma mulher branca americana, seja de cerca de 40%. Para fraturas de colo de fêmur, especificamente, o risco é de 14-17% (36, 39, 47). Em geral, a cada redução de um desvio-padrão da densidade mineral óssea em relação à média (valores de T no gráfico da DEXA), o risco de fratura aumenta em 2 a 3 vezes (37).

Dentre as fraturas decorrentes da osteoporose na pós-menopausa, a mais grave é a fratura de fêmur (40, 41) que resulta, nos Estados Unidos, em até 20% de mortalidade no primeiro semestre após o evento, acarretando ainda uma perda de autonomia importante: metade dos pacientes que deambulavam antes da fratura ficam incapazes de fazê-lo e um quarto dos pacientes requerem cuidado domiciliar de longo prazo depois do evento (39).

Os custos sociais da doença são altos, em grande parte devido aos custos das fraturas de fêmur. Os gastos médicos diretos com fraturas osteoporóticas foram estimados em 13,8 bilhões de dólares nos Estados Unidos, em 1995, relativos a 432 mil internações hospitalares, consultas médicas e admissões em *nursing homes*, sem levar em conta os gastos com o cuidado domiciliar de longo prazo (39, 40, 47).

Até o momento a densitometria óssea tem se mostrado o melhor método de diagnóstico de imagem para a osteoporose (38). A radiografia tradicional possui baixa sensibilidade e diagnostica a perda de massa óssea quando essa já é acentuada. Também a tomografia computadorizada aplicada à medida da absorção de raios X pelos ossos é capaz de aferir a densidade mineral óssea, sendo mais comumente usada para avaliar a densidade da coluna. Embora seja bastante difundida no mundo, é uma técnica menos acurada, mais demorada, mais cara e menos segura que a DEXA (47).

A densitometria óssea (ou mais corretamente a absorciometria de energia dupla de raios X, DEXA) constitui tecnologia simples, não-invasiva e indolor que

permite a avaliação cronológica do curso da doença. O método depende essencialmente da absorção de radiação pelo esqueleto, provendo medidas quantitativas da massa óssea (em g/cm<sup>2</sup> ou g/cm<sup>3</sup>). Tem acurácia diagnóstica alta (CV: 3-10%) (48) e dose de radiação baixa, quando comparada a outros métodos (78). No entanto, o uso de programas com padrões derivados de populações caucasianas em populações não caucasianas tem baixa validade diagnóstica, visto que isso pode modificar significativamente o percentual de mulheres consideradas osteopênicas/osteoporóticas (42, 49).

Uma metanálise de estudos prospectivos de coorte, analisando a capacidade da DEXA prever fraturas de fêmur, chegou aos seguintes valores: sensibilidade de 38%, especificidade de 88% e valor preditivo positivo de 36%, tomando como ponto de corte um desvio-padrão abaixo da média de densidade óssea ajustada por idade (RR/SD) e considerando normal a curva de distribuição da densidade óssea. Para o ponto de corte de 2 desvios-padrão, a sensibilidade baixou para 9%, a especificidade aumentou para 99% e o valor preditivo positivo ficou em 56%. Portanto, a densitometria óssea pode prever risco de fratura mas tem baixa acurácia para identificar os indivíduos que terão (e não terão) fratura.

Para se avaliar adequadamente o status mineral ósseo, vários autores têm postulado vários tipos diferentes de exames além da DEXA (35, 37). De acordo com a *National Osteoporosis Foundation*, densitometrias ósseas devem ser realizadas a cada 2 anos em mulheres saudáveis com mais de 65 anos para seguimento e a cada 1 ano para mulheres em tratamento com bisfosfonatos e outras drogas estimuladoras da massa mineral óssea (50, 51). A densitometria óssea baseada na medição da densidade mineral óssea de vértebras da coluna lombar e do fêmur tem grande poder para avaliar a massa óssea no longo prazo, mas não é capaz de reproduzir em tempo real a dinâmica óssea. Apesar de sua limitação, no entanto, a densitometria óssea ainda permanece como padrão-ouro na avaliação da massa mineral óssea, sendo desta forma de grande utilidade clínica para seguimento da massa óssea, principalmente em mulheres na pós-menopausa (4, 38, 51).

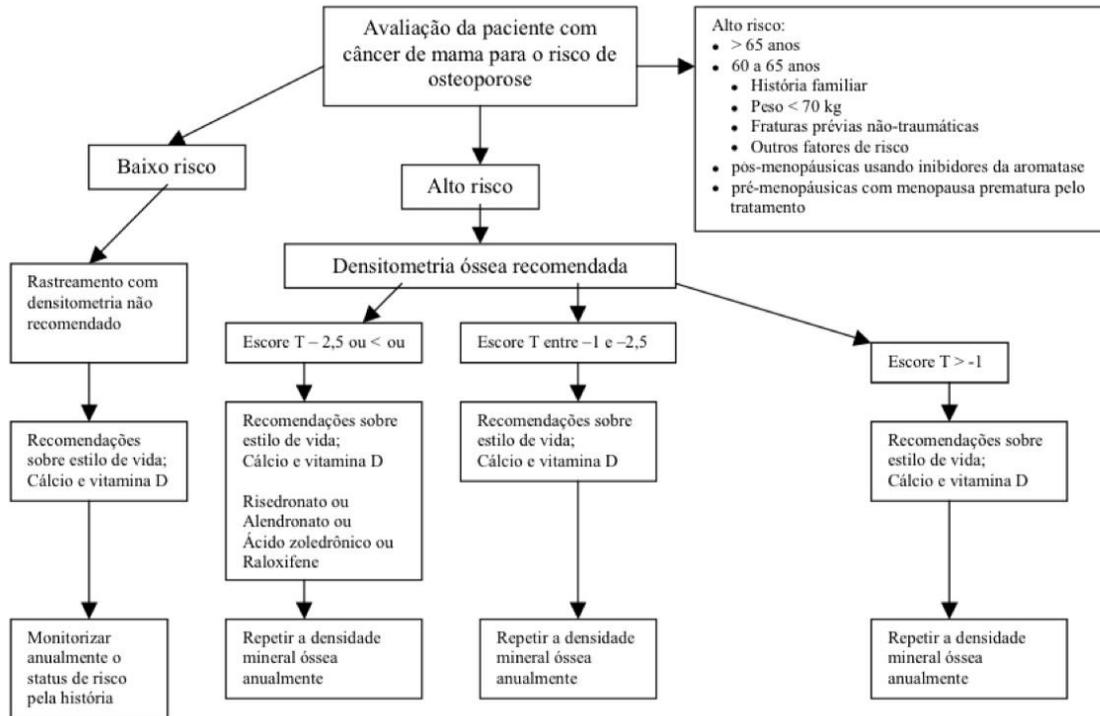


Figura 5 – Recomendações para a realização de densitometrias ósseas.

## Marcadores Séricos do turnover ósseo

Devido à limitação técnica das densitometrias ósseas, vários outros exames, notadamente marcadores séricos como a calcemia, a dosagem do hormônio paratiroidiano (PTH), a calcitonina, a fosfatase alcalina, etc, têm sido solicitados com o intuito de se predizer de forma mais imediata se determinada patologia ou medicação possui influência sobre a massa mineral óssea (5, 52, 53, 54). Uma vez que com a utilização da densitometria óssea isoladamente tem-se muitas vezes uma avaliação tardia do status ósseo, ou seja, pacientes já evoluíram com fraturas ou osteoporose grave, para casos selecionados, tem-se proposto a utilização de marcadores séricos ou urinários em associação à DEXA.

O uso de métodos laboratoriais que permitam a avaliação do metabolismo ósseo de maneira confiável, rápida e prática tem sido um objetivo há muito almejado. O tecido ósseo apresenta uma série de características muito peculiares, dentre elas a grande extensão e distribuição, e a presença de cristais radiopacos que permitem o exame do esqueleto de maneira muito simples por meio da DEXA. Entretanto, os fenômenos metabólicos, fisiológicos ou patológicos que atingem o tecido ósseo só afetam significativamente sua estrutura radiopaca após um lapso de tempo considerável. Isto torna o emprego destas técnicas limitado do ponto de vista temporal.

O tecido esquelético é constituído de uma matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%) e células que correspondem a uma pequena parte da massa óssea, mas que são responsáveis pela regulação e manutenção do cálcio circulante e pela contínua reabsorção e formação da matriz óssea (54).

O componente orgânico da matriz óssea é quase que exclusivamente colágeno. Essa proteína, rica em glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina, é sintetizada e secretada pelo osteoblasto e organiza-se de forma a compor fibrilas com buracos (*hole zones*) onde ocorre o início da mineralização óssea. O componente inorgânico da matriz óssea é composto fundamentalmente por cálcio e fosfato que são depositados como sais amorfos e rearranjados em uma estrutura cristalina

semelhante à hidroxiapatita. Já o componente celular do tecido ósseo é constituído de 3 tipos distintos de células: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (54, 55).

Muitas substâncias podem regular direta ou indiretamente a formação óssea por meio da estimulação da proliferação de precursores osteoblásticos, como é o caso dos fatores de crescimento, e da modulação da formação da matriz óssea como é o caso do hormônio para-tiroidiano (PTH) e da vitamina D. Na prática clínica é comum a dosagem de marcadores bioquímicos que possam ajudar no monitoramento do tratamento e que possam eventualmente excluir causas secundárias de osteoporose. Existe claramente uma grande lista de fatores relacionados ao metabolismo ósseo que poderiam ser estudados, no entanto os mais comumente utilizados são:

- Relacionados à formação óssea:
  - Fosfatase alcalina óssea (e/ou total)
  - Osteocalcina
  - Pro-peptídeos do colágeno tipo I
  
- Relacionados à reabsorção:
  - Hidroxiprolina urinária
  - Interligados do Colágeno urinários (são eles: piridinolinas totais, piridinolina livre, desoxipiridinolina livre, telopeptídeos C e N e fosfatase alcalina tartrato-resistente)

A falta de especificidade destes marcadores tradicionais levou seu uso a ser restrito ao estudo de patologias ósseas onde as alterações são muito marcadas, como, por exemplo, a doença de Paget. No seguimento da perda de massa óssea cronológica, utiliza-se essencialmente a DEXA e eventualmente dosagem complementar de cálcio sérico e urinário, além da vitamina D, paratormônio (PTH) e eventualmente de calcitonina, já que esta última não funciona como um regulador importante do conteúdo plasmático de minerais (55). Essas dosagens visam diagnosticar situações em que a mineralização óssea está prejudicada por baixas

quantidades de cálcio sérico e vitamina D (por baixa ingesta, absorção intestinal deficiente ou ainda pouca exposição aos raios ultravioleta), além de diagnosticar pacientes com perda urinária de cálcio. Como a função do PTH é controlar a concentração plasmática de cálcio, evitando a hipocalcemia, há que se dosar o PTH em situações de calcemia alterada. A calcemia, em última análise, é função da taxa de transferência do cálcio entre osso e sangue, da taxa de filtração glomerular nos rins e da absorção do cálcio pelo intestino, ações essas reguladas essencialmente pelo PTH, calcitonina e vitamina D.

## Vitamina D

As vitaminas D (calciferóis) formam uma família de seco-esteróides lipossolúveis e biologicamente ativos. Os seco-esteróides são semelhantes aos esteróides e possuem metabolismo e mecanismo de ação análogos (30, 55, 56).

Os precursores da vitamina D são produzidos em vegetais (ergosterol) e animais (7-desidrocolesterol). Radiações ultravioletas penetram a pele humana levando à transformação de 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D3 e posteriormente vitamina D3 (coleciferol). Da mesma forma, nos tecidos vegetais, a exposição do ergosterol à luz gera vitamina D2 (ergocalciferol). Na realidade ambas vitaminas D (animal e vegetal) possuem mesma potência biológica e são metabolizadas igualmente (30, 55).

O ser humano pode garantir concentrações adequadas de vitamina D expondo-se ao sol, mas também por meio da ingestão de alimentos ricos em vitamina D. O calciferol da dieta é absorvido pelo intestino delgado e posteriormente captado pelo fígado, onde é hidroxilado, tornando-se ativo. Na realidade o fígado é o principal sítio de 25-hidroxilação da vitamina D, porém não o único. Em menor escala, a 25-hidroxilação pode ocorrer também nos rins e no próprio intestino (55, 57, 58).

Em um segundo momento, a 25-OH-vitamina D sofre nova reação, desta vez pela enzima 25-OH-vitamina D 1 alfa-hidroxilase, tornando-se 1,25 di-OH-vitamina D. É nessa forma que a vitamina D se torna plenamente ativa, uma vez que as células-alvo da vitamina D possuem receptores nucleares com alta afinidade pela 1,25-di-OH-vitamina D. A interação da 1,25-di-OH-vitamina D com seu receptor nuclear (chamado VDR) modula a transcrição de genes-alvo. No intestino, por exemplo, ocorre um aumento expressivo da absorção de cálcio em resposta à ação da vitamina D, reação essa independente da ação do PTH. No tecido ósseo, a vitamina D parece mobilizar o componente mineral da matriz óssea (27, 58, 59, 60).

Dentre os marcadores séricos que podem acrescentar mais informações sobre o turnover ósseo, a vitamina D tem especial interesse quando se trata de câncer, já

que vários trabalhos apontam uma relação entre deficiência de vitamina D e tumores, tais como o de próstata e o de mama (61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69).

Como as funções da vitamina D só ocorrem após hidroxilação pela enzima 1-alfa-hidroxilase (Figura 8), acredita-se que a 1,25-di-OH-vitamina D seja o marcador a ser controlado clinicamente. Estudos apontam que, além das células renais, existem outras células que produzem a enzima 1-alfa-hidroxilase, tais como macrófagos, queratinócitos e células mamárias (70, 71). Não obstante, a 1,25-di-OH-vitamina D que não é produzida no rim, não é detectada no sangue, pois provavelmente tem ação local (ação parácrina/autócrina). Os efeitos tecido-específicos, em última análise, não afetariam a homeostase do cálcio (30, 72).

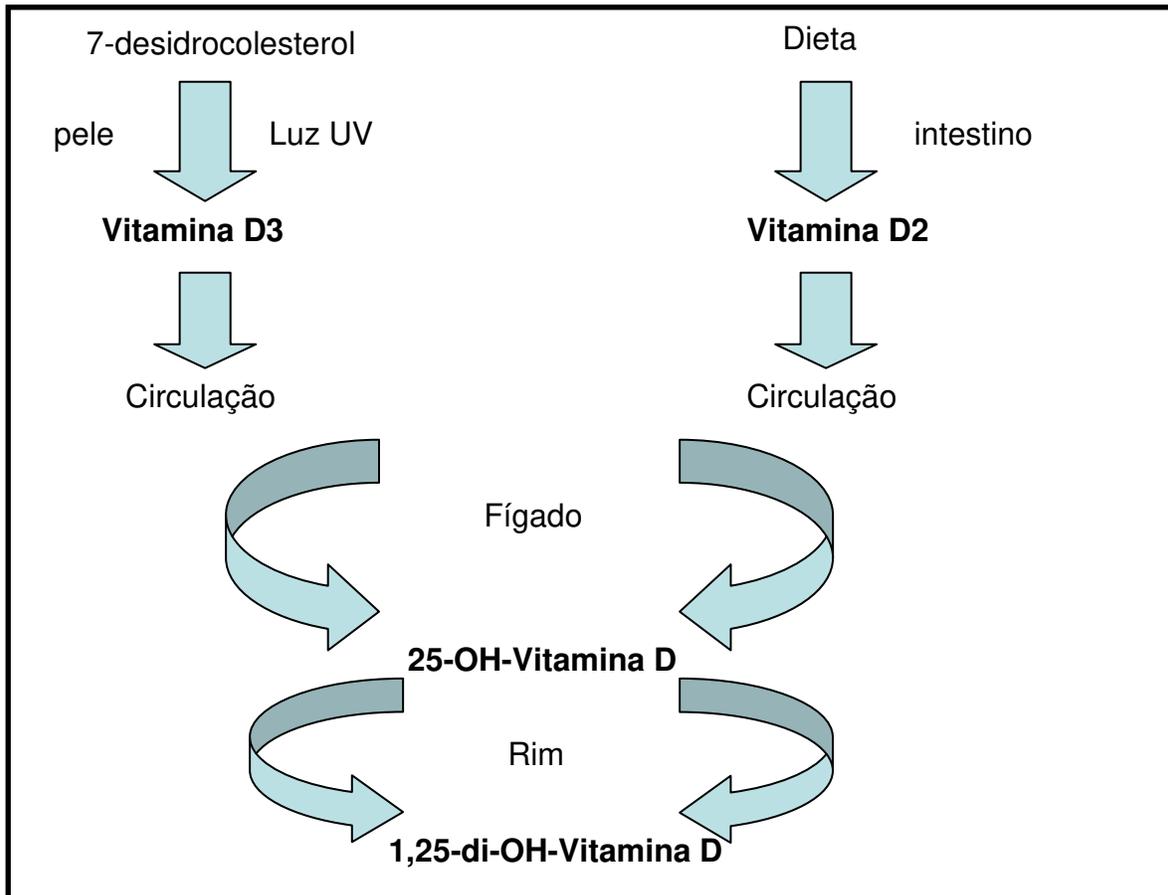


Figura 6 – Biossíntese da vitamina D.

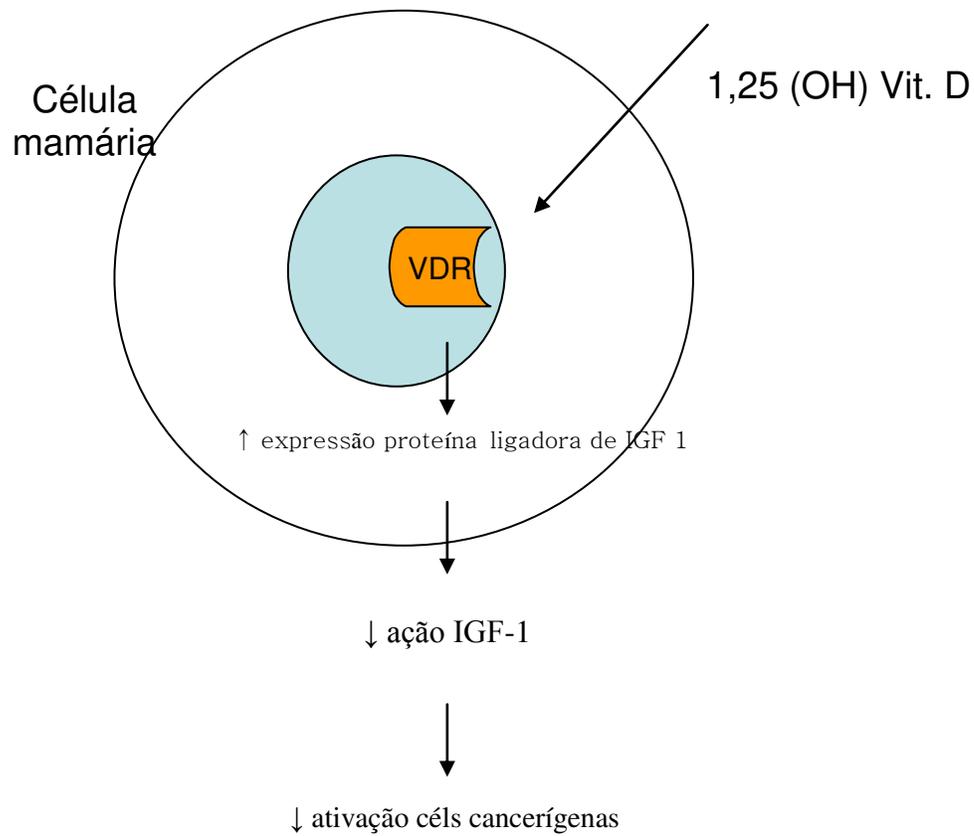


Figura 7 – Ação da 1,25 di-OH Vitamina D nas células mamárias.

## **Justificativa**

Estabelecer fatores preditivos de perda de massa óssea é fundamental para auxiliar o tratamento e seguimento de pacientes com câncer de mama. Primeiramente porque a doença tem incidência maior em mulheres após os 40 anos, o que por si só já aumenta o risco de osteoporose nesse grupo, uma vez que o remodelamento ósseo também aumenta conforme aumenta a idade. Em segundo lugar, como a ação hormonal não é desejada em pacientes com diagnóstico de câncer de mama, muitas vezes elas são submetidas a procedimentos cirúrgicos ou uso de análogos hormonais (análogos de GnRH) com a finalidade de se estabelecer uma espécie de menopausa artificial. Em terceiro lugar, como a maioria das drogas utilizadas para reduzir o risco de recidivas interfere no metabolismo ósseo, há que se considerar a osteoporose como uma realidade para esse grupo de pessoas.

Assim sendo, torna-se imprescindível a redução das co-morbidades associadas ao câncer e seu tratamento, já que ambos são extremamente debilitantes para a paciente. Não seria razoável, portanto, tratar apenas o tumor e ao mesmo tempo impor uma acentuação tão grande da perda óssea a ponto de restringir igualmente a vida da paciente.

Pode-se reduzir consideravelmente a morbidade por osteoporose e fraturas dela decorrentes ao se estabelecer fatores que possam auxiliar na determinação de quais pacientes têm indicação para usar uma classe ou outra de drogas a partir de seu status ósseo. Assim, se pudermos associar um novo método de avaliação da massa óssea que auxilie o médico a identificar tão logo pacientes em risco de desenvolver osteoporose, poderemos reduzir fraturas, melhorar a qualidade de vida das pacientes, além de reduzir os custos já tão elevados do tratamento e seguimento de pacientes com câncer de mama tanto para o sistema público de saúde quanto para o privado.

## **Objetivos**

- 1) Correlacionar os achados da massa mineral óssea determinados pela densitometria óssea com as dosagens seriadas de vitamina D e cálcio para estabelecer se podem ser consideradas bons marcadores da dinâmica óssea – e da gravidade da perda de massa mineral óssea em pacientes usuárias de inibidores da aromatase e de tamoxifeno.
- 2) Avaliar se existem diferenças estatísticas entre a massa mineral óssea de pacientes usuárias de inibidores da aromatase e usuárias de tamoxifeno.
- 3) Avaliar se existem diferenças estatísticas entre a valores de vitamina D séricas de pacientes usuárias de inibidores da aromatase e usuárias de tamoxifeno.

## Hipóteses

A pesquisa em questão é um estudo observacional, cujo objetivo é aceitar ou rejeitar a hipótese de que dosagens séricas de vitamina D são bons fatores preditivos do status mineral ósseo de pacientes usuárias de inibidores da aromatase. Caso a hipótese seja aceita tais dosagens poderiam ser utilizadas no acompanhamento e seleção de pacientes para uso de um ou outro tipo de droga adjuvante no tratamento do câncer de mama. De forma prática, estabelecemos 4 hipóteses a serem testadas:

Hipótese 1: Usuárias de inibidores de aromatase possuem menor massa mineral óssea quando comparadas ao grupo controle (usuárias de tamoxifeno).

Hipótese 2: Usuárias de inibidores de aromatase possuem menor valor de vitamina D quando comparadas ao grupo controle (usuárias de tamoxifeno).

Hipótese 3: Existe correlação entre valores de vitamina D e DMO, ou seja, a queda dos valores de vitamina D acompanha a queda da massa mineral óssea.

Hipótese 4 - Utilizar suplementos de vitamina D aumenta a massa mineral óssea de pacientes usuárias de inibidores de aromatase.

## **Sujeitos e Métodos**

Foram selecionadas para a pesquisa pacientes com diagnóstico de câncer de mama em acompanhamento pós-fase aguda no período de fevereiro a julho de 2008 no Instituto Ribeirãopretano de Combate ao Câncer (IRPCc). Todas as pacientes possuíam diagnóstico de câncer de mama com receptor de estrogênio positivo e já haviam sido submetidas a tratamento cirúrgico prévio, tendo sido indicada hormonioterapia de longo prazo. As pacientes foram divididas em 2 grupos: um grupo de usuárias de inibidores de aromatase e um grupo de usuárias de tamoxifeno que atuou como controle para o primeiro.

Os grupos foram inicialmente pareados por idade, uma vez que a idade é variável que muito influi na densidade mineral óssea, e posteriormente estratificados por tempo de utilização da medicação: de 0 a 12 meses (< de 1 ano), de 13 a 24 meses (de 1 a 2 anos), de 25 a 36 meses (de 2 a 3 anos), de 37 a 48 meses (de 3 a 4 anos) e de 49 a 60 meses (de 4 a 5 anos). Foram excluídas do estudo pacientes que faziam uso de outros medicamentos concomitantemente à hormonioterapia, notadamente os bisfosfonatos, além de pacientes com metástases ósseas ou outras doenças ósseas como osteoartrose que podem interferir no resultado da densitometria óssea.

Todas as pacientes foram submetidas a dosagens séricas de cálcio e vitamina D, dosagens de cálcio urinário e densitometrias ósseas. Todos os resultados foram anotados de forma numérica (valor da densidade mineral óssea em g/cm<sup>3</sup>) e não apenas classificados como normais ou não. Isso possibilitou o cálculo de médias e uma comparação mais fina dos grupos.

Inicialmente foram selecionadas 212 pacientes com o perfil de candidatas à pesquisa. Após orientação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, 198 pacientes foram submetidas aos exames – 7 não aceitaram participar, 2 faleceram antes do início dos exames e 5 não puderam participar por questões sócio-econômicas tais como a distância entre sua residência e o local de realização dos exames. Das 198 pacientes que foram incluídas no estudo, 147 completaram os exames, sendo 80 usuárias de inibidores de aromatase e 67 usuárias

de tamoxifeno. As demais ou não se apresentaram para a coleta, ou coletaram amostras de urina inadequadamente.

O grupo de usuárias de tamoxifeno atuou como grupo controle para as usuárias de inibidores de aromatase, uma vez que está bem estabelecido que não há prejuízo da massa mineral óssea de pacientes que utilizam tamoxifeno. Os grupos foram pareados por idade.

As doses das medicações usadas pelas pacientes obedeceram aos seguintes critérios: tamoxifeno 10 mg/dia e anastrozol 1mg/dia. Não foram incluídas no estudo pacientes que usavam outras doses ou outros tipos de inibidores de aromatase. A escolha pelo anastrozol se deu pelo fato de que a grande maioria das pacientes entrevistadas recebia essa medicação pelo sistema único de saúde (SUS).

A avaliação laboratorial constou de dosagem sérica de cálcio e vitamina D (1,25 OH vitamina D), além de calciúria de 24 horas, enquanto que a avaliação radiológica constou da realização de densitometria óssea (DEXA). Todos os exames foram realizados no mesmo laboratório e na mesma clínica radiológica com o mesmo densitômetro (Lunar Prodigy Primo™, 2008 - GE Health Care, USA) e analisados por um único médico.

Os valores obtidos nos resultados laboratoriais e de DEXA foram anotados e tabulados de acordo com o tempo de utilização da droga (Tabelas 1 e 2). Os valores considerados para a análise das densitometrias ósseas foram as densidades minerais ósseas (DMO) de colo de fêmur direito e coluna lombar. Cada subgrupo – classificado de acordo com o tempo de uso da medicação em questão – obteve uma média dos valores anotados para cada uma das variáveis: DMO de colo de fêmur, DMO da coluna lombar, vitamina D, calcemia e calciúria. Os grupos eram homogêneos no que se refere à idade..

Cada grupo foi subdividido de acordo com o tempo da medicação tomada. Ao final, obtivemos 21 pacientes usuárias de inibidor de aromatase com menos de 1 ano, 18 entre 1 e 2 anos, 14 entre 2 e 3 anos, 15 entre 3 e 4 anos e 12 entre 4 e 5 anos. Das usuárias de tamoxifeno, 13 usavam há menos de 1 ano, 16 entre 1 e 2 anos, 14 entre 2 e 3 anos, 10 entre 3 e 4 anos e 14 entre 4 e 5 anos.

Em um segundo momento, selecionamos todas as pacientes cujos resultados de densitometrias ósseas apresentavam valores de massa mineral óssea baixa (valores de DEXA inferiores a -1 DP) associados a valores igualmente baixos de vitamina D (inferiores a 30 pg/ml) e propusemos a suplementação com solução oral de vitamina D isolada (sem cálcio) na dose de 800 UI/dia por 1 ano (nome comercial: Addera D3). A maioria das pacientes foi orientada por seus médicos a iniciar tratamento concomitante com bisfotonatos, de forma que apenas 23 pacientes seguiram a orientação proposta por nós. Nosso intuito foi correlacionar os resultados das densitometrias ósseas antes de depois da suplementação com vitamina D, mesmo na vigência do uso de inibidores da aromatase para verificar se existia efeito protetor de curto prazo da suplementação para pacientes com câncer de mama. Todas as pacientes que aceitaram fazer uso da suplementação receberam gratuitamente a medicação mensalmente.

Tabela 2 – Pacientes usuárias de inibidores de aromatase.

Nome	DMO – colo (g/cm3)	DMO - coluna (g/cm3)	1,25 Vit. D (pg/ml)	Calcemia (mg/dl)	Calciúria (mg/24h)	Idade (anos)	Tempo med (anos)
MMJB	0,810	0,933	26,4	9,0	190	61	< 1
DMTC	0,831	1,236	20,1	10,0	84	81	< 1
EPT	0,741	0,623	28,6	8,7	70	60	< 1
AS	0,997	1,112	27,2	8,0	100	74	< 1
LMC	0,833	0,993	25,1	9,2	92	74	< 1
CSAP	0,797	0,925	26,5	8,8	134	66	< 1
RA	0,949	1,182	8,3	8,6	124	61	< 1
CSPN	1,012	1,011	39,2	8,8	120	48	< 1
RS	0,842	1,123	22,6	8,8	90	44	< 1
ECS	0,777	1,211	21,6	9,0	130	66	< 1
GFS	0,731	0,987	18,9	9,8	90	71	< 1
LCMR	0,799	0,988	20,4	8,2	126	76	< 1
MAMS	0,645	0,688	52,6	8,9	132	78	< 1
TSH	0,891	1,124	32,9	8,9	124	57	< 1
CSJ	0,897	1,112	30,6	10,2	140	56	< 1
TRP	0,865	0,935	30,1	8,9	126	62	< 1
MCA	0,897	1,122	28,7	8,7	80	47	< 1
CSS	0,899	0,997	32,6	11,0	132	55	< 1
ACS	0,881	1,223	22,8	8,8	92	48	< 1
RP	0,788	1,125	36,0	9,8	78	46	< 1
GAPC	0,888	0,926	19,7	9,4	88	68	< 1
MASL	0,688	0,877	19,8	9	130	68	1 a 2
DMPS	1,051	1,175	14,5	9,2	88	55	1 a 2
MNCU	1,005	1,447	33,5	11	144	63	1 a 2
ACTF	0,882	1,077	29,6	9,2	102	66	1 a 2
AGF	0,868	1,205	27,3	9,2	128	77	1 a 2
RRN	0,608	0,986	25	9	78	64	1 a 2
MJCC	1,056	1,166	30	8,8	60	54	1 a 2
LAMR	0,615	0,887	20,2	9,6	112	52	1 a 2
CLC	0,533	0,906	21,9	8,9	117	80	1 a 2
MAS	1,027	1,122	35,3	9,2	136	70	1 a 2
JSG	0,701	0,721	21,4	10,2	112	60	1 a 2
MC	0,889	0,921	25,4	10	78	72	1 a 2
MAC	0,712	0,789	18,6	8,6	80	58	1 a 2
AP	0,689	0,672	18,2	8,8	122	69	1 a 2
MMS	0,727	0,811	20,9	8,8	136	70	1 a 2
IPB	0,801	0,821	25,7	9,6	76	48	1 a 2
MLSB	0,722	0,855	21,2	9	88	44	1 a 2
FAS	1,011	0,889	28	12	68	78	1 a 2
LST	1,190	1,190	30,1	9,2	103	64	2 a 3
EPM	0,851	1,303	23,1	8,9	126	80	2 a 3
ANS	0,993	0,996	19,9	7,9	178	61	2 a 3
LAV	0,991	1,233	25,7	8,9	110	61	2 a 3
TS	0,547	0,799	24,2	10,2	112	70	2 a 3

SCS	0,720	0,888	23,6	8,0	88	60	2 a 3
EBG	0,661	0,731	18,8	8,8	92	71	2 a 3
DP	0,703	0,912	16,3	9,0	110	51	2 a 3
SMP	0,688	0,870	25,3	9,6	78	62	2 a 3
MCCA	0,559	0,778	19,8	10,6	86	58	2 a 3
AAC	1,020	0,911	21,2	8,2	182	49	2 a 3
MHM	0,501	0,71	21,7	9,0	98	60	2 a 3
AHCC	0,670	0,788	22,3	9,4	166	62	2 a 3
LES	0,810	0,993	16,7	10,4	122	50	2 a 3
IBE	0,983	1,227	19	8,8	82	72	3 a 4
LCC	0,899	0,95	37,5	9,8	123	60	3 a 4
GM	0,911	1,102	20,2	10	126	69	3 a 4
SLP	0,76	0,842	18,7	14	182	46	3 a 4
ASR	0,587	0,782	24	8,8	80	64	3 a 4
ES	0,812	0,924	16,4	8,6	66	63	3 a 4
ECT	0,644	0,877	12,2	9	114	61	3 a 4
JT	0,826	1,011	16,8	9,6	86	77	3 a 4
TH	0,777	0,912	30,2	8,2	68	80	3 a 4
ME	0,623	0,904	21,4	8,6	142	66	3 a 4
CiPB	0,715	0,812	18	10,2	118	72	3 a 4
MD	0,711	0,866	22	9,2	96	47	3 a 4
MEAF	0,661	0,993	23	9,8	104	56	3 a 4
RFB	0,565	0,987	10,2	7,8	198	50	3 a 4
CZ	0,888	0,799	32	10,8	122	62	3 a 4
MSCP	0,623	0,912	29	10	132	72	4 a 5
MGSL	0,737	1,329	22	9,2	98	69	4 a 5
IBR	0,711	0,822	17,5	8,8	134	69	4 a 5
MLSF	0,674	0,91	18	9,2	100	75	4 a 5
MLB	0,686	0,698	11	9,6	89	66	4 a 5
MCG	0,723	0,806	14	9	77	48	4 a 5
MMP	0,702	1,002	21,3	8,8	126	62	4 a 5
JVT	0,567	0,802	19	8,6	82	58	4 a 5
EF	0,661	1,111	32	10,9	119	55	4 a 5
VM	0,689	0,81	20	9,2	132	64	4 a 5
ZC	0,881	0,912	27	10,2	122	51	4 a 5
EE	0,799	0,877	25	10	90	70	4 a 5

Tabela 3 – Pacientes usuárias de tamoxifeno (grupo controle).

Nome	DMO – colo (g/cm <sup>3</sup> )	DMO – coluna (g/cm <sup>3</sup> )	1,25 Vitamina D (pg/ml)	Calcemia (mg/dl)	Calciúria (mg/24h)	Idade (anos)	Tempo med (anos)
CPV	0,929	1,166	36	9,9	112	54	< 1
MASMS	0,911	0,881	21	8,7	126	62	< 1
AB	0,831	0,934	28,4	8,0	78	48	< 1
IAD	0,941	0,892	26,1	9,2	82	70	< 1
NNA	0,997	0,997	29,8	8,7	118	72	< 1
LCB	0,933	1,15	38,4	8,6	68	68	< 1
NM	0,897	1,111	32,5	8,8	74	66	< 1
EACP	0,749	0,927	27	8,8	182	61	< 1
MEMM	1,012	1,212	34	9,0	78	51	< 1
ILFC	0,842	0,988	29,2	9,4	156	55	< 1
EFFC	0,977	1,144	34	8,2	144	58	< 1
LACA	0,831	1,103	31	8,1	121	80	< 1
MCOMM	0,899	1,099	30	8,9	70	77	< 1
VAD	0,892	1,001	31	9,2	134	55	1 a 2
ELN	0,998	1,131	40	8,1	128	56	1 a 2
EAMR	0,861	0,941	32	8,0	168	77	1 a 2
SPS	0,967	0,981	33	9,0	190	61	1 a 2
VBF	0,910	0,999	32	9,7	118	81	1 a 2
RCC	0,962	1,033	34	8,4	78	59	1 a 2
VR	0,921	1,123	33	8,8	70	65	1 a 2
ZVR	0,831	0,931	28	8,1	92	62	1 a 2
TTA	0,791	1,002	25	9,2	120	61	1 a 2
MAVC	0,713	0,899	24	7,8	78	71	1 a 2
JGS	0,997	1,029	34	9,0	68	72	1 a 2
EAGL	1,021	1,145	41	8,6	119	60	1 a 2
CBF	0,899	1,084	32	8,9	72	49	1 a 2
EHPF	0,859	0,988	30	8,4	89	48	1 a 2
MLM	0,762	0,833	17	9,1	78	44	1 a 2
KNO	0,860	0,901	28	9,9	102	68	1 a 2
MICA	0,813	0,962	33	8,2	96	48	2 a 3
MLP	0,931	1,276	46	8,5	142	55	2 a 3
AGG	0,883	0,863	30	9,0	68	59	2 a 3
NRR	0,978	0,889	30	9,0	81	67	2 a 3
TRA	0,936	0,985	31	8,3	112	73	2 a 3
IA	0,997	1,022	31	8,7	60	79	2 a 3
MAP	0,955	1,124	31	8,8	174	52	2 a 3
MCT	0,889	1,005	26	9,0	152	63	2 a 3
CPB	0,911	0,997	27	9,0	84	68	2 a 3
ALG	0,772	0,866	23	9,2	155	57	2 a 3
MDX	0,984	1,002	32	8,1	90	55	2 a 3
CZO	0,903	1,132	39	8,0	94	69	2 a 3
MRM	0,860	1,044	30	8,4	69	64	2 a 3
CBF	0,755	0,811	18	9,8	116	56	2 a 3

MJC	0,931	0,987	30	8,9	110	66	3 a 4
SATP	0,877	1,101	33	8,2	122	71	3 a 4
ADGM	0,876	0,913	26	8,0	119	78	3 a 4
NHM	0,971	1,112	36	8,2	66	50	3 a 4
NMP	0,816	0,999	27	8,3	78	51	3 a 4
SJA	0,763	0,902	26	8,6	92	55	3 a 4
MAMB	0,988	1,112	35	9,8	66	62	3 a 4
INL	1,122	1,123	43	7,9	160	68	3 a 4
MSM	0,896	1,062	33	9,7	102	60	3 a 4
NST	0,839	0,987	30	9,4	148	49	3 a 4
RPP	0,955	1,166	38	8,9	122	56	4 a 5
TSG	0,942	0,881	34	8,5	108	66	4 a 5
CAR	0,835	0,934	28,6	8,2	112	59	4 a 5
EAR	0,921	0,892	27	9,2	68	60	4 a 5
RAPS	0,997	1,102	29	8,5	96	48	4 a 5
MAA	0,911	0,998	31	9,0	82	57	4 a 5
JBS	0,869	1,119	32,5	8,8	107	67	4 a 5
MBM	0,896	0,927	27	8,3	188	72	4 a 5
AST	0,921	1,03	34	9,1	178	59	4 a 5
NFL	1,155	0,978	29,2	9,3	99	53	4 a 5
VMR	1,012	1,124	34	8,2	142	78	4 a 5
TAMB	0,931	1,101	31	8,3	129	77	4 a 5
IMR	0,899	0,992	30	8,9	178	62	4 a 5
SM	1,104	1,03	56	9,8	162	71	4 a 5

## **Resultados**

### *Análise Descritiva*

Das 212 pacientes entrevistadas como eventuais candidatas a participarem da pesquisa, apenas 7 não aceitaram participar. Das restantes, 2 faleceram e 5 não puderam participar por questões pessoais. Das 198 pacientes, 147 finalizaram corretamente a seqüência de exames de imagem e laboratoriais, sendo 80 usuárias de anastrozol (inibidor da aromatase) e 67 usuárias de tamoxifeno.

O grupo de usuárias de anastrozol composto de 80 indivíduos foi subdividido em 5 grupos de acordo com o tempo de utilização da droga. Um subgrupo de 21 pacientes usuárias de anastrozol há menos de 1 ano cuja idade variou de 44 a 81 anos, com média de 61,86 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,65 a 1,01 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,85 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,62 a 1,24 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,03 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 8,3 a 52,6 pg/ml, com média de 27,19 pg/ml, a calcemia variou de 8 a 11 mg/dl, com média de 9,12 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 70 a 190 mg/24h, com média de 111,52 mg/24h.

Um subgrupo de 18 pacientes usuárias de anastrozol entre 1 e 2 anos cuja idade variou de 44 a 80 anos, com média de 63,78 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,53 a 1,06 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,81 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,67 a 1,45 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,96 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 14,5 a 35,3 pg/ml, com média de 24,25 pg/ml, a calcemia variou de 8,6 a 12 mg/dl, com média de 9,45 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 60 a 144 mg/24h, com média de 103,06 mg/24h.

Um subgrupo de 14 pacientes usuárias de anastrozol entre 2 e 3 anos cuja idade variou de 49 a 80 anos, com média de 61,36 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,5 a 1,19 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,78 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,71 a 1,3 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,94 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 16,3 a 30,1 pg/ml, com média de 22,05 pg/ml, a calcemia variou de 7,9 a 10,6 mg/dl, com média de 9,15 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 78 a 182 mg/24h, com média de 117,93 mg/24h.

Um subgrupo de 15 pacientes usuárias de anastrozol entre 3 e 4 anos cuja idade variou de 46 a 80 anos, com média de 63 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,57 a 0,98 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,76 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,78 a 1,23 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,93 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 10,2 a 37,5 pg/ml, com média de 21,44 pg/ml, a calcemia variou de 7,8 a 14 mg/dl, com média de 9,55 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 66 a 198 mg/24h, com média de 113,8 mg/24h.

Um subgrupo de 12 pacientes usuárias de anastrozol entre 4 e 5 anos cuja idade variou de 48 a 75 anos, com média de 63,25 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,57 a 0,88 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,7 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,7 a 1,33 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,92 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 11 a 32 pg/ml, com média de 21,32 pg/ml, a calcemia variou de 8,6 a 10,9 mg/dl, com média de 9,46 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 77 a 134 mg/24h, com média de 108,42 mg/24h.

A mesma subdivisão foi feita com o grupo controle. Os 5 subgrupos foram compostos da seguinte maneira: um subgrupo de 13 pacientes usuárias de tamoxifeno há menos de 1 ano cuja idade variou de 48 a 80 anos, com média de 63,23 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,75 a 1,01 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,9 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,88 a 1,21 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,05 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 21 a 38,4 pg/ml, com média de 30,57 pg/ml, a calcemia variou de 8 a 9,9 mg/dl, com média de 8,79 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 68 a 182 mg/24h, com média de 108,38 mg/24h.

Um subgrupo de 16 pacientes usuárias de tamoxifeno entre 1 e 2 anos cuja idade variou de 44 a 81 anos, com média de 61,81 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,71 a 1,02 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,89 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,83 a 1,15 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,0 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 17 a 41 pg/ml, com média de 30,88 pg/ml, a calcemia variou de 7,8 a 9,9 mg/dl, com média de 8,76 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 68 a 190 mg/24h, com média de 106,5 mg/24h.

Um subgrupo de 14 pacientes usuárias de tamoxifeno entre 2 e 3 anos cuja idade variou de 48 a 79 anos, com média de 61,79 anos, a DMO de colo de fêmur

direito variou de 0,76 a 1,0 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,9 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,81 a 1,28 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,0 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 18 a 46 pg/ml, com média de 30,5 pg/ml, a calcemia variou de 8 a 9,8 mg/dl, com média de 8,71 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 60 a 174 mg/24h, com média de 106,64 mg/24h.

Um subgrupo de 10 pacientes usuárias de tamoxifeno entre 3 e 4 anos cuja idade variou de 49 a 78 anos, com média de 61 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,76 a 1,12 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,91 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,9 a 1,12 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,03 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 26 a 43 pg/ml, com média de 31,9 pg/ml, a calcemia variou de 7,9 a 9,8 mg/dl, com média de 8,7 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 66 a 160 mg/24h, com média de 106,3 mg/24h.

Um subgrupo de 14 pacientes usuárias de tamoxifeno entre 4 e 5 anos cuja idade variou de 48 a 78 anos, com média de 63,21 anos, a DMO de colo de fêmur direito variou de 0,84 a 1,16 g/cm<sup>3</sup>, com média de 0,95 g/cm<sup>3</sup>, a DMO da coluna lombar variou de 0,88 a 1,17 g/cm<sup>3</sup>, com média de 1,02 g/cm<sup>3</sup>, a vitamina D variou de 27 a 56 pg/ml, com média de 32,95 pg/ml, a calcemia variou de 8,2 a 9,8 mg/dl, com média de 8,79 mg/dl e por fim a calciúria de 24 horas que variou de 68 a 188 mg/24h, com média de 126,5 mg/24h.

Tabela 4 – Resumo descritivo dos resultados de ambos os grupos

Tempo	Droga	n	Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
< 1	In. Aromatase	21	DXA_colo	0,85	0,09	0,65	0,8	0,84	0,9	1,01
			DXA_coluna	1,03	0,16	0,62	0,94	1,01	1,12	1,24
			Vitamina D	27,19	8,97	8,3	21,6	26,5	30,6	52,6
			Calcemia	9,12	0,7	8	8,8	8,9	9,4	11
			Calciúria	111,52	28,66	70	90	120	130	190
			Idade	61,86	11,32	44	55	61	71	81
	Tamox	13	DXA_colo	0,9	0,07	0,75	0,84	0,91	0,94	1,01
			DXA_coluna	1,05	0,11	0,88	0,93	1,1	1,14	1,21
			Vitamina D	30,57	4,56	21	28,4	30	34	38,4
			Calcemia	8,79	0,53	8	8,6	8,8	9	9,9
			Calciúria	108,38	36,92	68	78	112	126	182
			Idade	63,23	9,97	48	55	62	70	80
1 a 2	In. Aromatase	18	DXA_colo	0,81	0,17	0,53	0,69	0,76	1,01	1,06
			DXA_coluna	0,96	0,2	0,67	0,82	0,9	1,12	1,45
			Vitamina D	24,25	5,59	14,5	20,2	23,45	28	35,3
			Calcemia	9,45	0,87	8,6	8,9	9,2	9,6	12
			Calciúria	103,06	26,53	60	78	107	128	144
			Idade	63,78	10,39	44	55	65	70	80
	Tamox	16	DXA_colo	0,89	0,09	0,71	0,85	0,9	0,96	1,02
			DXA_coluna	1	0,09	0,83	0,94	1	1,06	1,15
			Vitamina D	30,88	5,83	17	28	32	33,5	41
			Calcemia	8,76	0,6	7,8	8,25	8,85	9,15	9,9
			Calciúria	106,5	35,98	68	78	97	124	190
			Idade	61,81	10,33	44	55,5	61	69,5	81
2 a 3	In. Aromatase	14	DXA_colo	0,78	0,21	0,5	0,66	0,71	0,99	1,19
			DXA_coluna	0,94	0,19	0,71	0,79	0,9	1	1,3
			Vitamina D	22,05	3,72	16,3	19,8	22	24,2	30,1
			Calcemia	9,15	0,84	7,9	8,8	9	9,6	10,6
			Calciúria	117,93	34,05	78	92	110	126	182
			Idade	61,36	8,45	49	58	61	64	80
	Tamox	14	DXA_colo	0,9	0,08	0,76	0,86	0,91	0,96	1
			DXA_coluna	1	0,12	0,81	0,89	1	1,04	1,28
			Vitamina D	30,5	6,61	18	27	30,5	32	46
			Calcemia	8,71	0,5	8	8,3	8,75	9	9,8
			Calciúria	106,64	36,27	60	81	95	142	174
			Idade	61,79	8,72	48	55	61	68	79

3 a 4	In. Aromatase	15	DXA_colo	0,76	0,13	0,57	0,64	0,76	0,89	0,98
			DXA_coluna	0,93	0,12	0,78	0,84	0,91	0,99	1,23
			Vitamina D	21,44	7,27	10,2	16,8	20,2	24	37,5
			Calcemia	9,55	1,47	7,8	8,6	9,2	10	14
			Calciúria	113,8	38,34	66	82	114	126	198
			Idade	63	10,25	46	56	63	72	80
	Tamox	10	DXA_colo	0,91	0,1	0,76	0,84	0,89	0,97	1,12
			DXA_coluna	1,03	0,08	0,9	0,99	1,03	1,11	1,12
			Vitamina D	31,9	5,3	26	27	31,5	35	43
			Calcemia	8,7	0,71	7,9	8,2	8,45	9,4	9,8
			Calciúria	106,3	32,17	66	78	106	122	160
			Idade	61	9,81	49	51	61	68	78
4 a 5	In. Aromatase	12	DXA_colo	0,7	0,08	0,57	0,67	0,7	0,73	0,88
			DXA_coluna	0,92	0,17	0,7	0,81	0,89	0,96	1,33
			Vitamina D	21,32	6,12	11	17,75	20,65	26	32
			Calcemia	9,46	0,69	8,6	8,9	9,2	10	10,9
			Calciúria	108,42	21,22	77	89,5	109,5	129	134
			Idade	63,25	8,6	48	56,5	65	69,5	75
	Tamox	14	DXA_colo	0,95	0,09	0,84	0,9	0,93	1	1,16
			DXA_coluna	1,02	0,09	0,88	0,93	1,01	1,1	1,17
			Vitamina D	32,95	7,32	27	29	31	34	56
			Calcemia	8,79	0,48	8,2	8,3	8,85	9,1	9,8
			Calciúria	126,5	37,86	68	99	117	162	188
			Idade	63,21	8,95	48	57	61	71	78

Todas as pacientes usuárias de anastrozol cujas dosagens séricas de vitamina D foram inferiores a 30 pg/dl e apresentaram densitometrias ósseas cujos valores de DMO do colo do fêmur demonstravam osteopenia ou osteoporose foram convidadas a realizar suplementação com 800 UI de vitamina D isolada por 12 meses. Nesta segunda etapa da pesquisa houve baixa adesão das pacientes, pois a maioria foi orientada por seus médicos oncologistas a iniciar tratamento profilático para fraturas ósseas com bisfosfonatos. As 21 pacientes que aceitaram fazer uso da suplementação de vitamina D na dose de 800 UI/dia por 1 ano tiveram seus resultados de DMO de colo de fêmur comparados pré e pós tratamento. (Tabela 4).

Nenhuma das pacientes que fizeram uso da suplementação de vitamina D por 12 meses apresentou fratura até o fim da pesquisa.

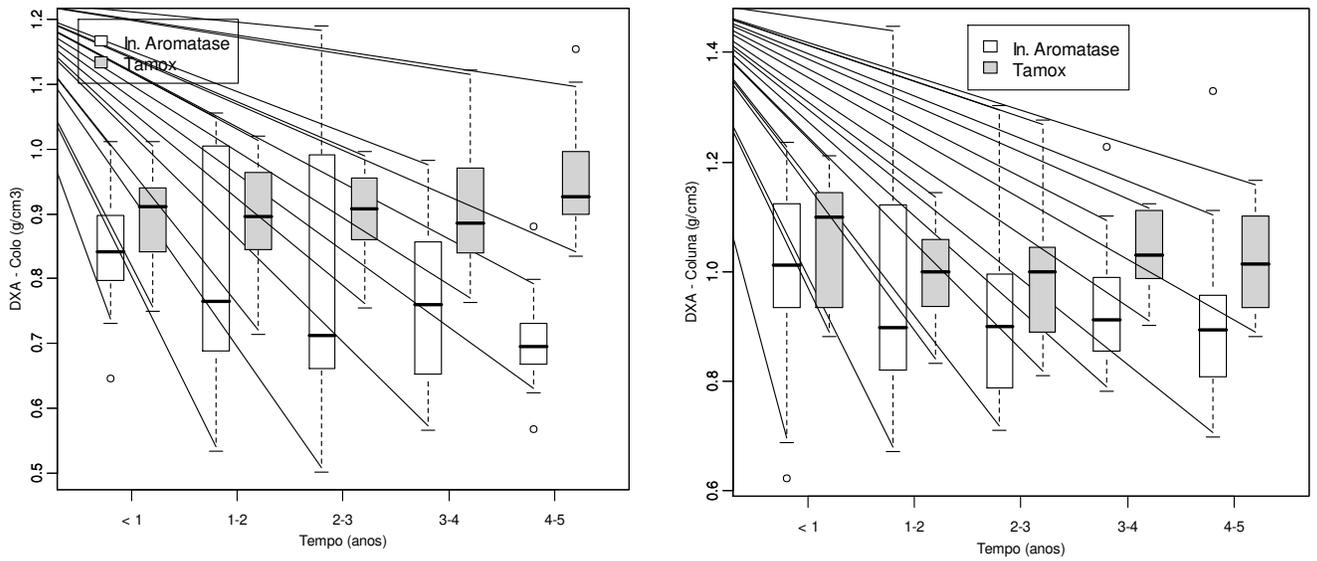


Gráfico 1 – Blox-plot dos valores de DEXA de coluna lombar e colo de fêmur nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação.

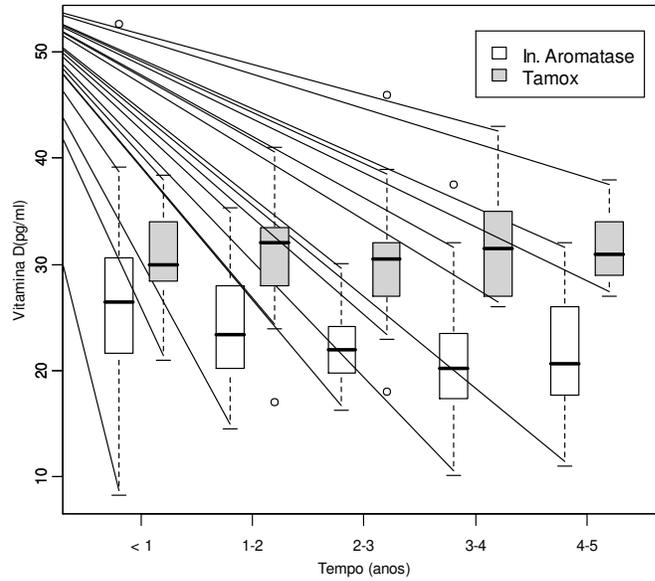


Gráfico 2 - Blox-plot dos valores de Vitamina D nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação.

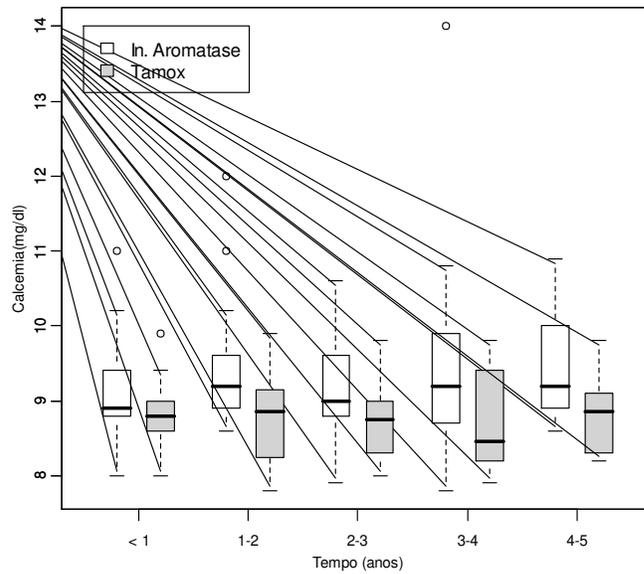


Gráfico 3 - Blox-plot dos valores de Calcemia nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação.

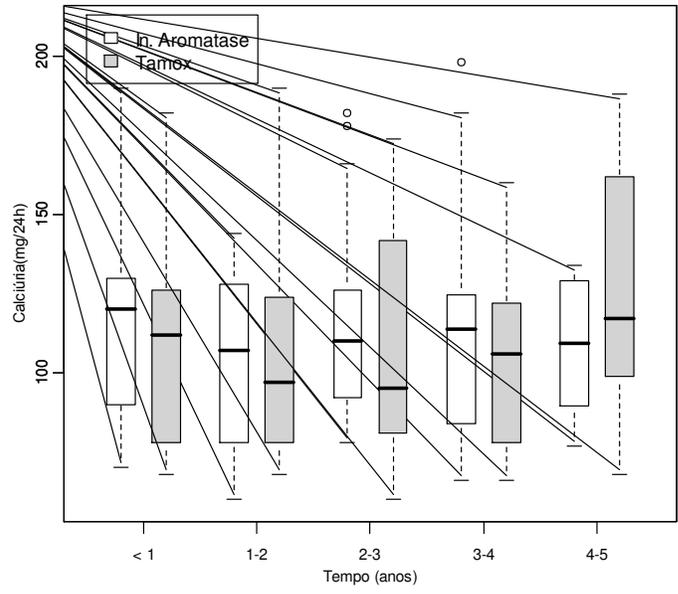


Gráfico 4 - Blox-plot dos valores de Calcúria nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação.

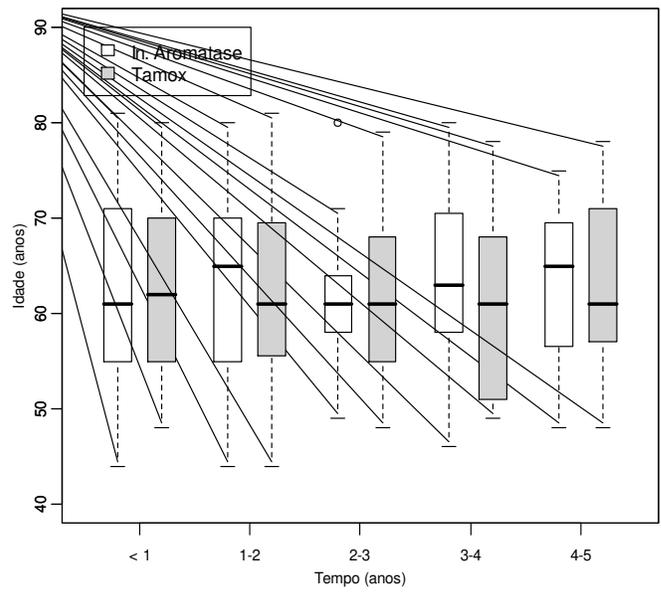


Gráfico 5 - Blox-plot das idades nos 2 grupos de acordo com o tempo de medicação.

Tabela 5 – Resultados das DMOs de colo de fêmur direito e coluna lombar antes e após tratamento de 12 meses com 800 UI de vitamina D isolada.

Nome	DMO – colo t1 (g/cm3)	DXA - colo t2 (g/cm3)	DMO – coluna t1 (g/cm3)	DMO – coluna t2 (g/cm3)	1,25 Vitamina D t1 (pg/ml)	1,25 Vitamina D t2 (pg/ml)	Tipo de droga	Tempo med (anos)
LAMR	0,615	0,667	0,887	0,881	20,2		In.	
CLSC	0,533	0,552	0,906	0,911	21,9	52	Aromatase	1 a 2
MAC	0,712	0,699	0,789	0,767	18,6	44	In.	1 a 2
AP	0,689	0,677	0,672	0,699	18,2	36	Aromatase	1 a 2
						58	In.	1 a 2
IBR	0,711	0,882	0,822	0,835	17,5	40	Aromatase	4 a 5
MLSF	0,674	0,761	0,910	0,932	18	50	In.	4 a 5
MLB	0,686	0,703	0,698	0,712	11	33	Aromatase	4 a 5
MCG	0,723	0,711	0,806	0,799	14	38	In.	4 a 5
JVT	0,567	0,688	0,802	0,842	19	46	Aromatase	4 a 5
VM	0,689	0,699	0,81	0,821	20	55	In.	4 a 5
DMTC	0,831	0,814	1,236	1,198	20,1	47	Aromatase	< 1
GFS	0,731	0,773	0,987	0,999	18,9	41	In.	< 1
CMR	0,799	0,723	0,988	0,992	20,4	34	Aromatase	< 1
GAPC	0,888	0,881	0,926	1,021	19,7	32	In.	< 1
EBG				0,813	18,8		Aromatase	< 1
DP	0,661	0,716	0,731		16,3	42	In.	2 a 3
LES	0,703	0,728	0,912	0,966	16,7	38	Aromatase	2 a 3
	0,810	0,822	0,993	0,989		40	In.	2 a 3
ES	0,812	0,824	0,924	0,955	16,4	46	Aromatase	3 a 4
ECT	0,644	0,639	0,877	0,886	12,2	49	In.	3 a 4
RFB	0,565	0,756	0,987	1,111	10,2	36	Aromatase	3 a 4

### *Análise Estatística*

Neste estudo, para cada uma das hipóteses formuladas, realizamos metodologias distintas de análise estatística:

*Hipótese 1: Usuárias de inibidores de aromatase possuem menor massa mineral óssea quando comparadas ao grupo controle (usuárias de tamoxifeno).*

Para testar essa hipótese utilizamos a comparação de médias de DMO nos grupos como um todo, não considerando as variações dos valores no tempo. A medida de tendência central usada foi a média das variáveis e a medida de variabilidade foi o desvio padrão para os todos os dados. O teste de Shapiro-Wilk demonstrou que tanto vitamina D quanto DMO apresentam distribuição normal (tabela 5), o que nos permite utilizar o teste t para comparação das 2 variáveis independentes.

Tabela 6 – Teste de normalidade de Shapiro Wilk para DMO e vitamina D

<b>Teste para Normalidade DMO</b>				
<b>Teste</b>	<b>Estatística</b>		<b>p-Valor</b>	
<b>Shapiro-Wilk</b>	<b>W</b>	0.972472	<b>Pr &lt; W</b>	<b>0.1105</b>
<b>Teste para Normalidade VIT D</b>				
<b>Teste</b>	<b>Estatística</b>		<b>P-Valor</b>	
<b>Shapiro-Wilk</b>	<b>W</b>	0.979005	<b>Pr &lt; W</b>	<b>0.2633</b>

Tabela 7 – Determinação da igualdade de variância dos valores de DMO entre os 2 grupos

<b>Igualdade de Variâncias</b>				
<b>Variável</b>	<b>Graus de Liberdade do numerador</b>	<b>Graus de Liberdade do denominador</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>DMO</b>	79	66	2.87	<b>&lt;.0001</b>

Tabela 8 – Determinação do valor de p para comparação das médias de DMO dos 2 grupos

<b>Teste T</b>				
<b>Variável</b>	<b>Variância</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Valor t</b>	<b>Valor p</b>
<b>DMO</b>	Unequal	131	2.44	<b>0.0162</b>

Como o p-valor para o teste de igualdade de variância é significativo, ou seja as variâncias são diferentes, utilizamos o teste t unequal para comparação das médias (tabela 6).

Com o valor de p de 0.0162 (tabela 7) consideramos que as médias de DMO entre os grupos são estatisticamente diferentes ao nível de 5% de significância e que usuárias de inibidores de aromatase possuem menores DMOs em relação ao grupo controle.

*Hipótese 2: Usuárias de inibidores de aromatase possuem menor valor de vitamina D quando comparadas ao grupo controle (usuárias de tamoxifeno).*

Para responder a essa pergunta utilizamos, da mesma forma, a comparação de médias de vitamina D nos grupos como um todo, não considerando as variações no tempo. Por meio de teste t comparamos as 2 variáveis independentes de acordo com a tabela a seguir (tabela 8):

Tabela 9 - Determinação do valor de p para comparação das médias de Vitamina D dos 2 grupos

<b>Teste – T</b>				
<b>Variável</b>	<b>Variâncias</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Valor T</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Vit D</b>	Equal	144	7.23	<b>&lt;.0001</b>

Como o p-valor para o teste de igualdade de variância é não significativo, ou seja as variâncias são iguais, utilizamos o teste t equal para comparação das médias.

Com o valor de p de 0.0001 (< 0,001) consideramos que as médias de vitamina D entre os grupos são estatisticamente diferentes ao nível de 5% de significância e que usuárias de inibidores de aromatase possuem menores valores de vitamina D em relação ao grupo controle.

*Hipótese 3: Existe correlação entre valores de vitamina D e DMO, ou seja, a queda dos valores de vitamina D acompanha a queda da massa mineral óssea.*

Com o intuito de avaliar a real existência de uma relação entre valores de DMO aferido por densitometria óssea e valores séricos de vitamina D, inicialmente utilizamos apenas o grupo controle que supostamente não apresenta alteração da massa óssea, calculando o índice de correlação de Pearson entre as variáveis. O gráfico de dispersão entre valores de DMO do colo de fêmur D X valores de vitamina D não levou em consideração o tempo de utilização da droga, uma vez que a mesma não possui efeito negativo sobre a massa mineral óssea no grupo controle.

Os grupos apresentaram valores distintos de correlação para as variáveis vitamina D e DMO do colo do fêmur. Como esperado, o grupo controle apresentou correlação significativa ao nível de 5% ( $r = 0,633$  com p-valor de 0,000), o que demonstra que quanto maior o nível de vitamina D, maior também será a DMO da paciente conforme dados prévios da literatura (20, 39, 52) - gráfico 6.

Contrariamente à hipótese inicial, no caso do grupo de usuárias de inibidores de aromatase, o coeficiente de correlação foi de 0,287 com p-valor de 0,01, o que quer dizer que a correlação é baixa, porém significativa ao nível de 5% de confiança – gráfico 7.

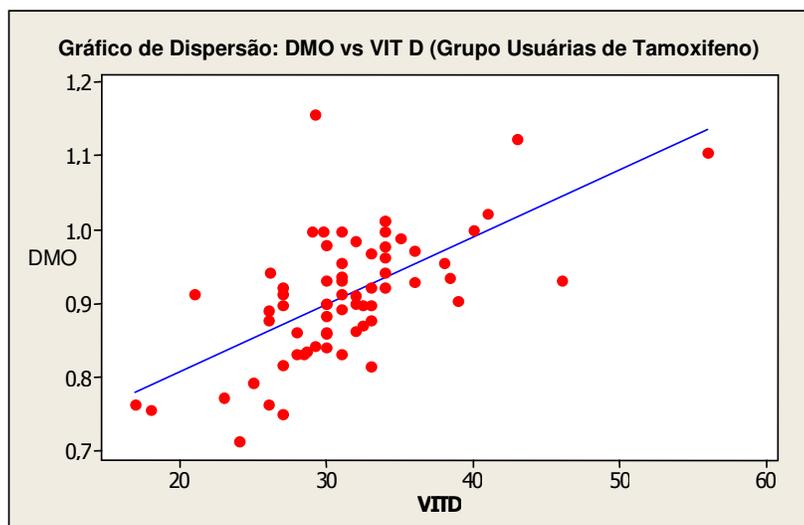


Gráfico 6 – Correlação entre valores séricos de vitamina D e DMO em usuárias de tamoxifeno (grupo controle).

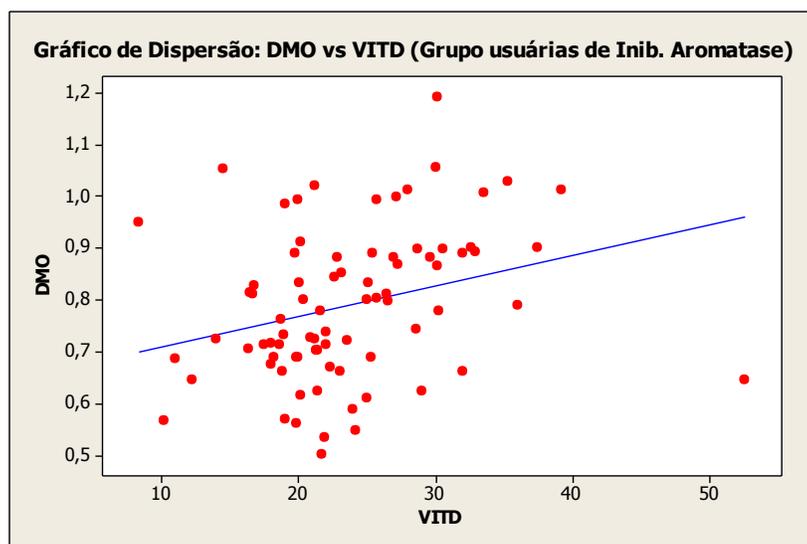


Gráfico 7 – Correlação entre valores séricos de vitamina D e DMO em usuárias de inibidores de aromatase.

Ainda que a diminuição dos valores das médias obtidas em cada tempo para cada variável pareça ser óbvio (gráfico 8), o índice de correlação entre DMO do colo do fêmur e vitamina D foi baixo. Isso poderia ser explicado por uma maior queda dos valores de vitamina D no tempo quando comparada à queda da DMO, já que, ao contrário do grupo controle, existe um efeito cumulativo da utilização de anastrozol sobre a massa mineral óssea. Para testar esta hipótese que explicaria a baixa correlação entre as variáveis, utilizamos a comparação das taxas de queda dos valores de cada variável em cada intervalo de tempo de utilização da droga. O coeficiente de inclinação das retas para cada uma das variáveis nos permite fazer comparações entre as quedas. O gráfico 9 representa as quedas das variáveis DMO e valores de vitamina D nos intervalos de tempo de utilização de anastrozol: 1 a 2 anos, 2 a 3 anos, 3 a 4 anos e 4 a 5 anos.

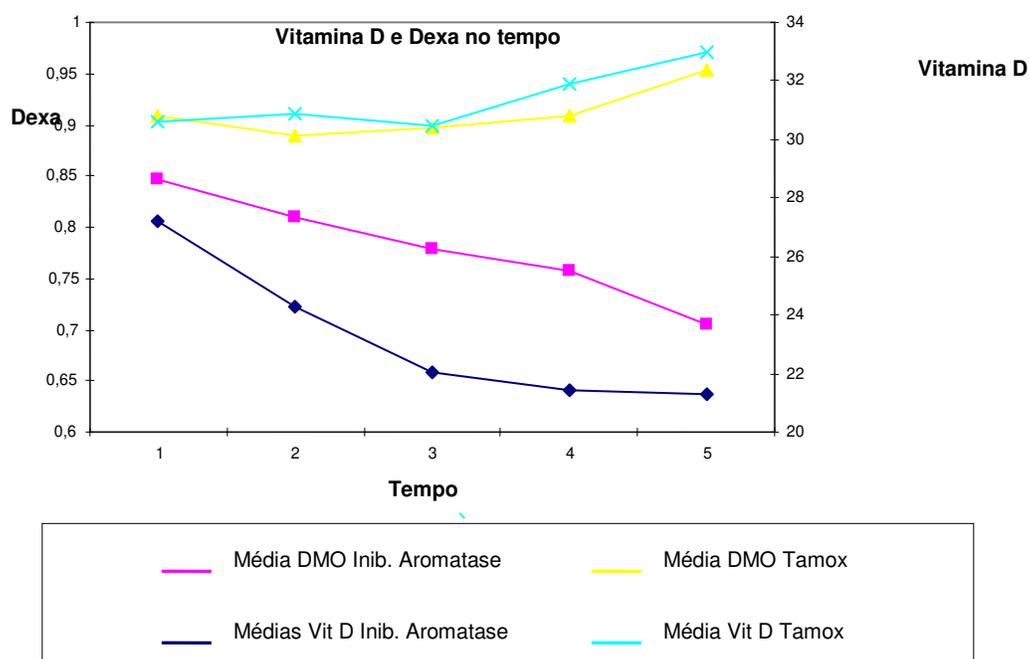


Gráfico 8 – Valores das médias de vitamina D e DMO de usuárias de anastrozol e de tamoxifeno de acordo com o tempo de utilização da droga

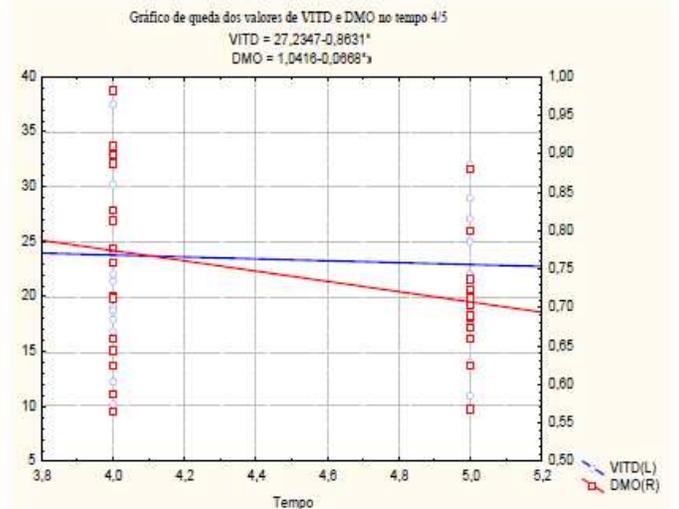
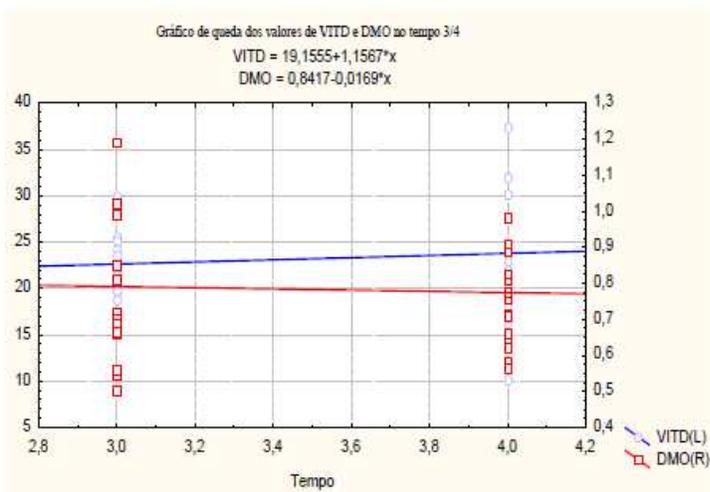
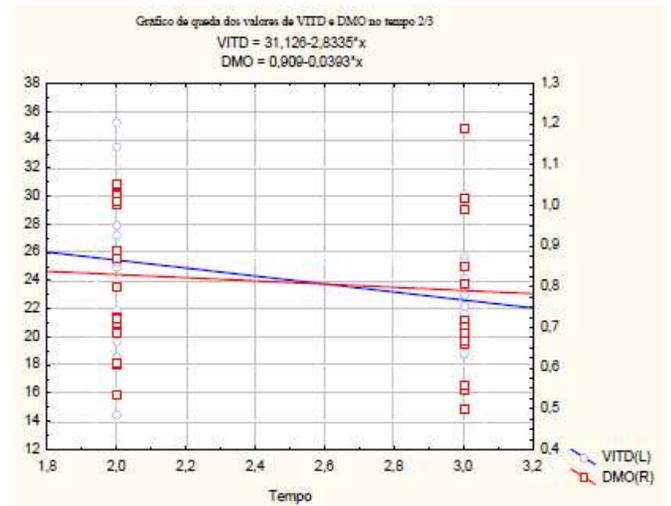
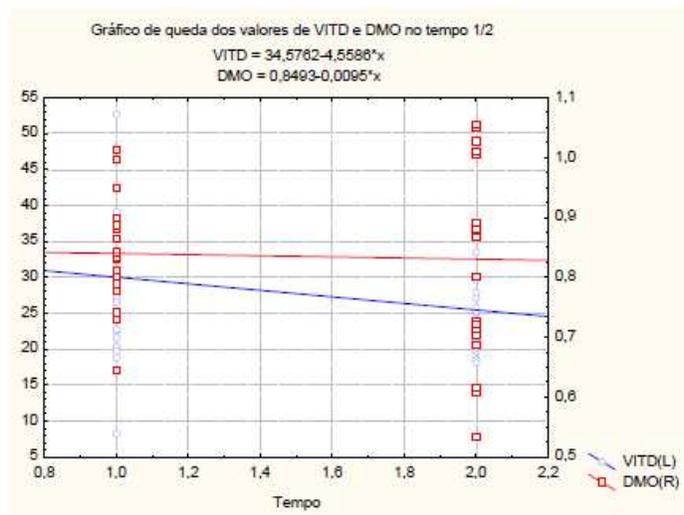


Gráfico 9 – Queda dos valores de médias de DMO e vitamina D nos intervalos de tempo de utilização do inibidor da aromatase.

A avaliação da queda das médias requer atenção, pois pode nos levar a pensar que em alguns momentos as variáveis sobem. De fato o que se depreende dos gráficos é que a partir de 1 ano de utilização do inibidor da aromatase há uma queda mais acentuada dos valores de vitamina D do que dos valores de DMO, apesar de ambos caírem em termos absolutos. A queda da vitamina D se mantém com inclinação mais forte que a queda da DMO até o terceiro ano de utilização da droga, quando entoa se estabiliza. É a partir de 4 anos de utilização do anastrozol que a queda na DMO se torna realmente importante e supera a queda da vitamina D.

*Hipótese 4 - Utilizar suplementos de vitamina D altera a massa mineral óssea de pacientes usuárias de inibidores de aromatase.*

Para testar a hipótese de que vitamina D possui efeito positivo sobre a massa mineral óssea de pacientes usuárias de inibidores de aromatase, comparamos os valores das médias de DMO pré e pós-tratamento com suplementos de vitamina D isolada. Para tal utilizamos a comparação de médias de amostras pareadas por meio de vetores de contraste (tabela 9).

Tabela 10 – Dados da comparação de médias pré e pós tratamento com vitamina D.

<b>Média das diferenças dos vetores</b>	<b>Intervalo de confiança</b>	<b>Valor p</b>
-0.0233	-0.041816 a -0.004784	0.0014361

Observando os resultados acima, temos que existe diferença significativa entre os valores de DMO pré e pós-tratamento com vitamina D ao nível de 5% de significância e atribuindo valores normais de vitamina D sérica superiores a 30 ng/dl.

## Discussão

A utilização de vitamina D como fator de prevenção de doenças já foi aventada por vários autores para o tratamento de inúmeras patologias, incluindo vários tipos de câncer (61, 62, 63, 64, 65, 66). No caso específico do câncer de mama, e especialmente no caso de pacientes que fazem uso de inibidores da aromatase, o uso de vitamina D como suplementação parece ser interessante por sua ação anti-proliferativa e também por sua ação positiva sobre a massa óssea, atuando como um fator de prevenção de osteoporose. No caso do efeito anti-proliferativo, aventa-se que a vitamina D possua ação na prevenção do aparecimento e crescimento de tumores, além de metástases atuando como um hormônio nos receptores nucleares espalhados pelo organismo, especialmente nos órgãos-alvo (66). No caso específico do câncer de mama são necessários novos estudos que estabeleçam essa relação no que se refere principalmente às metástases ósseas. A descoberta de que o tecido mamário expressa 1-alfa-hidroxilase fez surgir a hipótese de uma via parácrina de ação da 1,25-OH-vitamina D. A ação anti-proliferativa local da vitamina seria, segundo a hipótese, tecido-específico e não poderia ser detectada no sangue periférico. Desta forma, a 25-OH-vitamina D e não a 1,25-OH-vitamina D tornar-se-ia o metabólito a ser dosado, pois manteria a expressão do gene que medeia a expressão do receptor (VDR) nas células mamárias. Nesse sentido, uma avaliação mais global passaria pela dosagem de ambas as formas de vitamina D (64, 70).

Qualquer que seja a via de ação da vitamina D na prevenção da progressão tumoral, estudos ainda são necessários para se estabelecer um protocolo que introduza a vitamina D no arsenal terapêutico de pacientes com câncer. No que tange a prevenção de fraturas osteoporóticas, no entanto, nosso estudo deixa claro que sua utilização melhora a massa mineral óssea mesmo em um curto espaço de tempo e deveria ser indicada para pacientes em uso de inibidores da aromatase, principalmente quando a dosagem da vitamina D no sangue demonstra valores inferiores a 30 pg/dl. Muitos estudos já demonstraram que a suplementação oral de vitamina D aumenta a DMO (27, 58, 60). Essa correlação foi agora estabelecida para pacientes usuárias de inibidores da aromatase.

Nosso estudo demonstrou que pacientes usuárias de inibidores da aromatase apresentam valores inferiores de vitamina D sérica em relação ao grupo controle, então é possível que haja uma relação entre níveis baixos de estrogênio e de vitamina D. A

deficiência do estrogênio reduz a ativação metabólica da vitamina D e a expressão de seu receptor no núcleo (64), mas é provável que existam outras relações entre as duas substâncias. Em que extensão o estrogênio poderia modular a ação da vitamina D ainda está obscuro. Ainda assim, mesmo em um ambiente pobre em estrogênio – como é o caso de pacientes em tratamento com inibidores da aromatase – a suplementação oral com vitamina D isolada melhorou a massa mineral óssea.

Em nosso estudo, apesar de várias pacientes terem obtido critério clínico para uso de vitamina D – devido essencialmente à baixa dosagem sérica da vitamina e a resultados de densitometria óssea evidenciando osteopenia e/ou osteoporose -, apenas 21 participaram da segunda fase do projeto que constava de uma comparação entre as densitometrias ósseas antes e após 12 meses de tratamento com vitamina D isolada. Isso ocorreu em grande parte devido à gravidade da perda óssea encontrada em alguns casos que resultou na prescrição de bisfosfonatos, além da vitamina D. A maioria dos oncologistas não aceitou manter a paciente em uso isolado de vitamina D pois concluiu que o risco de fratura era elevado e que as evidências em relação à eficácia da suplementação com cálcio ou cálcio e vitamina D eram limitadas (27). Vários ensaios clínicos controlados de suplementação de cálcio e vitamina D para mulheres na pós-menopausa como um todo mostraram redução da perda óssea no fêmur e em outros sítios principalmente no primeiro ano de uso da suplementação (36). Nós testamos esse efeito em mulheres em uso de inibidor de aromatase com o intuito de analisar se a melhora na massa óssea poderia sobrepujar os efeitos negativos da hormonioterapia. O efeito foi comprovado mesmo com uma amostra pequena de indivíduos. O efeito positivo da suplementação de vitamina D foi evidenciado por meio de densitometrias ósseas. Biópsias ósseas – que não foram realizadas neste estudo - poderiam ter avaliado microscopicamente a extensão da ação da vitamina D sobre o osso em um ambiente pobre em estrogênio.

A utilização de suplementos de vitamina D para pacientes usuárias de inibidores de aromatase pode aumentar os custos do tratamento e seguimento de pacientes com câncer de mama, por ser mais um item a ser adicionado. Os custos dos suplementos de vitamina D não foram alvo deste estudo, porém são pequenos quando comparados aos custos da hormonioterapia, de bisfosfonatos e do tratamento clínico-cirúrgico de eventuais fraturas

por osteoporose (36), de modo que consideramos a utilização de suplementos de vitamina D uma excelente política profilática para os agravos relacionados à osteoporose.

Encontramos curiosamente uma maioria de pacientes cujos níveis de vitamina D eram baixos ou limítrofes, mesmo no grupo de usuárias de tamoxifeno. Ainda que os valores de vitamina D fossem superiores no grupo controle (e concordantes com os de DMO também superiores), de um modo geral encontramos uma carência crônica de vitamina D na população brasileira, mesmo com o grau elevado de insolação do país. Esses dados são concordantes com estudos prévios que demonstram os baixos níveis de vitamina D na população brasileira geral (73) e mundial (74).

Uma indagação pertinente que veio à tona quando da realização da pesquisa foi sobre a formação do grupo controle. A escolha por pacientes usuárias de tamoxifeno como grupo controle se deu devido à necessidade de se formar um grupo com o mesmo tipo de câncer, com necessidade de fazer uso de hormonioterapia e com o mesmo perfil etário, porém utilizando uma droga que não tivesse efeito negativo sobre a massa óssea. O tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio, pareceu ser a escolha mais acertada, pois não causa depleção da massa mineral óssea. Alguns estudos sugerem, no entanto, que, ao contrário, existe efeito positivo sobre o tecido ósseo e uma eventual melhora da massa mineral óssea com o tempo de utilização de tamoxifeno (5, 17, 19). Neste caso, a comparação não seria a ideal, uma vez que os efeitos de anastrozol e tamoxifeno são antagônicos e que o grupo controle pode apresentar DMO superior ao da população geral. Mantivemos, ainda assim, esse grupo como controle pois se tratava do grupo com perfil mais próximo ao do grupo estudado. Um grupo controle ideal – pacientes com câncer de mama sem qualquer tratamento – não se encontra, nem é aceitável do ponto de vista ético.

Neste estudo realizamos exames de calcemia e calciúria conjuntamente às dosagens de vitamina D sérica. A realização desses exames teve o intuito de descartar patologias metabólicas e/ou ósseas tais como hipoparatiroidismo que podem alterar os valores de vitamina D e/ou de DMO e que gerar confundimento quando da análise dos dados. Também na análise das densitometrias ósseas, optamos pela utilização de apenas 1 medida de DMO com o intuito de facilitar a análise estatística dos dados. A DMO do colo de fêmur foi escolhida, pois consideramos que o colo do fêmur é o melhor sítio para a avaliação da

massa mineral óssea. Muitas pacientes que possuem desvios da coluna ou espondiloartrose têm um aumento da densidade mineral óssea relacionada à esclerose das superfícies discais e das facetas articulares da coluna lombar, porém sem aumento da densidade mineral do osso esponjoso no interior do corpo vertebral. Isso gera um falso entendimento de que a massa óssea está preservada quando que na verdade pode haver um grau avançado de perda óssea com risco inclusive de fratura (35, 43). Desta forma, as medidas de DMO da coluna lombar foram analisadas apenas para corroborar os valores determinados para o colo do fêmur e não foram levadas em consideração quando da análise dos dados.

## **Conclusões**

Pacientes com câncer de mama com receptor estrogênico positivo que possuem indicação de fazer uso de inibidores da aromatase apresentam tendência à perda de massa óssea com a vigência do tratamento. A perda da massa óssea é tempo-dependente e mais acentuada após 3 anos de tratamento. A avaliação do decréscimo da densidade mineral óssea pode ser feita por meio de densitometrias ósseas, porém dosagens seriadas de vitamina D podem auxiliar no diagnóstico das pacientes em risco.

O presente estudo nos possibilitou concluir que pacientes cujo estado hormonal é baixo devido ao uso de inibidores da aromatase podem se beneficiar de suplementação de vitamina D, uma vez que isoladamente, a vitamina D demonstrou melhorar a massa mineral óssea, ainda que em um ambiente pobre em estrogênio.

## **Referências Bibliográficas**

- 1) JAKESZ R, JONAT W, GNANT M, MITTLBOECK M, GREIL R, TAUSCH C, HILFRICH J, KWANSNY W, MENZEL C, SAMONIGG H, SEIFERT M, GADEMANN G, KAUFMANN M – Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial - *The Lancet* 366 (2005) 455-462.
- 2) SINGHAL H, KAUR K, THOMSON S – Breast Cancer Evaluation – *Medscape Gynecology* (2006) Medscape.
- 3) COATES AS, KESHAVIAH A, THURLIMANN B, MAURIDSEN H, MAURIAC L, FORBES JF, PARIDAENS R, CASTIGLIONE-GERTSCH M, GELBER RD, COLLEONI M, LÁNG I, DEL MASTRO L, SMITH I, CHIRGWIN J, NOGARET J, PIENKOWSKI T, WARDLEY A, JAKOBSEN EH, PRICE KN, GOLDHIRSCH A – Five years of Letrozole compared with Tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98 – *J Clin Oncol* 25 (2007) 486-492.
- 4) ALTUNDAG K, IBRAHIM NK- Aromatase Inhibitors in Breast Cancer: An Overview – *Oncol* 11 (2006) 553-562.
- 5) OLIVEIRA VM, ALDRIGHI JM, RINALDI JF – Quimioprevenção do câncer de mama – *Ver. Assoc. Med Brás* 52 (2006) 453-459.
- 6) LEE WL, CHENG MH, CHAO HT, WANG PH – The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene – *Taiwan J Obstet Gynecol*, 47 (2008) 24-31.
- 7) MUIR M, ROMALO G, WOLF L, ELGER W – Estrone Sulfate is a major source of local Estrogen Formation in Human Bone – *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 4685-4692.
- 8) GOSS PE, HADJI P, SUBAR M, ABREU P, THOMSEN T, BANKE-BOCHITA J – Effects of Steroidal and Nonsteroidal Aromatase Inhibitors on Markers of Bone Turnover in Healthy Postmenopausal Women – *Breast Cancer Res.* 9 (2007) 1-14.
- 9) SAAD ED, BROMBERG S, KATZ A, SIMON SD – Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante - *Rev Bras Cancerol* 48 (2002) 555-567.
- 10) PEREIRA MEA – Inibidores da Aromatase - *Boletim do Centro de Informação do Medicamento* 4 (2005) 1-3.

- 11) DOUGLAS D – Bone Effects of Tamoxifen Tied to Menstrual Status - J Clin Oncol 24 (2006) 675-680.
- 12) MICHAUD LB, GOODIN S - Cancer-Treatment –Induced Bone Loss, Part 2 - Am J Health-Sys Pharm 63 (2006) 534-546.
- 13) GEISLER J, LONNING PE, KRAG LE, LOKKEVIK E, RISBERG T, HAGEN AI, SCLICHTING E, LIEN EA, OFJORD ES, EIDE GE, POLLI A, DI SALLA E, PAOLINI J – Changes in Bone and Lipid metabolism in postmenopausal women with early breast cancer after terminating 2-year treatment with exemestane: A randomized, placebo-controlled study - Europ J Cancer 42 (2006) 2968-2975.
- 14) ATAC Trialists Group - Anastrozole Alone or in Combination with Tamoxifen versus Tamoxifen Alone for Adjuvant Treatment of Postmenopausal Women with Early- Stage Breast Cancer – Cancer 98 (2003) 1802-1810.
- 15) CASSOL LB, GARICOCHEA B – Uso de inibidores da aromatase no tratamento do cancer de mama e osteoporose - Scientia Medica 15 (2005) 279-286.
- 16) PARDINI D – Terapêutica de Reposição Hormonal na Osteoporose da Pós Menopausa – Arq Bras Endocrinol Metab 43 (1999) 428-432.
- 17) RAMALHO ACR, LAZARETTI-CASTRO M, COHEN-SALAL ME, DE VERNEJOU MC – Por que Estrógeno e Raloxifeno melhoram a Densidade Mineral óssea? Mecanismo de Ação do Estrógeno e de um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso - Arq Bras Endocrinol Metab 44 (2000) 471-482.
- 18) BARRETT-CONNOR E, MOSCA L, COLLINS P, GEIGER MJ, GRADY D, KORNITZER M, MCNABB MA, WENGER NK – Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Câncer in Postmenopausal women - New Engl J Med 355 (2006) 125-137.
- 19) VEHMANEN L, ELOMAA I, BLOMQVIST C, SAARTO T – Tamoxifen Treatment After Adjuvant Chemotherapy Has Opposite Effects on Bone Mineral Density in Premenopausal Patients Depending on Menstrual Status – J Clin Oncol 24 (2006) 675-680.
- 20) HILSENBECK SG, OSBORNE KC – Is There a Role for Adjuvant Tamoxifen in Progesterone Receptor – Positive Breast Cancer? An *In silico* Clinical Trial – Clin Cancer Res 12 Suppl 3 (2006) 1049-1055.
- 21) ZIDAN J, KEIDAR Z, BASHER W, ISRAEL O – Effects of tamoxifen on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women with early-stage breast cancer – Med Oncol 21 (2004) 117-121.
- 22) LOVE RR, MAZESS RB, BARDEN HS, EPSTEIN S, NEWCOMB PA, JORDAN CV, CARBONE PP, DEMETS DL - Effects of tamoxifen on bone mineral

density in postmenopausal women with breast cancer - N Engl J Med 326 (1992) 852-856

23) PERRIEN DS, ACHENBACH SJ, BLEDSOE SE, SUVA LJ, KHOSLA S, GADDY D – Bone turnover across the menopause transition: correlations with inhibins and follicle-stimulating hormone – J Clin Metab 91 (2006) 1848-1854.

24) RAPURI PB, GALLAGHER CJ, HAYNATZKI G – Endogenous Levels of Serum Estradiol and Sex Hormone Binding Globulin Determine Bone Mineral Density, Bone Remodeling, the Rate of Bone Loss, and Response to Treatment with Estrogen in Elderly Women – J Clin Metab 89 (2004) 4954-4962

25) GODERIE-PLOMP HW, KLIFT M, RONDE W, HOFMAN A, JONG HF, POLS APH – Endogenous Sex Hormones, Sex Hormone-Binding Globulin, and the Risk of Incident Vertebral Fractures in Elderly Men and Women: The Rotterdam Study – J Clin Endocrinol Metab 89 (2004) 3261-3269.

26) COSTA MAGALHÃES M – Novos Paradigmas na prevenção e tratamento dos distúrbios da menopausa – Saúde, Beleza – Qualidade de Vida (2003) 4-5.

27) 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 337 (1997) 670-676.

28) BLAND R – Steroid hormone receptor expression and action in bone – Clin Science 98 (2000) 217-240.

29) SOWERS M, RANDOLPH JF Jr, CRUTCHFIELD M, JANNAUSCH ML, SHAPIRO B, ZHANG B, LAPIETRA M – Urinary Ovarian and Gonadotropin Hormone Levels in Premenopausal Women with low bone Mass - J Bone Mineral Res 13 (1998) 1191-1202.

30) NORMAN AW - The Vitamin D Endocrine System - Physiologist 28 (1985) 219-231.

31) HALL JM, MACDONNEL DP – Coregulators in Nuclear Estrogen Receptor Action – Molecular Interventions 5 (2005) 343-357.

32) EASTELL R – Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche – J Endocrinol 185 (2005) 223-234.

33) KHOSLA S, MELTON LJ III, ATKINSON EJ, O’FALLON WM, KLEE GG, RIGGS L – Relationship of Serum Sex Steroid Levels and Bone Turnover Markers with Bone Mineral Density in Men and Women: A Key Role for Bioavailable Estrogen – J Clin Endocrinol Metab 83 (1998) 2266-2274.

- 34) HUNGRIA, VTM – Doença óssea em mieloma múltiplo – Rev Bras Hematol Hemoter 29 (2007) 60-66.
- 35) SYED Z, KHAN A, – Bone Densitometry: Applications and Limitations – J Obstet Gynaecol Can 24 (2002) 476-484.
- 36) KRAUSS SILVA L - Technology Assessment in Health Care: bone densitometry and alternatives therapeutical in post-menopausal osteoporosis - Cad Saude Publica 19 (2003) 987-1003.
- 37) COSTA AA – Osteoporose: Densitometria óssea, estudo metabólico, conduta terapêutica - Cromosete Gráfica e Editora Ltda - 1998.
- 38) WORLD HEALTH ORGANISATION – Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis, WHO Technical Report Series 843, Geneve (1994).
- 39) RIGGS BL & MELTON III LJ – The worldwide problem of osteoporosis: Insight afforded by epidemiology - Bone 17 Suppl (1995) 505S-511S.
- 40) KANNUS P, PARKKARI J, SIEVANEN H, HEINONEN A, VUORI I, JARVINEN M – Epidemiology of hip fractures - Bone 18 Suppl (1996) 57S-63S.
- 41) LAU EMC & WOO J – Osteoporosis in Asia - Advances in Nutritional Research 9 (1994) 101-108.
- 42) FAULKNER KG, VON STETTEN E, MILLER P – Discordance in patient classification using T-scores - J Clin Densitometry 2 (1999) 343-350.
- 43) LEWIN S, GOUVEIA CHA, MARONE MMS, WEHBA S, MALVESTITI LF, BIANCO AC - Densidade Mineral Óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal - Rev Ass Med Brasil 43 (1997) 127-136.
- 44) CUMMINGS SR, NEVITT MC, BROWNER WS, STONE K, FOX KM, ENSRUD KE, CAULEY J, BLACK D, VOGT TM – Risk Factors for Hip fracture in White women - N Engl J Med 332 (1995) 767-773.
- 45) LING X, CUMMINGS SR, MINGWEL Q, XIHE Z, XIOASHU C, NEVITT M, STONE K – Vertebral fractures in Beijing, China: The Beijing Osteoporosis Project - J Bone Min Res 15 (2000) 2019-2025.
- 46) JOHNELL O, GULLBERG B, KANIS J A, ALLANDER E, ELFFORS L, DEQUEKER J, DILSEN G, GENNARI C, LOPES-VAZ A, LYRITIS G, MAZZUOLI G, MIRAVET L, PASSERI M, PEREZ-CANO R, RAPADO A, RIBOT C – Risk factors for hip fractures in European women: The MEDOS study - J Bone Min Res 10 (1995) 1802-1815.

- 47) EDDY D, JOHNSTON C C, CUMMINGS S R, DAWSON-HUGHES B, LINDSAY R, MELTON III L J, SLEMEDA C W – Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis and treatment and cost-effectiveness analysis - Osteoporosis Int 8 Suppl 4 (1998) S1-S88.
- 48) GENANT HK, ENGELKE K, FUERST T, GLÜER C, GRAMPP S, HARRIS ST, JERGAS M, LANG T, LU Y, MAJUMDAR S, MATHUR A, TAKADA M – Noninvasive assessment of bone mineral and structure: State of art - J Bone Min Res 11 (1996) 707-730.
- 49) CHEN Z, MARICIC M, LUND P, TESSER J, GLUCK O – How the new Hologic hip normal reference values affect the densitometric diagnosis of osteoporosis - Osteoporosis Int 8 (1998) 423-427.
- 50) MUNDY GR, YONEDA T, HIRAGA T – Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates: impact on the bone microenvironment - Semin Oncol Suppl 6 (2001) 35-44.
- 51) RADSPIELER H – Individualized treatment of osteoporosis with medication: preventing fractures by increasing bone mineralization and quality - Int J Clin Rheumatol 5 (2010) 451-459.
- 52) MORTIMER J – Long-term Consequences of the Aromatase Inhibitors – Medscape Hematology-Oncology 8 (2005) Medscape.
- 53) BLAIN H, VUILLEMIN A, GUILLEMIN F, DURANT R, HANESSE B, DE TALANCE N, DOUCET B – Serum Leptin Level is a Predictor of Bone Mineral Density in Postmenopausal women - J Clin Endocrinol Metab 87 (2002) 1030-1035.
- 54) VIEIRA JGH – Considerações sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo ósseo e sua Utilidade Prática - Arq Bras Endocrinol Metab 43 (1999) 415-422.
- 55) AIRES, Margarida de Mello org – Fisiologia 3a Edição, Guanabara Koogan, (2008), Rio de Janeiro.
- 56) BARRAL D, BARROS AC, ARAÚJO RPC – Vitamina D: Uma abordagem Molecular - Pesq Bras Odontoped Clin Integr 7 (2007) 309-315.
- 57) VIEIRA IT, JORGETTI V, VIEIRA IO – Vitamina D e Análogos para o controle do Hiperparatireoidismo Secundário - J Bras Nefrol 30 Suppl 1 (2008) 32-37.
- 58) OOMS ME, ROOS JC, BEZEMER PD, VAN DER VIJGH WJF, BOUTER LM, LIPS P - Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial - J Clin Endocrinol Metab 80 (1995) 1052-1058.

- 59) REGINSTER JY - The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health - *Curr Med Res Opin* 21 (2005) 579-585.
- 60) CHAPUY MC, ARLOT ME, DUBOEU F - Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women - *N Engl J Med* 327 (1992) 1637- 1642.
- 61) TRABERT B, MALONE KE, DALING JR, DOODY DR, BERNSTEIN L, URSIN G, MARCHBANKS PA, STROM BL, HUMPHREY MC, OSTRANDER EA - Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a large population-based case-control study of Caucasian and African-American women - *Breast Cancer Res* 9 (2007) R84.
- 62) VANCHIERI C - Studies shedding Light on Vitamin D and Cancer - *J. Nat. Cancer Inst* 96 (2004) 735-736.
- 63) GUYTON KZ, KENSLER TW, POSNER GH - Vitamin D and Vitamin D Analogs as cancer Chemopreventive Agents - *Nutr Rev* 61 (2003) 227-238.
- 64) WELSH JE, WIETZKE JA, ZINSER GM, BYRNE B, SMITH K, NARVAEZ CJ - Vitamin D-3 Receptor as a Target for Breast Cancer Prevention - *J Nutr* 133 (2003) 2425S- 2433S.
- 65)ROBSAHM TE, TRETLI S, DAHLBACK A, MOAN J - Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast-, colon- and prostate cancer - *Cancer Causes Control* 15 (2004) 149–158.
- 66) PEEHL DM, SKOWRONSKI RJ, LEUNG GK, WONG ST, STAMEY TA, FELDMAN D - Antiproliferative Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Primary Cultures of Human Prostatic Cells - *Cancer Res* 54 (1994) 805-810.
- 67) GIOVANNUCCI E - The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States) - *Cancer Causes Control* 16 (2005) 83–95.
- 68) LIPKIN M, NEWMARK HL - Vitamin D, Calcium and Prevention of Breast Cancer: a review - *J Am College Nutr* 18 (1999) 392S-397S.
- 69) MEHTA RG, MORIARTY RM, MEHTA RR, PENMASTA R, LAZZARO G, CONSTANTINOU A, GUO L - Prevention of Preneoplastic Mammary Lesion Development by a Novel Vitamin D Analogue, 1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D5 - *J Nat Cancer Inst* 89 (1997) 212-218.
- 70) ZINSER GM, WELSH JE – Vitamin D receptor status alters mammary gland morphology and tmorigenesis in MMTV-neu mice - *Carcinogenesis* 25 (2004) 2361-2372.

71) WELSH JE, WIETZKE JA, ZINSER GM, SMYCZEK S, ROMU S, TRIBBLE E, WELSH JC, BYRNE B, NARVAEZ CJ – Impact of the Vitamin D3 Receptor on growth regulatory pathways in mammary gland and breast cancer – J Steroid Biochem Mol Biol 83 (2002) 85-92.

72) WELSH JE - Vitamin D and breast cancer: insights from animal models - Am. J. Clin. Nutr 80 (2004) 1721S-1724S.

73) BANDEIRA F, GRIZ L, FREESE E, CASTRO LIMA D, THÉ AC, DINIZ ET, MARQUES TF, LUCENA CS - Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics - Arq Bras Endocrinol Metab 54 (2010) 227-232

74) RUCKER D, ALLAN JA, FICK GH, HANLEY DA- Vitamin D Insufficiency in a population of healthy westerns Canadians - Can Med Ass J 166 (2002) 1517-1524.

## **Anexos**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: *“Dosagens séricas de Vitamina D e Cálcio como fatores preditivos do status da massa mineral óssea em mulheres em uso de inibidores de aromatase e tamoxifeno: estudo comparativo”*

Nome do Pesquisador: Ana Karina Bartmann.

Nome do Orientador: Prof. Dr. João Francisco Marques Neto

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Aceito participar do estudo proposto no qual fornecerei informações sobre o risco de perda de massa óssea durante o tratamento com tamoxifeno ou inibidor da aromatase por meio de densitometrias ósseas e amostras de sangue a serem colhidas em uma veia dos braços (volume 10 ml). Estou ciente de que estes exames serão utilizados para a avaliação do risco de diminuição da massa óssea. Estou ciente também de que não terei prejuízos com a realização destes exames e de que serei avisada por carta ou telefone dos resultados. Essa é uma área em grande evolução na Medicina, portanto, caso existam, amostras a mais de sangue poderão ser armazenadas por meio de congelamento no mesmo laboratório onde for realizada a coleta. Estou ciente de que a utilização desse material em qualquer outro estudo deverá ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa,

- por isso aceito que o excesso de material colhido seja armazenado.
- no entanto, não desejo que o material doado seja armazenado.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar meu atendimento. Continuarei a receber a medicação para meu tratamento da maneira habitual, caso esse seja o caso (pelo SUS, plano de saúde ou seguradora de saúde). Meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Ana Karina Bartmann no endereço abaixo ou nos telefones: (16) 3941-5121 ou (16) 3421-3858. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da UNICAMP (19) 3521-8936. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

---

Assinatura da Paciente ou Responsável Legal

---

Dra. Ana Karina Bartmann (Pesquisadora Responsável)

**Pesquisadora Responsável (Dra. Ana Karina Bartmann):**

**Tels. (16) 3941-5121 / (16) 3421-3858 / (16) 9154-9737**

**Endereço: Rua Altino Arantes, 529 – casa 22 – Ribeirão Preto – SP – CEP 14025-030**

E-mail: [anabartmann@uol.com.br](mailto:anabartmann@uol.com.br)

## **Artigo Publicado**

TITLE: Blood measures of vitamin D are an effective way to follow bone mass reduction of women in treatment for breast cancer with aromatase inhibitors

### AUTHORS:

Ana K. Bartmann, MD

Service of Rheumatology – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Rua Alexander Fleming, 181, Caixa Postal 6111, CEP 13084-971 - Campinas, SP – BRAZIL

Clínica ana bartmann – Rua Altino Arantes, 529 – casa 22 – CEP 14025-030 - Ribeirão Preto – SP – tel: 55 (16) 3941-5121

e-mail: [anabartmann@uol.com.br](mailto:anabartmann@uol.com.br)

Jadson L. S. Marcelino

Disciplin of Statistics – Universidade Federal de São Carlos (UFScar) - Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP – BRAZIL

e-mail: jadson.estadistica@gmail.com

Pr. João Francisco Marques Neto, MD, PhD

Service of Rheumatology – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Rua Alexander Fleming, 181, Caixa Postal 6111, CEP 13084-971 - Campinas, SP – BRAZIL

e-mail: clinmarquesneto@terra.com.br

### CORRESPONDING AUTHOR:

Ana K. Bartmann

Rua Altino Arantes, 529 – casa 22 – CEP 14025-030

Ribeirão Preto – SP – Brazil

Tels/Fax: 55 (16) 3941-5121 and 55 (16) 3236-1440

## ABSTRACT

**Introduction:** The use of aromatase inhibitors for long term treatment of patients with positive hormonal receptors breast cancer has been considered a good way to control the disease in terms of recurrence and local/ distant metastasis. Unfortunately however, aromatase inhibitors can reduce severely the mineral bone mass. Because of this fact, nowadays it has been considered of utmost importance to perform bone densitometries and collect samples of blood bone quality markers in the follow up of these patients. Vitamin D is of special interest in terms of cancer, since it could be good predictor of the development not only of osteoporosis but also of bone metastasis and tumoral recurrence in the breast.

**Material and Methods:** We compared levels of blood vitamin D and bone mineral density of 80 patients using aromatase inhibitors and 67 patients using tamoxifen (control group) in order to verify the relation between both variables. Patients were stratified by time of medication use: <1 year, 1-2 years, 2-3 years, 3-4 years and 4-5 years. Twenty-one patients with low BMD and similarly low values of blood vitamin D were treated with oral vitamin D supplementation 800 IU per day dose for 1 year. Values of BMD before and after treatment were compared.

**Results:** Aromatase inhibitors users have smaller BMD (p value = 0.0162) as well as lower levels of vitamin D (p value = 0.0001) in comparison to the control group. Groups presented distinct correlation values for the variables vitamin D and BMD. As expected, the control group showed a significant correlation (r = 0.633 with p-value = 0.000). The group of aromatase inhibitors users presented a low correlation coefficient (r = 0.287 with p-value = 0.01), which was explained by a greater decrease in the values of vitamin D in time when compared to the decrease in BMD. Finally we notice a significant difference between BMD values before and after one-year treatment with vitamin D.

**Conclusion:** We suggest that women in treatment with aromatase inhibitors who have low vitamin D levels receive dietary supplements of it, whether or not they have osteopenia or osteoporosis. Despite the fact that there is no protocol for breast cancer prevention with dietary supplements of vitamin D, we also suggest that women with high risk for breast cancer should undergo blood measurements of vitamin D and receive supplements if blood samples show low levels of it.

**KEYWORDS:** aromatase inhibitors, breast cancer, vitamin D, osteoporosis, bone mineral density

## 1. INTRODUCTION

The use of aromatase inhibitors in long term treatment of patients with positive hormonal receptors breast cancer has been considered a good way to control the disease in terms of recurrence and local/ distant metastasis [1, 2, 3]. The action mechanism of this class of drugs – as the name shows – is based on the peripheral blockage of adrenal hormones conversion into estrogen. Not only the androstenedione way but also the testosterone way have estrogen as final result of aromatase action. In the case of menopause patients or those who were submitted to surgical castration the only possible estrogenic stimulation will be the peripheral conversion of adrenal hormones since ovarian hormones do not exist. This is why the use of aromatase inhibitors is well indicated for this group of patients [1, 2].

Unfortunately however, it has been noticed that aromatase inhibitors have a potentially severe side effect which is the reduction of the mineral bone mass [1, 2, 4, 5, 6]. Some authors have even questioned the indication of its use, since bone depletion could be really severe [2, 5]. It must be realized, however, that aromatase inhibitors are great agents capable of reducing the risk of recurrence (local and distant metastasis) and are superior to tamoxifen in terms of disease-free survival [1, 4, 7]. What causes depletion is the almost complete reduction of estrogens and their action on bones, associated with the fact that the majority of women are postmenopausal [8, 9].

The action of estrogen in bone remodeling is based on the reduction of the number of osteoclast and its activation. The effects on osteoclast are probably indirectly mediated by products secreted by osteoblast which modulate the action of mature osteoclasts and their apoptosis frequency. Moreover, estrogen receptors ( $\alpha$  and  $\beta$ ) have been identified in osteoblasts and on the surface of trabecular bone [4]. Since low levels of blood estrogen clearly influence bone turnover and are related to trabecular bone loss, it is not surprising that the bone mass would be affected when menopause patients use aromatase inhibitors.

Because of this fact, it has been recently considered of utmost importance to perform bone densitometries as a method of evaluation and follow up of patients using this

class of drugs [3, 10]. Moreover, some authors have postulated the necessity of collecting serial samples of blood bone quality markers [3, 5]. This is how vitamin D has shown to be useful. First because the normal bone development needs normal levels of vitamin D since it modulates the expression of a variety of osteoblasts genes and the differentiation of osteoblasts, and secondly because in terms of breast cancer itself there is a reduction of tumoral cells in women with normal vitamin D levels due to its own anti-proliferation action [7, 11, 12, 13].

### *1.1 The role of Vitamin D*

Vitamin D is of special interest in terms of cancer, since many authors have pointed a relation between low levels of vitamin D and tumors such as those of prostate and of breast [14, 15, 16, 17, 18, 19]. It is now acknowledged that vitamin D receptors exert effects in almost every tissue in the body, including endocrine glands, affecting proliferation, differentiation, and apoptosis of normal and abnormal cells.

Vitamin D can be provided by sun exposure or by diet. Whatever the source of vitamin D, it is converted into 25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub> in the liver and stored in adipose cells [20]. As vitamin D functions are related to its action on its receptor (called VDR – vitamin D receptor) and 25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub> cannot bind to VDR, it is only after conversion by 1 $\alpha$  hydroxylase into 1,25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub> in the kidneys that it will act in the whole body [14,15,16,17]. Normal mammary cells also express 1 $\alpha$  hydroxylase, which converts 25(OH) D<sub>3</sub> into 1,25(OH) D<sub>3</sub>. Since 1,25 (OH) D<sub>3</sub> – and not 25(OH) D<sub>3</sub> - inhibits transformed mammary epithelial cells growth, it is necessary to measure this type of vitamin D in the blood [13, 14, 17]. Breast cells have VDR in their cores, so it has been supposed that vitamin D plays a role in breast cancer cells by activating apoptosis and reducing IGF 1, which reduces the activation of malignant cells [17, 21, 22] – Figure 1.

Since the majority of women who take aromatase inhibitors for breast cancer treatment are postmenopausal, low vitamin D levels are very frequently observed. Older women synthesize less vitamin D from dehydrocholesterol in the skin and estrogen deficiency reduces the expression of vitamin D receptor and also its metabolic activation [17]. Besides, the incidence of breast cancer increases with age and about three-quarters of the affected women are postmenopausal [8].

Ultimately, blood levels of vitamin D (1,25 OH vitamin D3) could be good predictor of the development not only of osteoporosis – due to its relation with the mineral bone status - but also of bone metastasis and tumoral recurrence in the breast, as far as optimal vitamin D status may protect against mammary transformation and disease progression. This is important for women with estrogen blockage since hormonal markers are irrelevant in those cases.

Finally, we focused on determining the profile of aromatase inhibitors users in terms of BMD, vitamin D and calcium and defining the effects of oral vitamin D supplementation in these patients. We tested the following hypothesis: 1- Users of aromatase inhibitors have lower bone mineral mass compared to the control group; 2-Users of aromatase inhibitors have lower values of vitamin D compared to the control; 3- There is a correlation between values of vitamin D and BMD, ie, a decrease in vitamin D is followed by a decrease in bone mineral density and 4- Use of vitamin D supplementation changes bone mineral mass of patients in use of aromatase inhibitors.

## 2. MATERIAL AND METHODS

To study the effects of vitamin D on bone density of patients using aromatase inhibitors we prospectively studied 147 patients with positive hormonal receptors breast cancer in terms of mineral bone status, calcium and vitamin D. All patients met the following inclusion criteria: 1) had undergone previous surgical treatment; 2) had indication for long-term hormone therapy. Non inclusion criteria were: 1) prior bone disease such as osteoarthritis or bone metastases; 2) use of medications which interfere in bone physiology such as corticosteroids, vitamin D, calcium supplements and bisphosphonates.

### *2.1. Groups design*

We divided patients in two groups: the aromatase inhibitors group was composed by 80 patients using only anastrozole 1mg per day. To minimize bias, other types of aromatase inhibitors were not considered for this study. The control group was composed by 67 patients using only tamoxifen 10mg per day. As known, tamoxifen does not have a

negative effect on bone density, so we considered this group as a control group. All patients included in the study were matched for age and had no other diseases. Both groups were then stratified by time of medication use into 5 groups: 0-12 months (<1 year), from 13 to 24 months (1-2 years), 25-36 months (2-3 years), 37-48 months (3-4 years) and 49-60 months (4-5 years). All patients underwent laboratory evaluation consisted of blood calcium and vitamin D tests (1,25 OH vitamin D), and 24 hours urine calcium test as well as radiologic evaluation consisted of bone densitometry (DEXA). All examinations were performed in the same laboratory and at the same clinic with the same radiological densitometer (Lunar Prodigy Primo™, 2008 - GE Health Care, USA) and analyzed by a single physician.

The values obtained were recorded according to time of drug use. The considered values for bone densitometry analysis were the bone mineral density (BMD) of the right femoral neck and lumbar spine. All results were recorded in numeric form (value of bone mineral density in g/cm<sup>3</sup>) and not just classified as normal or not. This allowed us to calculate averages, so we calculated the average values for each variable in all subgroups: femoral neck BMD, lumbar spine BMD, blood calcium, blood vitamin D and urine calcium. Groups were homogeneous in regard to age.

All subjects signed an informed consent form prior to participation in this study. This study was conducted from January 2009 to October 2011 with the consent of the Institutional Review Board.

## *2.2. Treatment with Vitamin D*

In a second step, we selected all patients whose bone densitometry results showed values of low BMD associated with similarly low values of blood vitamin D. To those patients we proposed oral vitamin D supplementation (without calcium) 800 IU per day dose for 1 year. Most patients at this point received also a prescription of bisphosphonates from their doctors, so they were automatically excluded. From 98 patients selected, only 21 followed our protocol. Our aim was to correlate the results of bone densitometry before and after supplementation with vitamin D, even during the use of aromatase inhibitors, to see if

there was a protective effect of short-term vitamin D supplementation for patients with breast cancer.

### 3. THEORY / CALCULATION AND RESULTS

In this study, for each of the hypotheses, we conducted separate statistical methodologies. Main data of each group is shown in table 1.

Hypothesis 1: Users of aromatase inhibitors have lower bone mineral mass compared to the control group (tamoxifen users). To test this hypothesis we used to compare mean BMD in the groups as a whole, not considering the variations of values in time. The measure of central tendency used was the average of the measured variables and the variability was the standard deviation for all data. The Shapiro-Wilk test showed that both vitamin D and BMD have a normal distribution, which allows us to use the t-test for comparison of two independent variables. The mean BMD between the groups were statistically different at a significance level of 5% (p value = 0.0162), so that we can conclude that users of aromatase inhibitors have smaller DMOs in comparison to the control group.

Hypothesis 2: Users of aromatase inhibitors have lower values of vitamin D compared to the control group (tamoxifen users). As we did earlier to test hypothesis 1, we also compared averages of vitamin D in groups as a whole, not considering the variations in time, using the t-test. As a result we found that users of aromatase inhibitors have lower levels of vitamin D when compared to the control group (p value = 0.0001 at a significance level of 5%).

Hypothesis 3: There is a correlation between values of vitamin D and BMD, ie, a decrease in vitamin D is followed by a decrease in bone mineral density. In order to test the actual existence of a relationship between BMD values measured by bone densitometry and serum vitamin D, we initially took only the control group that supposedly has no change in bone mass, calculating the Pearson correlation coefficient between variables. To make a scatter plot of femoral neck BMD values versus vitamin D values, we did not take into consideration the time of drug use, since tamoxifen has no negative effect on bone mineral mass.

As presumed, groups presented distinct correlation values for the variables vitamin D and BMD. As expected, the control group showed a significant correlation ( $r = 0.633$  with  $p\text{-value} = 0.000$ ), demonstrating that as the levels of vitamin D increase, patients' BMD also increases – Figure 2.

Unlike the initial hypothesis, the group of aromatase inhibitors users presented a correlation coefficient of 0.287 with a  $p\text{-value}$  of 0.01, which means that the correlation is low but significant at a confidence level of 5% - Figure 3. Although the decrease in the mean values obtained at each time point for each variable seems obvious (Figure 4), the correlation between femoral neck BMD and vitamin D was low. This could be explained by a greater decrease in the values of vitamin D in time when compared to the decrease in BMD, since, unlike the control group; there is a cumulative effect of the use of anastrozole on bone mineral mass. To test this hypothesis which could explain the low correlation between the variables we compared the decrease rates of each variable in time. The slope coefficient of the lines for each variable allows us to make comparisons between the decreases. Figure 5 represents these decreases by time of drug use: 1-2 years, 2-3 years, 3-4 years and 4-5 years.

The evaluation of averages' decreases requires attention because it can lead us to believe that in some instances the variables increase. In fact what is seen from the graphs is that from one year of aromatase inhibitor use onwards there is a more pronounced decrease in the amounts of vitamin D in relation to BMD values, although both decrease in absolute terms. The decrease of vitamin D remains with the strongest inclination in relation to the fall of BMD from 2 years of drug use onwards, but it stabilizes from three years onwards. It is from 4 years of use of anastrozole onwards that the decrease in BMD becomes really important and outweighs the fall of vitamin D.

Hypothesis 4 – Use of vitamin D supplementation changes bone mineral mass of patients in use of aromatase inhibitors. To test this hypothesis, we compared BMD mean values before and after treatment with vitamin D supplements alone. We compared the means of paired observations by contrast vectors. With the mean difference vector equal to -0.0233 (confidence interval of -0.041816 to -0.004784) and  $p\text{-value}$  of 0.0014361, we notice a significant difference between BMD values before and after treatment with vitamin D alone, considering normal vitamin D levels above 30ng/ml at a significance level of 5%.

#### 4. DISCUSSION

The use of vitamin D as a disease prevention factor has been suggested by several authors for the treatment of many diseases, including many types of cancer [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. In the specific case of breast cancer, and especially in patients taking aromatase inhibitors, the use of vitamin D supplements could be interesting for its anti-proliferative action and also for its positive action on bone mass, preventing osteoporosis. In the case of its anti-proliferative effect, it is supposed that vitamin D plays a role in the prevention of tumor growth and metastases by acting as a hormone in all vitamin D nuclear receptors spread throughout the body, especially in target organs [11, 12, 14, 16, 17, 19, 23]. In the specific case of breast cancer further studies are necessary to establish this relationship regarding mainly bone metastases. The discovery that the breast tissue expresses an alpha-hydroxylase enzyme has raised the hypothesis that 1,25-OH vitamin D may act by a paracrine way. The anti-proliferative site of vitamin D would be, in the hypothesis, tissue-specific and could not be detected in peripheral blood. Thus, 25-OH-vitamin D and not 1,25-OH-vitamin D would become the metabolite to be measured, because it maintains the expression of the gene which mediates the expression of the receptor (VDR) in mammary cells. In this sense, a more comprehensive assessment would require the dosage of both forms of vitamin D [16, 17, 21].

Whichever is the way of vitamin D action in preventing tumor progression, further studies are necessary to establish a protocol to introduce vitamin D as another therapeutic weapon for patients with cancer. Regarding the prevention of osteoporotic fractures, however, our study clearly shows that its use improves bone mineral mass even in a short period of time and should be indicated for patients using aromatase inhibitors, especially when vitamin D in blood is less than 30ng/ml. Many studies have already shown that treatment with oral vitamin D improves BMD [24, 31, 32]. This correlation is now well established for patients using aromatase inhibitors.

Our study showed that patients in use of aromatase inhibitors have lower vitamin D levels in comparison to the control group, thus there may be a relationship between low levels of estrogen and vitamin D. A deficiency of estrogen reduces the metabolic activation of vitamin D and its receptor expression in the nucleus [17], but it is likely that there are

other links between the two substances. To what extent estrogen could modulate vitamin D action is still unclear. Still, even in a low estrogen environment - as is the case of patients treated with aromatase inhibitors - oral supplementation with vitamin D alone improved bone mineral mass.

In our study, although several patients had achieved clinical criteria to use vitamin D - due to low serum vitamin and bone densitometry results showing osteopenia and/or osteoporosis – only 21 participated in the second phase of the project which consisted in a comparison of the bone densitometry before and after 12 months of treatment with vitamin D supplement. This was largely due to the severity of bone loss that in some cases resulted in the prescription of bisphosphonates. Most oncologists did not accept to prescribe only vitamin D because they presumed the risk of bone fracture was high and the evidence of the efficacy of vitamin D supplementation was limited [24]. Many other controlled clinical trials of calcium and vitamin D supplementation in postmenopausal women showed a reduction of bone loss during the first year of treatment already [25]. We tested this effect in women taking aromatase inhibitor in order to verify if the improvement in bone mass could overcome the negative effects of the hormone therapy. As a result, we found an increase in BMD after one year treatment with vitamin D even in a small sample of individuals taking anastrozole. The positive effect of vitamin D supplementation was demonstrated by bone densitometry. Bone biopsies - which were not performed in this study – would be capable to microscopically evaluate the real extent of vitamin D action in the bone in a low estrogen environment.

The use of vitamin D supplements by patients using aromatase inhibitors may improve breast cancer treatment, but also raise follow up costs. This study did not assess the cost of treatment with vitamin D, but as compared to the cost of hormone therapy, bisphosphonates and clinical/surgical treatment of osteoporotic fractures [25], it is considered to be low. Therefore, it seems reasonable to take into consideration the use of vitamin D supplements as an excellent prophylactic policy for osteoporosis related damages.

Interestingly we found a majority of patients whose vitamin D levels were low or borderline, even in the group taking tamoxifen. Although the values of vitamin D were higher in the control group (which were also consistent with higher BMD values in this

group), we found, in general, individuals with low to low/normal vitamin D levels. This can be interpreted as a chronic deficiency of vitamin D in the Brazilian population, even in a country with a high level of insolation. These data are consistent with previous studies that also show low levels of vitamin D in the Brazilian and global population [26, 27, 28].

A relevant question that came up during the research concerned the formation of the control group. We chose patients taking tamoxifen as a control group because they had the same type of cancer, they also needed to block estrogen action in the breast and finally, they had the same age profile. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator (SERM) seemed to be the best choice since it does not cause depletion of bone mineral mass. However, some studies controversially suggest that, with time, the use of tamoxifen may have a positive effect on bone tissue and possibly improve the bone mineral mass [29]. In such case, the comparison might not have been ideal, since the effects of tamoxifen and anastrozole are opposite and the control group may have had higher BMD levels than the general population.

In this study we performed calcemia and calciuria exams together with dosages of blood vitamin D. Those exams were performed to rule out metabolic and bone diseases which could change vitamin D and/or BMD values and create confusion during data analysis. In regard to bone densitometries, we decided to use only one BMD measure in order to facilitate statistical analysis. The BMD of the femoral neck was chosen because it is the best place for bone mass assessment. Many patients who have espondiloarthritis have also an increase in bone mineral density related to the sclerosis of disc surfaces and articular facets of the lumbar spine, but no increase in mineral density of spongy bone inside the vertebral body. This leads to the misinterpretation that the bone mass is preserved when in fact it can have a severe degree of bone loss [10, 30]. Thus, lumbar spine BMD measurements were analyzed only to corroborate the values determined for the femoral neck and were not taken into account during analysis.

## 5. CONCLUSION

We suggest that women in treatment with aromatase inhibitors who have low vitamin D levels should receive dietary supplements of it, whether or not they have osteopenia or osteoporosis. Despite the fact that there is no protocol for breast cancer

prevention with dietary supplements of vitamin D, we also suggest that women with high risk for breast cancer should undergo blood measurements of vitamin D and receive supplements if blood samples show low levels of it.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to Pr Diniz and Pr Maria Aparecida who helped with statistical analysis, as well as to Mrs Wania Pereira Lopes who did the corrections in the text. We also thank to Dr Luiz Mario Labadessa and all staff of Documenta Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem for the support.

#### REFERENCES

- [1] K. Altundag, N.K. Ibrahim, Aromatase Inhibitors in Breast Cancer: An Overview, *Oncologist* 11 (2006) 553-562.
- [2] J. Mortimer, Long-term Consequences of the Aromatase Inhibitors, *Medscape Hematol. Oncol.* 8 (2005).
- [3] The ATAC (Arimidex, Tamoxifen alone or in combination) Trialists Group, Anastrozole Alone or in Combination with Tamoxifen versus Tamoxifen Alone for Adjuvant Treatment of Postmenopausal Women with Early-Stage Breast Cancer, *Am. Cancer Soc.* 98 (2003) 1802-1810.
- [4] A.S. Coates, A. Keshaviah, B. Thurlimann, H. Mauridsen, L. Mauriac, J.F. Forbes, R. Paridaens, M. Castiglione-Gertsch, R.D. Gelber, M. Colleoni, I. Láng, L. Del Mastro, I. Smith, J. Chirgwin, J.M. Nogaret, T. Pienkowski, A. Wardley, E.H. Jakobsen, K.N. Price, A. Goldhirsch, Five years of Letrozole compared with Tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 486-492.
- [5] P.E. Goss, P. Hadji, M. Subar, P. Abreu, T. Thomsen, J. Banke-Bochita, Effects of Steroidal and Nonsteroidal Aromatase Inhibitors on Markers of Bone Turnover in Healthy Postmenopausal Women, *Breast Cancer Res.* 9 (2007) 1-14.

- [6] L. B. Michaud, S. Goodin, Cancer-Treatment –Induced Bone Loss, Part 2, *Am. J. Health-Sys. Pharm.* 63 (2006) 534-546.
- [7] S.G. Hilsenbeck, C.K. Osborne, Is there a role for adjuvant Tamoxifen in Progesterone Receptor-positive Breast Cancer? An In silico Clinical Trial, *Clin Cancer Res* 12 (2006) 1049-1055.
- [8] R. Jakesz, W. Jonat, M. Gnant, M. Mittlboeck, R. Greil, C. Tausch, J. Hilfrich, W. Kwansny, C. Menzel, H. Samonigg, M. Seifert, G. Gademann, M. Kaufmann, Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial, *Lancet* 366 (2005) 455-462.
- [9] V.M. Oliveira, J.M. Aldrighi, J.F. Rinaldi, Quimioprevenção do câncer de mama, *Rev. Assoc. Med Bras.* 56 (2006) 453-459.
- [10] Z. Syed, A. Khan, Bone Densitometry: Applications and Limitations, *J. Obst. Gyn. Can.* 24 (2002) 476-484.
- [11] E. Giovannucci, The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States) - *Cancer Causes Control* 16 (2005) 83–95.
- [12] M. Lipkin, H. L. Newmark, Vitamin D, Calcium and Prevention of Breast Cancer: a review, *J. Am. College Nutr.* 18 (1999) 392S-397S.
- [13] J. Welsh, Vitamin D and breast cancer: insights from animal models, *Am. J. Clin. Nutr.* 80 (2004) 1721S-1724S.
- [14] B. Trabert, K. E. Malone, J. R. Daling, D. R. Doody, L. Bernstein, G. Ursin, P. A. Marchbanks, B. L. Strom, M. C. Humphrey, E. A. Ostrander, Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a large population-based case-control study of Caucasian and African-American women, *Breast Cancer Res.* 9 (2007).
- [15] C. Vanchieri, Studies shedding Light on Vitamin D and Cancer, *J. Nat. Cancer Inst.* 96 (2004) 735-736.
- [16] K. Z. Guyton, T. W. Kensler, G. H. Posner, Vitamin D and Vitamin D Analogs as cancer Chemopreventive Agents, *Nutr. Rev.* 61 (2003) 227-238.

- [17] J. Welsh, J.A. Wietzke, G.M. Zinser, B. Byrne, K. Smith, C.J. Narvaez, Vitamin D-3 Receptor as a Target for Breast Cancer Prevention, *J. Nutr.* 133 (2003) 2425S- 2433S.
- [18] T.E. Robsahm, S. Tretli, A. Dahlback, J. Moan, Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast-, colon- and prostate cancer, *Cancer Causes Control* 15 (2004) 149–158.
- [19] D.M. Peehl, R.J. Skowronski, G.K. Leung, S.T. Wong, T.A. Stamey, D. Feldman, Antiproliferative Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Primary Cultures of Human Prostatic Cells, *Cancer Res.* 54 (1994) 805-810.
- [20] A. W. Norman, The Vitamin D Endocrine System, *Physiologist* 28 (1985) 219- 231.
- [21] R. G. Mehta, R.M. Moriarty, R. R. Mehta, R. Penmasta, G. Lazzaro, A. Constantinou, L. Guo, Prevention of Preneoplastic Mammary Lesion Development by a Novel Vitamin D Analogue, 1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin D5, *J. Nat. Cancer Inst.* 89 (1997) 212-218.
- [22] S. E. Hankinson, W. C. Willett, G. A. Colditz, D. J. Hunter, D. S. Michaud, B. Deroo, B. Rosner, F. E. Speizer, M. Pollak, Circulation concentrations of insulin-like growth factor I and risk of breast cancer, *Lancet* 351 (1998) 1393-1396.
- [23] R. Bland, Steroid hormone receptor expression and action in bone, *Clin Science* 98 (2000) 217-240.
- [24] B. Dawson-Hughes, S. S. Harris, E. A. Krall, G. E. Dallal, Effect of Calcium and Vitamin D Supplementation on Bone Density in Men and Women 65 years of age or older, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 670-676.
- [25] L. Krauss Silva, Technology Assessment in Health Care: bone densitometry and alternatives therapeutical in post-menopausal osteoporosis, *Cad Saude Publica* 19 (2003) 987-1003.
- [26] J. Y. Reginster, The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health, *Curr. Med. Res. Opin.* 21 (2005) 579-585.
- [27] D. Rucker, J.A. Allan, G.H. Fick, D.A. Hanley, Vitamin D Insufficiency in a population of healthy westerns Canadians, *Can. Med. Ass. J.* 166 (2002) 1517-1524.

- [28] F. Bandeira, L. Griz, E. Freese, D. Castro Lima, A.C. Thé, E.T. Diniz, T.F. Marques, C.S. Lucena, Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics, *Arq Bras Endocrinol Metab* 54 (2010) 227-232.
- [29] R. R. Love, R. B. Mazess, H. S. Barden, S. Epstein, P.A. Newcomb, V. C. Jordan, P.P. Carbone, D. L. DeMets, Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 326 (1992) 852-856.
- [30] S. Lewin, C.H.A. Gouveia, M.M.S. Marone, S. Wehba, L.F. Malvestiti, A.C. Bianco, Densidade Mineral Óssea vertebral e femoral de 724 mulheres brancas brasileiras: influência da idade e do peso corporal, *Rev. Ass. Med. Brasil.* 43 (1997) 127-136.
- [31] M. E. Ooms, J.C. Roos, P.D. Bezemer, W.J.F. Van der Vijgh, L.M. Bouter LM, P. Lips, Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women: a randomized double-blind trial, *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995) 1052-1058.
- [32] M. C. Chapuy, M. E. Arlot, F. Duboeuf, Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women, *N Engl J Med* 327 (1992) 1637- 1642.

## ILLUSTRATIONS AND TABLES

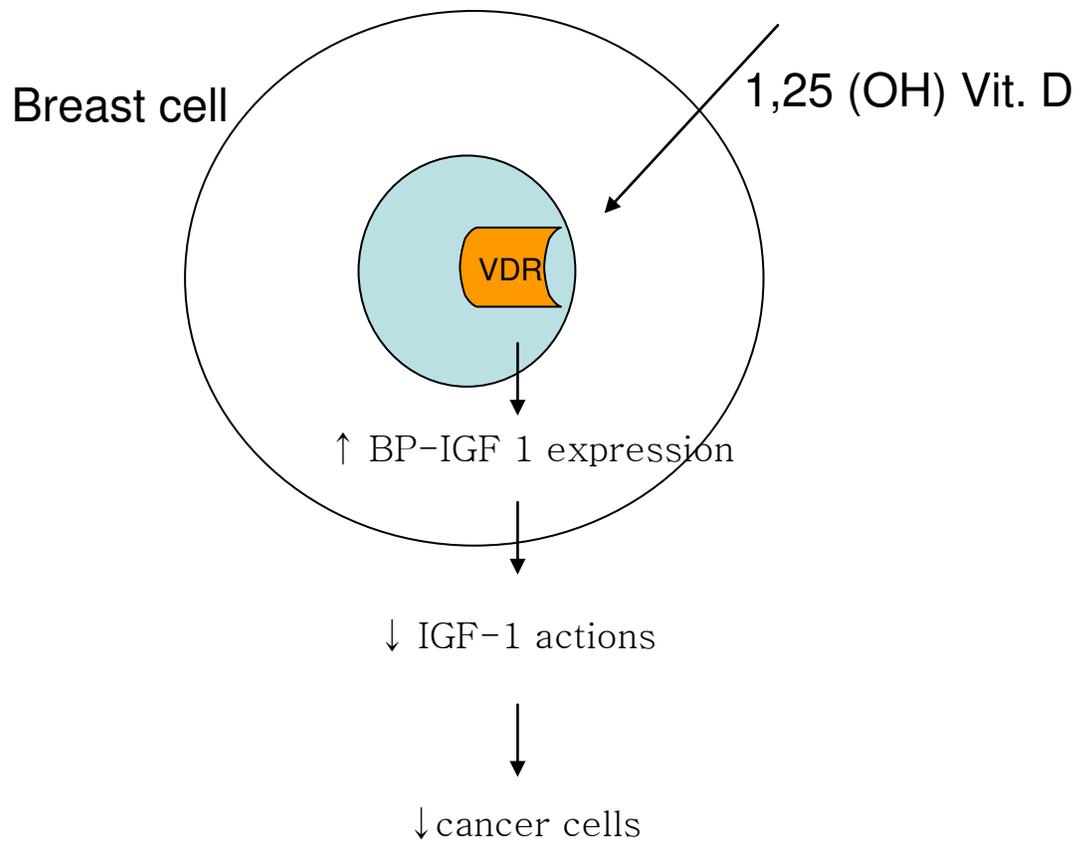


Figure 1 – Vitamin D action on breast cells

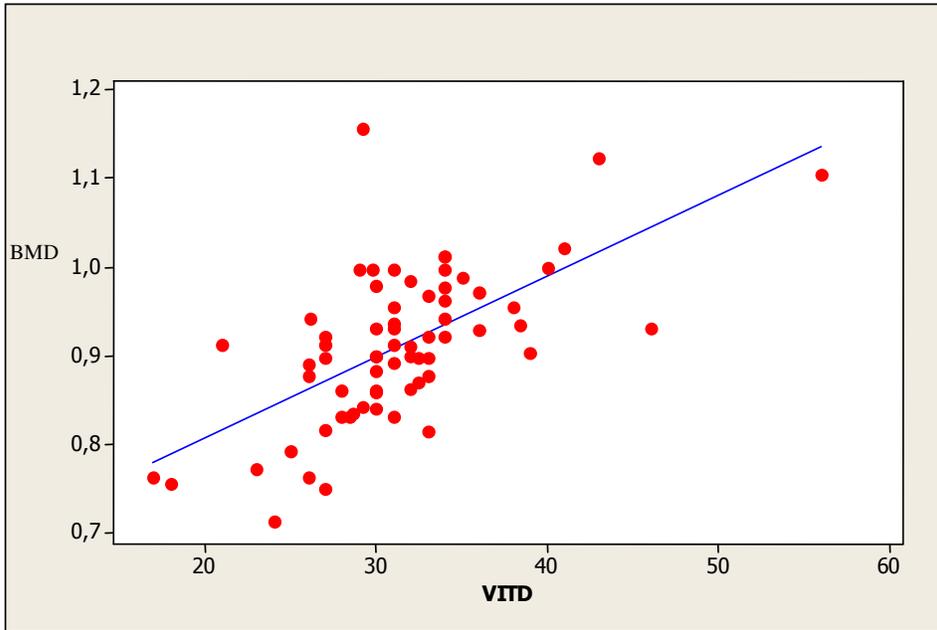


Figure 2 – Correlation between femoral neck bone mineral density (BMD) values (g/cm<sup>3</sup>) and blood 1,25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub> levels (pg/ml) of tamoxifen users.

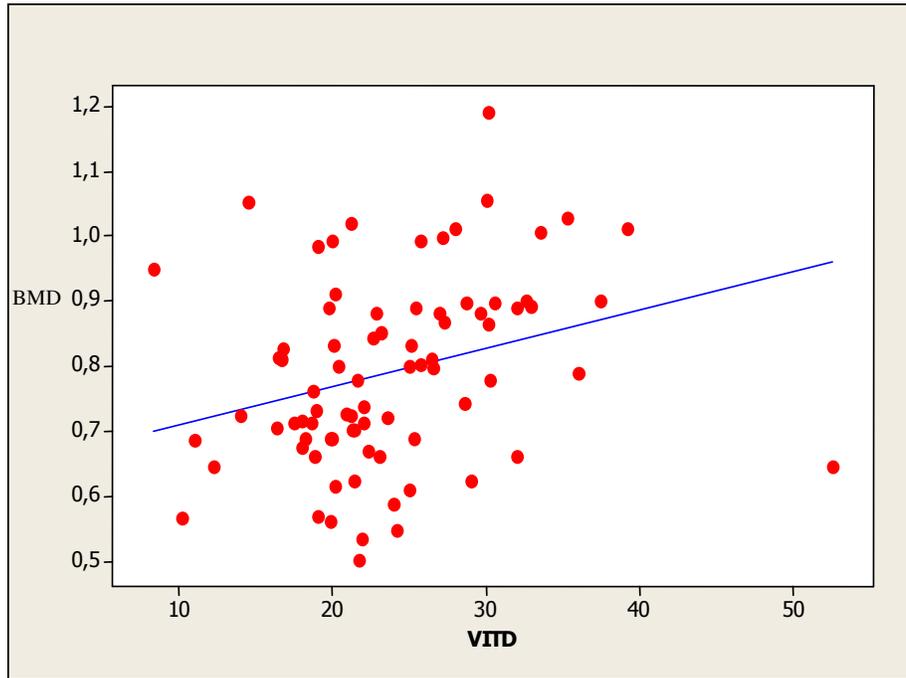


Figure 3 – Correlation between femoral neck bone mineral density (BMD) values (g/cm<sup>3</sup>) and blood 1,25 (OH) Vitamin D<sub>3</sub> levels (pg/ml) of anastrozole users.

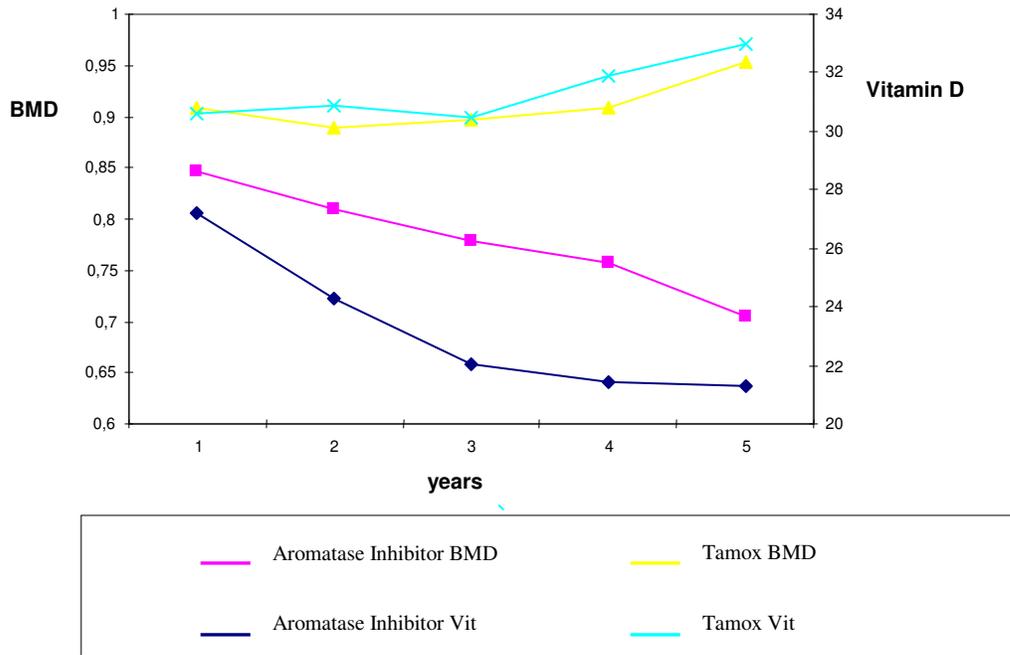
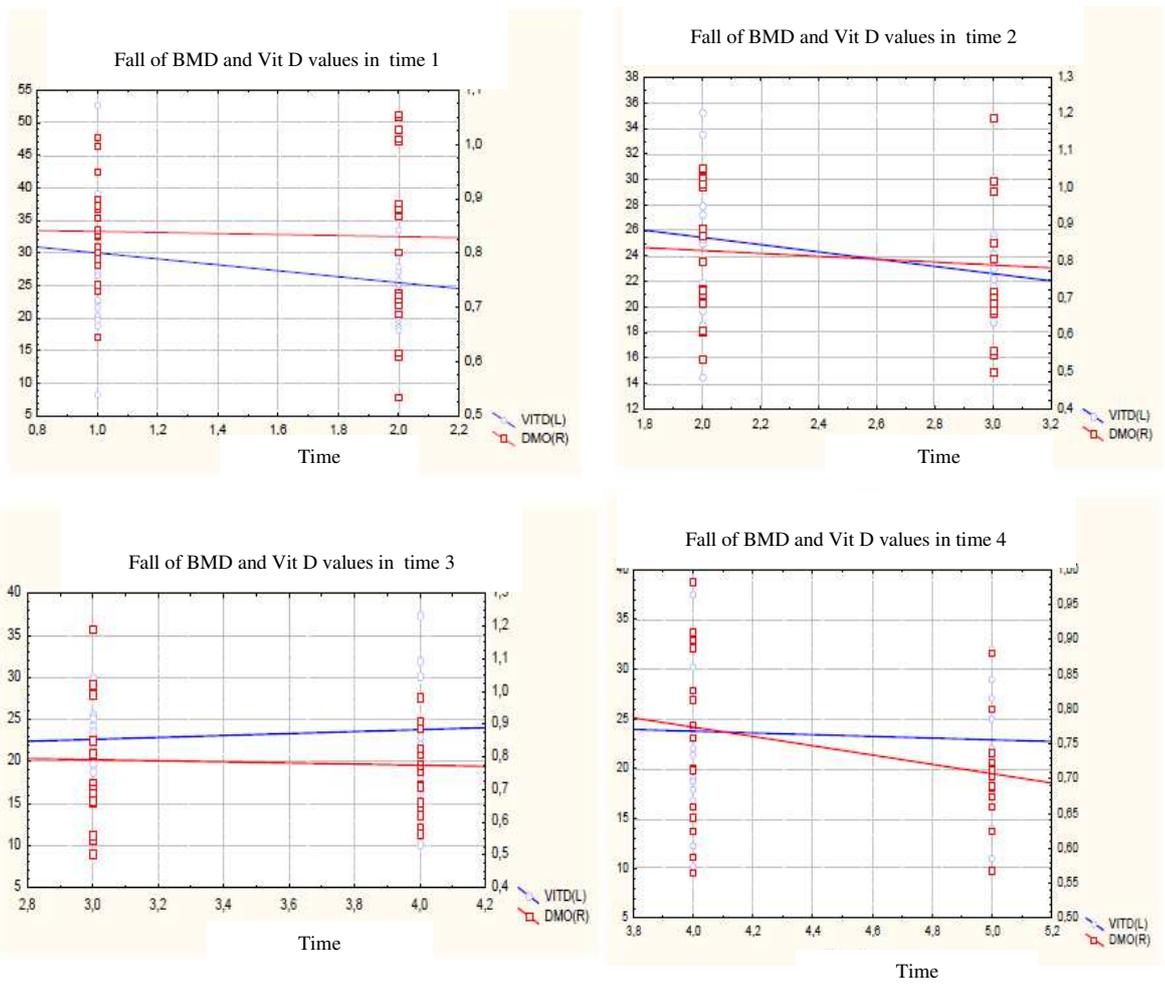


Figure 4 – Femoral neck bone mineral density (BMD) and Vitamin D levels according to time of treatment with aromatase inhibitors and tamoxifen.



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Figure 5 – Decrease rate in Bone mineral density (BMD) and Vitamin D levels according to time of treatment with aromatase inhibitors.

Time	Drug	n	Variable	Mean	Standard Deviation	Minimum	1st Quartil	Mediana	3rd Quartil	Maximum
< 1	Aromatase In	21	Femoral neck BMD	0,85	0,09	0,65	0,8	0,84	0,9	1,01
			Lumbar spine BMD	1,03	0,16	0,62	0,94	1,01	1,12	1,24
			Vitamin D	27,19	8,97	8,3	21,6	26,5	30,6	52,6
			Calcemia	9,12	0,7	8	8,8	8,9	9,4	11
			Calciuria	111,52	28,66	70	90	120	130	190
			Age	61,86	11,32	44	55	61	71	81
	Tamox	13	Femoral neck BMD	0,9	0,07	0,75	0,84	0,91	0,94	1,01
			Lumbar spine BMD	1,05	0,11	0,88	0,93	1,1	1,14	1,21
			Vitamin D	30,57	4,56	21	28,4	30	34	38,4
			Calcemia	8,79	0,53	8	8,6	8,8	9	9,9
			Calciuria	108,38	36,92	68	78	112	126	182
			Age	63,23	9,97	48	55	62	70	80
1 a 2	Aromatase In	18	Femoral neck BMD	0,81	0,17	0,53	0,69	0,76	1,01	1,06
			Lumbar spine BMD	0,96	0,2	0,67	0,82	0,9	1,12	1,45
			Vitamin D	24,25	5,59	14,5	20,2	23,45	28	35,3
			Calcemia	9,45	0,87	8,6	8,9	9,2	9,6	12
			Calciuria	103,06	26,53	60	78	107	128	144
			Age	63,78	10,39	44	55	65	70	80
	Tamox	16	Femoral neck BMD	0,89	0,09	0,71	0,85	0,9	0,96	1,02
			Lumbar spine BMD	1	0,09	0,83	0,94	1	1,06	1,15
			Vitamin D	30,88	5,83	17	28	32	33,5	41
			Calcemia	8,76	0,6	7,8	8,25	8,85	9,15	9,9
			Calciuria	106,5	35,98	68	78	97	124	190
			Age	61,81	10,33	44	55,5	61	69,5	81
2 a 3	Aromatase In	14	Femoral neck BMD	0,78	0,21	0,5	0,66	0,71	0,99	1,19
			Lumbar spine BMD	0,94	0,19	0,71	0,79	0,9	1	1,3
			Vitamin D	22,05	3,72	16,3	19,8	22	24,2	30,1
			Calcemia	9,15	0,84	7,9	8,8	9	9,6	10,6
			Calciuria	117,93	34,05	78	92	110	126	182
			Age	61,36	8,45	49	58	61	64	80
	Tamox	14	Femoral neck BMD	0,9	0,08	0,76	0,86	0,91	0,96	1
			Lumbar spine BMD	1	0,12	0,81	0,89	1	1,04	1,28

		Vitamin D	30,5	6,61	18	27	30,5	32	46	
		Calcemia	8,71	0,5	8	8,3	8,75	9	9,8	
		Calciuria	106,64	36,27	60	81	95	142	174	
		Age	61,79	8,72	48	55	61	68	79	
3 a 4	Aromatase In	15	Femoral neck BMD	0,76	0,13	0,57	0,64	0,76	0,89	0,98
			Lumbar spine BMD	0,93	0,12	0,78	0,84	0,91	0,99	1,23
		Vitamin D	21,44	7,27	10,2	16,8	20,2	24	37,5	
		Calcemia	9,55	1,47	7,8	8,6	9,2	10	14	
		Calciuria	113,8	38,34	66	82	114	126	198	
		Age	63	10,25	46	56	63	72	80	
	Tamox	10	Femoral neck BMD	0,91	0,1	0,76	0,84	0,89	0,97	1,12
			Lumbar spine BMD	1,03	0,08	0,9	0,99	1,03	1,11	1,12
			Vitamin D	31,9	5,3	26	27	31,5	35	43
			Calcemia	8,7	0,71	7,9	8,2	8,45	9,4	9,8
			Calciuria	106,3	32,17	66	78	106	122	160
			Age	61	9,81	49	51	61	68	78
4 a 5	Aromatase In	12	Femoral neck BMD	0,7	0,08	0,57	0,67	0,7	0,73	0,88
			Lumbar spine BMD	0,92	0,17	0,7	0,81	0,89	0,96	1,33
		Vitamin D	21,32	6,12	11	17,75	20,65	26	32	
		Calcemia	9,46	0,69	8,6	8,9	9,2	10	10,9	
		Calciuria	108,42	21,22	77	89,5	109,5	129	134	
		Age	63,25	8,6	48	56,5	65	69,5	75	
	Tamox	14	Femoral neck BMD	0,95	0,09	0,84	0,9	0,93	1	1,16
			Lumbar spine BMD	1,02	0,09	0,88	0,93	1,01	1,1	1,17
			Vitamin D	32,95	7,32	27	29	31	34	56
			Calcemia	8,79	0,48	8,2	8,3	8,85	9,1	9,8
			Calciuria	126,5	37,86	68	99	117	162	188
			Age	63,21	8,95	48	57	61	71	78

7

8 Table 1 – Descriptive results of both groups.

9

10