

CATARINA MARIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA SEDIYAMA

**FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA EM MULHERES
ATENDIDAS EM UM SERVIÇO PÚBLICO DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS – UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

CATARINA MARIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA SEDIYAMA

**FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA EM MULHERES
ATENDIDAS EM UM SERVIÇO PÚBLICO DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS – UM ESTUDO CASO-CONTROLE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2016.

Daniela Caldeira Costa

Ângela Aparecida Barra

Manoela Maciel dos Santos Dias
(Coorientadora)

Milene Cristine Pessoa
(Coorientadora)

Aristides Ribeiro
(Orientador)

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, para quem eu tanto rezei e me guiou durante essa jornada. E a Nossa Senhora, pois sem sua intercessão eu não chegaria até aqui.

Agradeço ao meu marido André, meu grande incentivador e parceiro nessa jornada. A sua paciência e tranquilidade permitiu que tudo acontecesse da melhor maneira possível.

Aos meus filhos, minha verdadeira fonte de inspiração, que tiveram que suportar minha ausência em diversos momentos, para que esse trabalho fosse realizado.

À minha mãe, meu modelo de persistência, superação e dedicação.

Ao meu pai, por me mostrar que sem estudo eu não chegaria a lugar nenhum.

À minha orientadora e exemplo de profissional e pessoa, a professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por ter acreditado em meu potencial, estimulado minhas ideias e por não ter desistido de mim.

Às minhas amigas Manoela Maciel dos Santos Dias e Solange Baêta, pelo suporte e colaboração em todas as horas. O que seria de mim sem o apoio de vocês!

Aos professores Sérgio Oliveira de Paula, Leandro Licurssi de Oliveira, Sílvia Cardoso, Elisabete Fontes, Milene Cristine Pessoa, Giana Zarbato Longo, pela colaboração e pela parceria.

Aos colegas do LABIN e do Laboratório de Imunovirologia Molecular do Departamento de Biologia Geral, em especial Mariana Moura e Paola Carpinetti, pela convivência e pela ajuda com meus experimentos.

Às professoras Sylvia do Carmo Franceschini e Nina Rosa, aos colegas da DSA e à Natália Dias, pelo apoio no trabalho ao longo dessa longa jornada.

Aos membros da banca, por aceitarem participar desta defesa de tese.

Às funcionárias do Departamento de Nutrição da UFV, especialmente Seu Toninho e Rita Stampini, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

Agradeço também aos meus irmãos, aos meus cunhados e aos meus sogros, pelo incentivo e apoio.

E finalmente aos inúmeros amigos e parentes que ficaram na torcida, sofrendo a cada derrota e comemorando cada resultado positivo, acreditando que tudo daria certo no final e se perguntando como isso tudo foi possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS DO ESTUDO	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. ARTIGOS	8
3.1. Artigo 1 (Revisão – publicado no <i>World Journal of Research and Review</i>)	8
3.2. Artigo 2 (Original – Aceito para publicação na revista <i>Nutrición Hospitalaria</i>)	16
3.3. Artigo 3 (Original: submetido à Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde) ...	34
3.4. Artigo 4 (Original)	49
3.5. Artigo 5 (Original publicado no International Journal of New Technology and Research)	64
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
ANEXO A – Questionário semiquantitativo de frequência alimentar	66
ANEXO B – Declaração	69
ANEXO C – Termo de consentimento livre e informado	70
ANEXO D – Questionário de avaliação dos fatores de risco para câncer de mama	73
ANEXO E	77

LISTA DE ABREVIACÕES

1,25(OH)₂D – 1, 25 di-hidróxido vitamina D
25(OH)D – 25 hidroxí vitamina D
BI-RADS – *Breast imaging–reporting and data system*
BMI – Body mass index
BRCA1 – *Breast cancer 1*
BRCA2 – *Breast cancer 2*
CD4 – Grupamento de diferenciação 4
CD8 – Grupamento de diferenciação 8
CM – Câncer de mama
CYP27B1 – 25-hydroxyvitamin D3 1- α -hydroxylase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FHEMIG – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
GCa – Grupo caso
GCo – Grupo controle
GO – Goiás
HF – História familiar
HP – História pregressa
IC – Intervalo de confiança
IL – Interleucina
IMC – Índice de massa corporal
MG – Minas Gerais
mL – Mililitros
ng – Nanograma
OR – Odds Ratio
PI – Piauí
PR – Paraná
p73 – *Protein 73*
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RVD – Receptor vitamina D
SNP – Polimorfismo nucleotídeo único
SP – São Paulo

Th – T helper

TRH – Terapia de Reposição hormonal

UV – Ultravioleta

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

WHR – *Waist-hip ratio*

RESUMO

SEDIYAMA, Catarina Maria Nogueira de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Fatores associados ao câncer de mama em mulheres atendidas em um serviço público de Belo Horizonte, Minas Gerais – Um estudo caso-controle.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio. Coorientadores: Manoela Maciel dos Santos Dias, Milene Cristine Pessoa e Sérgio Oliveira de Paula.

O câncer de mama é o principal tipo de câncer que acomete as mulheres brasileiras, com importante morbimortalidade nessa população. Medidas simples como a realização de mamografia podem impactar negativamente a mortalidade por essa doença, uma vez que possibilita o diagnóstico precoce e o tratamento com intuito curativo. A vitamina D possui propriedades anticânceres, e hoje infere-se que o polimorfismo do receptor da vitamina D pode influenciar o risco de câncer de mama na população feminina. A fim de contribuir para o melhor entendimento dos fatores relacionados à doença e a realização de exames para seu diagnóstico, esta tese é composta de quatro artigos. O primeiro artigo de revisão avaliou a relação entre a doença e as vitaminas A, C, D e E, seu consumo ou suplementação, na população feminina. Em seguida são apresentados três artigos originais. No artigo 2 foram apresentados os resultados das análises dos níveis de vitamina D, cálcio, fósforo e paratormônio na população estudada e avaliada a associação entre os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva, as características antropométricas e os hábitos de vida das mulheres e a presença de câncer de mama. Foi demonstrado que os níveis de vitamina D estavam associados inversamente ao câncer de mama, enquanto as dosagens de cálcio, fósforo e paratormônio não se mostraram diferentes entre os grupos. Houve associação direta da menopausa e da história familiar de câncer de mama e inversa da prática de atividade física moderada com a doença. No artigo 3 foram avaliados os fatores relacionados à realização do primeiro exame de mamografia antes dos 40 anos. Foi encontrada associação inversa entre a realização do exame precocemente e a procedência rural da paciente, a ausência do uso contraceptivo oral e ser eutrófica. Foi demonstrada ainda associação direta com o maior nível de escolaridade, menopausa e obesidade. O artigo 4 abordou a presença do polimorfismo do receptor da vitamina D, os níveis de IL17 e o nível de vitamina D em mulheres do grupo com câncer de mama comparado com o grupo controle saudável. Não se encontrou associação entre a presença do polimorfismo e o câncer de mama. As

pacientes saudáveis apresentaram valores mais elevados de vitamina D e IL17, também sem associação entre esses níveis e a presença do polimorfismo nessa população. Concluiu-se neste estudo que a hipovitaminose D está associada ao câncer de mama na população feminina e que a presença do polimorfismo rs7975232 não está associado ao aumento de risco de câncer de mama e não influenciou os níveis de vitamina D ou IL-17 na população brasileira.

ABSTRACT

SEDIYAMA, Catarina Maria Nogueira de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Factors associated with breast cancer in women attended at a public service of Belo Horizonte, Minas Gerais – A case-control study.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio. Co-advisers: Manoela Maciel dos Santos Dias, Milene Cristine Pessoa and Sérgio Oliveira de Paula.

Breast cancer is the main type of cancer that affects the Brazilian women with significant morbidity and mortality in this population. Simple measures such as mammography can negatively impact the mortality from this disease, as it allows early diagnosis and curative treatment. Vitamin D has anti-cancer properties, and nowadays it is inferred that the Vitamin D receptor polymorphism can influence the risk of breast cancer in the female population. In order to contribute to a better understanding of the factors related to the disease and performing tests for diagnosis, this thesis presents four articles. The first review article discussed the relationship between disease and vitamin A, C, D and E, consumption or supplementation in the female population. Then, are presented three originals articles. In Article 2 the results of analysis of vitamin D levels, calcium, phosphorus and parathyroid hormone in the study population were presented, and the association between risk factors related to sex life, anthropometric characteristics and lifestyle habits of women and presence of breast cancer was assessed. It was demonstrated that vitamin D levels were inversely associated with breast cancer, while the dosages of calcium, phosphorus and parathyroid hormone were not different between the groups. There was a direct association between menopause and family history of breast cancer and inverse association of the practice of moderate physical activity with the disease. In Article 3 factors related to perform the first mammogram before age 40 were evaluated. It was found an inverse association between early perform of the examination and the rural origin of the patient, the absence of oral contraceptive use, and to be eutrophic. It was also demonstrated a direct association with higher levels of education, menopause and obesity and early realization of a mammogram. In Article 4 the presence of the vitamin D receptor polymorphism, levels of IL17 and vitamin D in women were evaluated in the group with breast cancer compared to the healthy control group. No association was found between the presence of the polymorphism and breast cancer. Healthy patients had higher levels of vitamin D

and IL17, and no association was found between these levels and the presence of the polymorphism in this population. It was concluded in this study that vitamin D deficiency is associated with breast cancer in the female population and the rs7975232 polymorphism presence is not associated with increased risk of breast cancer and did not affect the levels of vitamin D or IL-17 in the Brazilian population.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres no mundo, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (1, 2), com incidência mundial de 1.677.000 mulheres (1). Apesar das campanhas mundiais, a mortalidade por essa doença ainda é alta e, em 2012, ocorreram cerca de 521.000 óbitos (1), considerada a quinta causa de morte por câncer no mundo (3).

Na população norte-americana, o risco de desenvolver câncer de mama é maior ao longo da vida entre as caucasianas em relação às afrodescendentes, mantendo um baixo risco para a população masculina (4). No Brasil, em 2016, é esperado o diagnóstico de 57.960 novos casos de câncer de mama. Este é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no país, com 28,1% dos casos, excluindo-se a neoplasia de pele não melanoma, com mortalidade crescente nas últimas décadas (5, 6), sendo o tipo responsável por 128.741 óbitos de mulheres entre os anos de 2003 e 2013 (7).

Com a incidência aumentando devido à crescente urbanização e ao aumento da expectativa de vida da população e da adoção de estilo de vida ocidental (2), o câncer de mama tem como fatores de risco o envelhecimento, a história familiar dessa doença, o sedentarismo, o consumo de álcool (8), o excesso de peso (9), a alta densidade do tecido mamário (10) e a presença de doença benigna da mama com atipia ou carcinoma *in situ* (11). Fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher que levam ao aumento da exposição ao estrógeno endógeno também conferem aumento de risco, como a idade tardia do primeiro filho, a menarca precoce e a menopausa tardia (9, 2).

Existe ainda um fator genético envolvido na patogênese do câncer de mama, responsável por cerca de 10% dos casos de câncer de mama. As mutações relacionadas com maior frequência ao câncer de mama hereditário são dos genes BRCA1 e 2 e p53, as quais conferem mais alto risco (2).

A principal estratégia de prevenção ainda é a prevenção primária através do rastreamento precoce da população assintomática, a fim de diagnosticar precocemente a doença, causando menor morbimortalidade para as mulheres. O método mais efetivo conhecido para o rastreamento dessa doença é o exame de mamografia (12, 13, 2). No Brasil é preconizado o exame clínico anual para as mulheres entre 40 e 49 anos e a mamografia bianual a partir dos 50 anos (11).

A vitamina D é considerada um pró-hormônio, encontrada nas formas de colecalciferol (D3), sintetizado na pele após a exposição solar a partir do 7-de-

hidrocolesterol (14) e de ergocalciferol (D₂), presente em alguns alimentos, absorvida por meio da alimentação (15).

A vitamina D sofre ativação após passar pelo fígado e pelos rins, formando a 1,25-di-hidroxitamina D (1,25(OH)₂D), sua forma mais ativa (15-18). Este composto, através da ligação com o receptor da vitamina D, regula a transcrição gênica e o funcionamento das células em vários tecidos (19).

Os efeitos da vitamina D podem ser classificados como clássicos, possuindo papel importante na mineralização óssea, regulando os níveis séricos de cálcio e fósforo (16, 18). Porém, além do tecido ósseo, tecidos como a mama, próstata e células do sistema imune (16) são alvo de sua ação, consideradas ações não clássicas, como as interações com o sistema imune (18), o controle pressórico, modulando o funcionamento cerebral (14), além de ação na diferenciação celular, na modulação do ciclo celular e na inibição da proliferação de células tumorais (18).

A exposição solar e os altos níveis de vitamina D já foram associados à redução de risco de desenvolver câncer de mama (20, 21), sendo o maior benefício descrito se a exposição ocorrer na fase jovem da vida da mulher, pois nessa fase o tecido mamário ainda se encontra em desenvolvimento (22). A suplementação de vitamina D também pode ter efeito protetor contra o câncer de mama (8).

O *status* ótimo de vitamina D pode ter efeito protetor contra o câncer de mama (23). Os níveis da vitamina D já foram relacionados ao efeito protetor contra essa doença em mulheres (24-26). Acredita-se que a vitamina D atue diretamente na tumorigênese, e tecidos extrarrenais que contenham a enzima 25-hidroxitamina D3 1- α hidroxilase (CYP27B1), como o tecido mamário, poderiam gerar 1,25(OH)₂D, que atuaria de maneira autócrina ou parácrina protegendo essas células de transformação maligna (23).

Os mecanismos pelos quais a vitamina D agiria no tecido mamário seriam através de efeito local após a conversão de 25(OH)D a 1,25(OH)₂D, regulando a proliferação celular, assim como sua diferenciação e apoptose (27). Além disso, o próprio 1,25(OH)₂D circulante exerceria efeito anticarcinogênico ao chegar a esse tecido. Em concentrações elevadas, o 25(OH)D ainda tem efeito protetor sobre as células de mama de hipóxia e do estresse oxidativo (28).

A vitamina D exerce ainda ação sobre o sistema imune, podendo estar relacionada à influência na ação de linfócitos T (29) e à inibição da produção de interleucina pró-inflamatórias, como IL-17 (30). No câncer de mama, a IL-17 parece

estar relacionada ao pior prognóstico da doença, influenciando na expansão neutrofílica, com fenótipo para produção de substâncias como o óxido nítrico, que inibe a ação antitumoral de alguns linfócitos T, e aumentando a chance de metástases a distância (31, 32).

Algumas células do sistema imune também possuem enzimas capazes de ativar a vitamina D circulante e possuem o receptor da vitamina D (18). Esse receptor possui vários polimorfismos de nucleotídeo único descritos, entre eles, *ApaI*, *BsmI* e *TaqI*, que parecem exercer influência no risco de desenvolver várias doenças, sem necessariamente alterar os níveis de vitamina D circulantes (33). Em relação ao câncer de mama, a presença do polimorfismo *ApaI* estaria relacionado ao aumento do risco de câncer de mama (34), assim como *BsmI* (35) e *TaqI* (36).

Mais estudos são necessários para demonstrar a magnitude da influência dos níveis de vitamina D no risco de desenvolver câncer de mama e o potencial da presença do polimorfismo no receptor da vitamina D nessa dinâmica. Ainda, são necessários esclarecimentos acerca da influência dessa vitamina nos níveis de IL17 e se esse fato contribuiria ou não para o risco da doença.

Referências

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. 2013 [cited 2014 12/31/2014]; <http://globocan.iarc.fr>.
2. WHO, W.H.O. *Breast cancer: prevention and control*. 2014 [cited 2014 12/31/2014].
3. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *International Journal of Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-E386.
4. NCI, N.C.I. *SEER Cancer Statistics Review 1975-2009*. 2012 [cited 2014, <http://surveillance.cancer.gov/devcan/>; Devcan Version 6.6.1: [
5. INCA. *Atlas On-line de Mortalidade-Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de MAMA, mulheres, Brasil, entre 1979 e 2013*. 2016 [cited 2016 07/09]; Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml?jsessionid=2163A17D33733BFCBD6C7EA369408951#panelResultado>.
6. INCA Ministério da Saúde, *Estimativa 2016-Incidência de Câncer no Brasil*. 2015, Ministério da Saúde: Rio de Janeiro.

7. INCA. *Atlas On-line de Mortalidade-Taxas de mortalidade por câncer de MAMA, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens e mulheres, Brasil, entre 2003 e 2013.* . 2016 [cited 2016 07/09]; Available from: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>.
8. Rossi, R.E., Pericleous, M., Mandair, D., Whyand, T., and Caplin, M.E., *The Role of Dietary Factors in Prevention and Progression of Breast Cancer.* Anticancer Research, 2014. **34**(12): p. 6861-6875.
9. Lacey, J., Kreimer, A., Buys, S., Marcus, P., Chang, S.-C., Leitzmann, M., et al., *Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort.* BMC Cancer, 2009. **9**(1): p. 84.
10. INCA, I.N.d.C.J.A.G.d.S., *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil 2014,* MINISTÉRIO DA SAÚDE. p. 124.
11. INCA/Ministério da Saúde, *Parâmetros Técnicos para o Rstreamento do Câncer de Mama-Recomendações para Gestores Estaduais e Municipais,* C.G.d.A.E.-D.d.A.à.R.d.A. Oncológica, Editor. 2009, Ministério da Saúde: Rio de Janeiro. p. 13.
12. INCA. *Controle do Câncer de Mama-Deteção Precoce.* 2016; Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/deteccao_precoce.
13. INCA, M.d.S., *Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso.* Revista Brasileira de Cancerologia, 2004. **50**(2): p. 77-90.
14. Norman, A.W., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health.* The American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **88**(2): p. 491S-499S.
15. Chen, P., Li, M., Gu, X., Liu, Y., Li, X., Li, C., et al., *Higher blood 25(OH)D level may reduce the breast cancer risk: evidence from a Chinese population based case-control study and meta-analysis of the observational studies.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e49312.
16. Chung, M., Lee, J., Terasawa, T., Lau, J., and Trikalinos, T.A., *Vitamin D With or Without Calcium Supplementation for Prevention of Cancer and Fractures: An Updated Meta-analysis for the U.S. Preventive Services Task Force.* Annals of Internal Medicine, 2011. **155**(12): p. 827-838.
17. Hines, S.L., Jorn, H.K.S., Thompson, K.M., and Larson, J.M., *Breast cancer survivors and vitamin D: A review.* Nutrition, 2010. **26**(3): p. 255-262.
18. Lang, P.O., Samaras, N., Samaras, D., and Aspinall, R., *How important is vitamin D in preventing infections? Osteoporos Int,* 2013. **24**(5): p. 1537-1553.

19. Schuch, N.J., Garcia, V.C., and Martini, L.A., *Vitamina D e doenças endocrinometabólicas*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo, 2009. **53**(5): p. 626-633.
20. Anderson, L.N., Cotterchio, M., Kirsh, V.A., and Knight, J.A., *Ultraviolet Sunlight Exposure During Adolescence and Adulthood and Breast Cancer Risk: A Population-based Case-Control Study Among Ontario Women*. American Journal of Epidemiology, 2011. **174**(3): p. 293-304.
21. Grant, W., *Update on Evidence that Support a Role of Solar Ultraviolet-B Irradiance in Reducing Cancer Risk*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2013. **13**(1): p. 140-146.
22. Knight, J.A., Lesosky, M., Barnett, H., Raboud, J.M., and Vieth, R., *Vitamin D and Reduced Risk of Breast Cancer: A Population-Based Case-Control Study*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2007. **16**(3): p. 422-429.
23. Welsh, J., *Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011. **347**: p. 6.
24. Crew, K., Gammon, M., Steck, S., Hershman, D., Cremers, S., Dworakowski, E., et al., Association between plasma-25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.), 2009. **2**(6): p. 598 - 604.
25. Bertone-Johnson, E.R., Chen, W.Y., Holick, M.F., Hollis, B.W., Colditz, G.A., Willett, W.C., et al., *Plasma 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D and Risk of Breast Cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2005. **14**(8): p. 1991-1997.
26. Mohr, S.B., Gorham, E.D., Alcaraz, J.E., Kane, C.J., Macera, C., Parsons, J.K., et al., *Serum 25-Hydroxyvitamin D and Prevention of Breast Cancer: Pooled Analysis*. Anticancer Research, 2011. **31**(9): p. 2939-2948.
27. Cui, Y. and Rohan, T.E., *Vitamin D, Calcium, and Breast Cancer Risk: A Review*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2006. **15**(8): p. 1427-1437.
28. Peng, X., Vaishnav, A., Murillo, G., Alimirah, F., Torres, K.E., and Mehta, R.G., *Protection against cellular stress by 25-hydroxyvitamin D3 in breast epithelial cells*. J. Cell. Biochem, 2010. **110**: p. 1324-1333.
29. Mayne, C.G., Spanier, J.A., Relland, L.M., Williams, C.B., and Hayes, C.E., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis*. European Journal of Immunology, 2011. **41**(3): p. 822-832.
30. Joshi, S., Pantalena, L.-C., Liu, X.K., Gaffen, S.L., Liu, H., Rohowsky-Kochan, C., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A*. Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(17): p. 3653-3669.

31. Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.-S., et al., *IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. Nature, 2015. **522**(7556): p. 345-348.
32. Welte, T. and Zhang, X.H.-F., *Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease*. Mediators of Inflammation, 2015. **2015**: p. 6.
33. Uitterlinden, A.G., Fang, Y., van Meurs, J.B.J., Pols, H.A.P., and van Leeuwen, J.P.T.M., *Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms*. Gene, 2004. **338**(2): p. 143-156.
34. Guo, B., Jiang, X., Hu, X., Li, F., and Chen, X., *Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer in a Chinese population*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015. **8**(5): p. 8020-8024.
35. Rashid, M.U., Muzaffar, M., Khan, F.A., Kabisch, M., Muhammad, N., Faiz, S., et al., *Association between the BsmI Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene and Breast Cancer Risk: Results from a Pakistani Case-Control Study*. PLoS ONE, 2015. **10**(10): p. e0141562.
36. Fuhrman, B.J., Freedman, D.M., Bhatti, P., Doody, M.M., Fu, Y.-P., Chang, S.-C., et al., *Sunlight, Polymorphisms of Vitamin D-related Genes and Risk of Breast Cancer*. Anticancer research, 2013. **33**(2): p. 543-551.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1. Objetivo geral

Estudar a associação entre vitamina D e o câncer de mama em mulheres atendidas em um serviço público da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

2.2. Objetivos específicos

- Revisar na literatura científica a associação entre as vitaminas A, C, D e E com o câncer de mama.
- Avaliar os níveis de vitamina D, paratormônio, cálcio, fósforo e sua associação com o câncer de mama.
- Avaliar a associação entre os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva, as características antropométricas e os hábitos de vida das mulheres e a presença de câncer de mama.
- Avaliar as características associadas à idade de realização do primeiro exame de mamografia.
- Avaliar a prevalência do polimorfismo *Apal* (rs7975232) e sua influência nos níveis de vitamina D, além da associação com o câncer de mama.
- Avaliar os níveis de IL17 e sua associação com os níveis de vitamina D.

3. ARTIGOS

3.1. Artigo 1 (Revisão – publicado no *World Journal of Research and Review*)

World Journal of Research and Review (WJRR)
ISSN:2455-3956, Volume-2, Issue-3, jun 2016 Pages 43-50

Vitamins, Carotenoids and its association with Beneficial Effect in Preventing Breast Cancer

Catarina Maria Nogueira De Oliveira Sedyama, Manoela Maciel dos Santos Dias, Luis Fernando de Sousa Moraes, Camilla Atsumi Zanuncio Sedyama-Bhering, Sílvia Eloísa Priore, Sylvia do Carmo Castro Franceschini, Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Abstract — Breast cancer is the second most common cancer in women. Vitamins have been highlighted in numerous studies for its antioxidant properties and its influence on cell physiology, which suggest its potential on tumor prevention. This review aims to verify the effects of intake and/or supplementation of vitamins A, C, D and E in breast cancer prevention. The search was performed in PubMed. For this review, a search was performed using several pre-defined keyword combinations and their equivalents: "Vitamin A", "Carotenoids", "Ascorbic Acid", "Vitamin E", "Tocopherols", "Vitamin D". It was included Clinical Trials, Randomized Controlled Trials, Reviews and Systematic Reviews between January 2002 and December 2014, with women older than 18 years. Initially, 85 studies were identified. However, only twenty five were eligible. It has been demonstrated that vitamin D can reduce the risk of breast cancer in women, as well as vitamin E. Carotenoids and vitamin C might provide beneficial effects in subgroups like premenopausal and postmenopausal women respectively, being influenced by the menopausal status.

Index Terms— breast cancer, vitamins, prevention

1. INTRODUCTION

In the last century, an epidemiological transition occurred, leading to a reduction of the infectious diseases prevalence, and an increase of chronic diseases incidence, especially neoplasms. Besides, the growth in life expectancy and the aging of population over the past decades have also contributed to enhance the incidence of these diseases [1].

Breast cancer is one of the most frequent cancer in women. In 2014, it was expected 57.120 new diagnosed cases in Brazil [2]. This disease still represents a serious public health problem throughout the world, because of the high morbidity

and mortality and high cost of the treatment [3]. In Brazil, data from the Ministry of Health indicate breast cancer as responsible for 12.705 deaths in women in 2010 [4] and for almost 4.000 hospitalizations in 2012 [5].

Several factors influence the onset and development of cancer. Thus, it can be cited as internal causes, the genetic susceptibility of individuals and their own aging process. Furthermore, external causes as lifestyle and dietary habits are importantly included [2].

Nowadays, health policies are focused on early detection of breast cancer, secondary prevention, by mammography screening in women over 40 years old [2]. Primary prevention strategies should be encouraged. Vitamins have been highlighted in numerous studies for its antioxidant properties and its influence on cell physiology, purposing its potential anticarcinogenic role and tumor prevention [6-9].

Vitamin A and retinoids are substances with diverse biological actions. They are essential on cell growth, differentiation and proliferation, besides embryogenesis and apoptosis. These compounds have promoted beneficial effects in tumor cells *in vitro* and *in vivo* [10]. Breast cancer tumors show suppression of nuclear retinoic acid receptors, which are believed to be involved in the carcinogenesis process [10, 11].

Metanalysis of carotenoids and breast cancer, evaluating papers between 1982 and 2011, demonstrated that α -carotene intake may reduce the risk of breast cancer. However, the association of β -carotene with breast cancer remains to be investigated. This association still cannot be established for β -cryptoxanthin, lutein/zeaxanthin and lycopene [12].

Vitamin C has antioxidant properties and also works as enzyme cofactor in plants and animals. It is not synthesized by humans and then must be obtained from diet. Ascorbic acid is the predominant form in humans. This is a powerful antioxidant that neutralizes efficiently free radicals produced in potentially harmful biological processes. Nevertheless, at higher concentrations has pro-oxidant action, leading to degradation of molecules and cell structures. This effect is greater in tumor cells, due to lower concentration of antioxidant enzymes in the cell. Moreover, in the presence of transition metals, such as iron, copper, cobalt, manganese,

Sedyama, C.M.N.O., Department of Nursery and Medicine, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Dias, M.M.S., Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Moraes, L.F.S., Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Sedyama-Bhering, C.A.Z., Agricultural Science Center, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Priore, S.E., Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Franceschini, S.C.C., Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,

Peluzio, M.C.G., Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil



Vitamins, Carotenoids and its association with beneficial effect in preventing breast cancer

chromium and with increased ascorbic acid oxidation, the cytotoxic effect on tumor cells is enhanced [13, 14, 11].

Vitamin D is obtained by skin exposure to ultraviolet rays or from the diet. It is soluble in lipids and essential on immune system and bone development. It exhibits a protective effect against the tumor cells proliferation, since it is involved in calcium and phosphorus levels. The 1,25-dihydroxyvitamin D stimulates macrophages in many genes responsible for cell proliferation, apoptosis, angiogenesis and cell differentiation [15, 16]. Mortality in some type of cancers is inversely proportional to the level of sun exposure. In addition, the supplementation of vitamin D can be able to diminish cell proliferation of prostate and bowel cancer [17, 18, 11, 19].

Vitamin E, also fat-soluble, is an essential component of cell membranes, regulating gene expression, signaling, and cell proliferation. Tocopherols (α -, β -, γ -, δ -) and tocotrienols (α -, β -, γ -, δ -) are the chemical forms of vitamin E. The α -tocopherol is the most abundant form in human tissues and has also antioxidant and anti-inflammatory properties [20]. Its potential regulatory mechanism on cell proliferation and differentiation, through inhibition of protein kinase C, can inhibit tumor development [11, 21].

Thus, the present review aims to verify the effects of intake and/or supplementation of carotenoids and vitamins A, C, D and E in the prevention of breast cancer.

II. MATERIALS AND METHODS

The search was conducted in PubMed from 2002 to 2014, using the following descriptors: "Vitamin A", "Carotenoids", "Ascorbic Acid", "Vitamin E", "Tocopherols", "Vitamin D", "prevention and control", "Breast Neoplasms", "Humans", "Women", "Female", "Adult".

The types of studies "Article Types", "Clinical Trial", "Randomized Controlled Trial", "Review", "Systematic Reviews", and studies with human female and over the age of 19 years were considered as limits. Firstly, the database identified 85 studies. Titles and abstracts were checked and 43 studies were excluded. Then, after full text reading, papers were selected according to the following inclusion criteria: studies with vitamin A or carotenoids, vitamin C, D and E or tocopherol, alone or together, in the prevention of primary breast cancer in adult women. There were restrictions regarding the language, accepting only those papers published in English, and to the time of publication, in the last 12 years. Animal studies were excluded. All papers were analyzed carefully by two researchers, and in case of disagreement, a third investigator was consulted.

The methodological quality of the selected papers was evaluated according to the PEDro scale, based on the Delphi list. Studies with PEDro score less than 3 were considered to have low quality and were excluded [22].

From the selected papers, 13 covered the relationship between cancer and vitamin D. In addition, eight of them, strictly involved this vitamin [23-28, 8, 29] and five of them also included calcium [30-34]. One of them evaluated calcium and a subanalysis with vitamin D [33]. Another one reported the effect of vitamin D on estrogen and progesterone levels and the possible benefits on breast cancer [27]. Regarding the vitamin A, six studies encompassed only carotenoids [35-37, 6, 38-40]. Other studies evaluated vitamin A or carotenoids combined with vitamin E [35] and tocopherol [41] and multivitamins [42]. The vitamin E in combination with fruit and vegetables intake was assessed in one paper [43]. A study regarding vitamin C alone and breast cancer [44], and a cohort study that evaluated vitamin C, vitamin E and β -carotene and breast cancer risk [45] were also found.

This review included 4 types of studies, seven of them were cohort studies [24, 36, 41, 37, 33, 34, 45], fourteen were case-control [30, 35, 32, 23, 42, 44, 46, 28, 43, 6, 8, 38, 39, 29], three were intervention [31, 32, 27], two were a meta-analysis [36, 40], one was a pooled analysis of eight cohort studies [36] and one a pooled analysis of eighteen cohort studies [40].

III. RESULTS AND DISCUSSION

Twenty five papers were carefully selected for this review. Most of the studies included vitamin D (13 papers) with or without the presence of calcium. The others evaluated carotenoids, vitamin C and vitamin E, alone or in combination.

A meta-analysis of 18 cohort studies, involving carotenoids and the risk of developing breast cancer, evaluated almost 1.1 million women, according to the status of estrogen (ER) and progesterone receptor (PR). Some of them were followed up during 26 years. Interestingly, they found an inverse association between carotenoids intake (α -carotene, β -carotene and lutein/zeaxanthin) and ER negative breast cancer. However, no relationship with breast cancer was observed in those ER positive [40].

A study assessing carotenoids (α - and β -carotene, β -cryptoxanthin and lutein/zeaxanthin) intake among Chinese women case-control study, found an inverse association between consumption of carotenoids and risk of breast cancer, except for lycopene. The benefits were even greater among pre-menopausal women and second-hand smoke women, and also was observed for all subtypes of breast cancer' hormone receptor status. [39].

A pooled analysis of eight cohort studies, with 3956 cases and 3055 controls, found that women with higher circulating levels of α -carotene, β -carotene, lutein+zeaxanthin, lycopene, and total carotenoids may have reduced risk of breast cancer, with more benefit for women with estrogen-receptor-negative breast cancer. No protective benefit was found for β -cryptoxanthin [36].

Another study assessing carotenoids (α - and β -carotene) intake in a Swedish women cohort, with a mean time of 9.4 years found an inverse association between consumption of carotenoids and risk of ER negative breast cancer in smokers and in those not taking dietary supplements [37].

A case-control study involving women with breast cancer found inverse association between vitamin A, β -carotene, lutein/zeaxanthin high consumption levels and the risk of breast cancer in premenopausal women, with better outcomes in smokers' women. Among those postmenopausal, this benefit was not demonstrated [6].

The relationship between lycopene intake, its serum levels and the risk of developing breast cancer was also studied in a cohort and in a case-control subgroup analysis. The cohort study categorized the women into quintiles of dietary lycopene and followed them for about nine years. The case-control study was performed with 508 breast cancer cases and 508 controls. No source of lycopene was related to breast cancer, and no correlation was observed between lycopene intake, its serum levels and the risk of developing breast cancer [38].

Carotenoids (α -carotene, β -carotene, β -cryptoxanthin, lycopene, lutein/zeaxanthin), retinol and tocopherols (α - and γ -tocopherol) plasmatic levels were measured in postmenopausal women. The mean follow-up was 8 years. A positive association was found between baseline levels of γ -tocopherol, lycopene and the risk of developing breast cancer. On the other hand, reduced risk of breast cancer was verified with the baseline level of α -carotene and the serum concentration of α and β -carotene one and three years before diagnosis [41].

Regarding the self-reported vitamin supplementation use (multivitamin, A, B, C, and E) in women with breast cancer, who participated of The Shanghai Breast Cancer Study, a case-control study conducted in two phases (1996-1998 and 2002-2004), showed that the risk of breast cancer disease was not related to the consumption of vitamins A, B, C and E. However, in those with low vitamin E intake, supplementation may reduce this risk in 20% [42].

In a Chinese women cohort study performed by Malin et al (2003), fruits and micronutrients intake were evaluated, including the association of vitamin E and breast cancer. The results suggested that the risk of developing breast cancer could be inversely related to the vitamin E consumption, but the intake of total carotene, vitamin C, retinol and total vitamin A was not related with breast cancer risk [43].

In a case-control study with Mexican women, reduced risk of breast cancer was associated with high carotenoids intake in premenopausal women and also with high vitamin E and polyunsaturated fat intake in postmenopausal ones [35].

A nested case-control study with dietary vitamin C intake, estimated from 4-7 day food diaries, was performed with women who participate from five prospective studies in the UK Dietary Cohort Consortium. In this study no evidence of associations between breast cancer incidence and dietary or total vitamin C intake was found, even in post-menopausal women sub-analysis [44].

A prospective cohort study that evaluated vitamin C, vitamin E and β -carotene at the same time, also found no

evidence for an overall association between intake of β -carotene, vitamin C and E and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. However, an inverse association between dietary β -carotene and breast cancer for women consuming moderate to high amounts of alcohol was observed. Results of subgroup analysis suggested a protective effect of the intake of vitamin C and high intake of β -carotene in some subgroups of postmenopausal women, notably those using exogenous hormones [45].

Li, J. et al [33], in a prospective cohort study, found no association between calcium intake and breast cancer risk, using an in-person interviewer and a validated food frequency questionnaire, even in women with dietary vitamin D below or above median, 83.2UI/day.

A case-control study with Saudi Arabian women found low dietary vitamin D intake in breast cancer cases and control. The serum concentration of 25(OH)D was lower in cases than in controls, with an inverse association between 25(OH)D serum concentrations and breast cancer risk [29]. Lee, M.-S. et al [28], in a study with Taiwan women, found a protective effect of vitamin D intake and breast cancer risk in premenopausal women, especially in those with Body Mass Index (BMI) less than 24 kg/m², independent of sunlight exposure.

In a 10- years follow-up study of a French cohort, with about 67.721 women included, no association was found between dietary and supplemental vitamin D intakes and breast cancer risk. Among post-menopausal women from regions with the highest daily ultraviolet radiation doses, those with high dietary or supplemental vitamin D and high UV exposure had benefit in the reduction of breast cancer risk. Vitamin D obtained from sun exposure and from dietary sources can provide benefits related to the risk of breast cancer, suggesting that in areas of low dietary intake and/or sun exposure, dietary supplementation should be encouraged [25].

The evaluation of the vitamin D influence on female fertility and on sex hormone levels in 101 young women was performed by Knight, J. A. et al [27]. Vitamin D supplementation was associated with reduced levels of estrogen and progesterone. This correlation, in a long-term, could be related to a decreased risk of developing breast cancer. Serum levels of vitamin D have also been used to predict this risk. According to Crew, K. et al [23] women that had vitamin D doses above 40 ng/mL had decreased risk of breast cancer, with greater reduction in postmenopausal women, when compared to those women with deficiency of this vitamin (<20 ng/mL).

Rossi, M. et al [8] also found an inverse association between vitamin D intake and the risk of developing breast cancer, regardless of menopausal status. It has also been observed that differences in eating habits related to vitamin D may be partly related to this effect.

When vitamin D obtained from the diet or from sun exposure was evaluated at different stages of life, the protective effect was found in those women who had a history of sun exposure mainly between 10 and 19 years old, period of breast development. Similarly, it was also demonstrated an inverse correlation between the amount of milk intake in

Vitamins, Carotenoids and its association with beneficial effect in preventing breast cancer

adolescence and young adulthood and the risk of developing breast cancer. This benefit was lower in those women whose exposure to vitamin D occurred mainly between 20 and 29 years old. No benefit was found in women over 45 years old [26].

Edvardsen, K. et al [24] evaluated vitamin D intake, sun exposure, including history of UV-exposure, information on sun-seeking holidays, use of solarium and frequency of sunburn, and the risk of breast cancer and did not find association of these factors with breast cancer risk. In addition, Chlebowski, R. et al [32] observed that dietary supplementation of calcium and vitamin D also did not decrease the incidence of invasive breast cancer in postmenopausal women. Furthermore, serum levels of 25-hydroxyvitamin D were not related to the breast cancer risk.

In a study including almost 37.000 postmenopausal women from the Women's Health Initiative (WHI), the association of calcium and vitamin D intake with breast cancer was evaluated. The results showed that the risk of breast cancer progression was reduced by 14-20%, in women who were supplemented with vitamin D without a personal supplements use [31].

Abbas, S. et al [30] evaluated the effect of vitamin D and calcium from the diet in premenopausal women. Only vitamin D intake showed a protective effect in breast cancer risk. No correlation between calcium intake or its combination with vitamin D was observed. In another study [34], an inverse effect of both vitamin D and calcium total intake with the risk of developing breast cancer in premenopausal women, but not in postmenopausal women was noted.

The relationship between vitamin D and breast cancer was evaluated by the different types of study. From four cohorts, with a total of 175.047 women evaluated, two of them (with a total of 99.208 women) found benefit. Six case-control studies were included, and five of them found a protective effect of vitamin D. Concerning the interventional studies, reduced risk of breast cancer with vitamin D and calcium supplementation was observed in a study by Bolland, M. et al [31]. Nevertheless, in those who were already supplementing by their own, when they received extra calcium or vitamin D supplementation the benefit was not found. In 2007, the first analysis of these patients showed no relationship between dietary supplementation vitamin D and calcium and breast cancer risk. Moreover, in a case-control subanalysis, no correlation was found between the 25-hydroxyvitamin D serum levels before the supplementation (baseline levels breast cancer cases 50.0 ± 21.0 nmol/L and controls 52.0 ± 21.1 nmol/L) and risk of breast cancer [32].

Despite the above mentioned studies and extensive discussion in the scientific literature, we believe that still there is not a consensus on the recommendations of vitamins and carotenoids. Therefore, further clarification regarding the beneficial effect of these compounds in the human metabolism and prevention of breast cancer is needed. The vitamin D supplementation seems to be protective in relation to breast cancer, even without a consensus on the role of dietary source or supplement on this benefit. The effect of

vitamin D on breast cancer risk also seems to be different according to the menopausal status of women.

IV. CONCLUSION

Vitamins, with its antioxidant properties, have potential antitumor action which can be more explored in cancer prevention. Vitamin D, associated or not with calcium, has been demonstrated to reduce the risk of breast cancer in women. However, more studies are needed to define the role of the sun exposure in the prevention of this type of tumor and the extension of the benefit according to the menopausal status.

The vitamin C can have a protective effect in some subgroups of postmenopausal women. Concerning carotenoids and vitamin E, the effect on breast cancer is still not clear. It seems that carotenoids might provide beneficial effects in premenopausal women, although the same does not occur in postmenopausal ones, while vitamin E may reduce the risk of breast cancer in both pre and postmenopausal.

The authors do not have any conflict of interest regarding this manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from Laboratory of Nutritional Biochemistry, UFV, FAPEMIG and CAPES. The data presented, the statements made, and the views expressed are solely the responsibility of the author.

REFERENCES

- [1] Rocha, L., *Idosos convivendo com câncer: possibilidades para o cuidado de si*, in Programa de Pós-Graduação em Enfermagem. 2011, Universidade Federal de Santa Maria: Santa Maria.
- [2] INCA, I.N.d.C.J.A.G.d.S., *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil 2014*, MINISTÉRIO DA SAÚDE. p. 124.
- [3] Felix, J., Catro, D., Amorim, M., and ZANDONADE, E., *Tendência da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres no Estado do Espírito Santo no Período de 1980 a 2007*. Revista Brasileira de Cancerologia, 2011. 57(2): p. 159-166.
- [4] DATASUS. *Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil*. 2012 [cited 2012 11/06]; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>.
- [5] DATASUS. *Mortalidade - Brasil Óbitos p/Residência segundo Região*. 2012 [cited 2012 11/06]; <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.
- [6] Mignone, L., Giovannucci, E., Newcomb, P., Titus-Ernstoff, L., Trentham-Dietz, A., Hampton, J., et al., *Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer*. International Journal of Cancer, 2009. 124(12): p. 2929-2937.
- [7] Rohan, T., Howe, G., Friedenreich, C., Jain, M., and Miller, A., *Dietary fiber, vitamins A, C, and E, and risk of breast cancer: a cohort study*. Cancer Causes Control, 1993. 4(1): p. 29-37.
- [8] Rossi, M., McLaughlin, J., Lagiou, P., Bosetti, C., Talamini, R., Lipworth, L., et al., *Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy*. Ann Oncol, 2009. 20: p. 374 - 378.
- [9] Verhoeven, D., Assen, N., Goldbohm, R., Dorant, E., van't Veer, P., Sturmans, F., et al., *Vitamins C and E, retinol, beta-carotene and dietary fibre in relation to breast cancer risk: a prospective cohort study*. British Journal of Cancer, 1997. 75(1): p. 149-155.
- [10] Lotan, R., Xu, X., Lippman, S., Ro, J., and Lee, J., *Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its upregulation by isotretinoin*. N Engl J Med 1995. 332 p. 1405-1410.
- [11] Mamede, A., Tavares, S., Abrantes, A., Trindade, J., Maia, J., and Botelho, M., *The Role of Vitamins in Cancer: A Review*. Nutrition and Cancer, 2011. 63(4): p. 479-494.

- [12] Hu, F., Wang Yi, B., Zhang, W., Liang, J., Lin, C., Li, D., et al., *Carotenoids and breast cancer risk: a meta-analysis and meta-regression*. Breast Cancer Research and Treatment, 2012. **131**(1): p. 239-253.
- [13] Chen, Q., Espey, M., Sun, A., Pooput, C., Kirk, K., Krishna, M., et al., *Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(32): p. 11105-11109.
- [14] Heaney, M., Gardner, J., Karasavvas, N., Golde, D., Scheinberg, D., Smith, E., et al., *Vitamin C Antagonizes the Cytotoxic Effects of Antineoplastic Drugs*. Cancer Research, 2008. **68**(19): p. 8031-8038.
- [15] Corder, E., Guess, H., Hulka, B., Friedman, G., Sadler, M., Vollmer, R., et al., *Vitamin D and prostate cancer: a prediagnostic study with stored sera*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1993. **2**(5): p. 467-472.
- [16] Lowe, L., Guy, M., Mansi, J., Peckitt, C., Bliss, J., Wilson, R., et al., *Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(8): p. 1164-1169.
- [17] DeLuca, H. and Ostrem, V., *The relationship between the vitamin D system and cancer*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1986. **206**: p. 413-429.
- [18] Grant, W., *An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation*. Cancer Causes and Control, 2002. **94**: p. 1867-1875.
- [19] Zhao, X., Peehl, D., Navone, N., and Feldman, D., *1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 inhibits prostate cancer cell growth by androgen-dependent and androgen-independent mechanisms*. Endocrinology, 2000. **141**: p. 2548-2556.
- [20] Aggarwal, B., Sundaram, C., Prasad, S., and Kannappan, R., *Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases*. Biochemical Pharmacology, 2010. **80**(11): p. 1613-1631.
- [21] Traber, M., *Vitamin E regulatory mechanisms* Annual Review of Nutrition, 2007 **27** : p. 347-362
- [22] Verhagen, A., de Vet, H., de Bie, R., Kessels, A., Boers, M., Bouter, L., et al., *The Delphi List: A Criteria List for Quality Assessment of Randomized Clinical Trials for Conducting Systematic Reviews Developed by Delphi Consensus*. Journal of clinical epidemiology, 1998. **51**(12): p. 1235-1241.
- [23] Crew, K., Gammon, M., Steck, S., Hershman, D., Cremers, S., Dworakowski, E., et al., *Association between plasma-25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk* Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.), 2009. **2**(6): p. 598 - 604.
- [24] Edvardsson, K., Veierod, M., Brustad, M., Braaten, T., Engelsen, O., and Lund, E., *Vitamin D effective solar UV radiation, dietary vitamin D and breast cancer risk*. International Journal of Cancer, 2011. **128**: p. 1425 - 1433.
- [25] Engel, P., Fagherazzi, G., Mesrine, S., Boutron-Ruault, M., and Clavel-Chapelon, F., *Joint Effects of Dietary Vitamin D and Sun Exposure on Breast Cancer Risk: Results from the French E3N Cohort*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2011. **20**(1): p. 187-198.
- [26] Knight, J.A., Lesosky, M., Barnett, H., Raboud, J.M., and Vieth, R., *Vitamin D and Reduced Risk of Breast Cancer: A Population-Based Case-Control Study*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2007. **16**(3): p. 422-429.
- [27] Knight, J.A., Wong, J., Blackmore, K.M., Raboud, J.M., and Vieth, R., *Vitamin D association with estradiol and progesterone in young women*. Cancer Causes and Control, 2010. **21**(3): p. 5.
- [28] Lee, M.-S., Huang, Y.-C., Wahlqvist, M.L., Wu, T.-Y., Chou, Y.-C., Wu, M.-H., et al., *Vitamin D Decreases Risk of Breast Cancer in Premenopausal Women of Normal Weight in Subtropical Taiwan*. Journal of Epidemiology, 2011. **21**(2): p. 8.
- [29] Yousef, F.M., Jacobs, E.T., Kang, P.T., Hakim, I.A., Goings, S., Yousef, J.M., et al., *Vitamin D status and breast cancer in Saudi Arabian women: case-control study*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2013. **98**(1): p. 105-110.
- [30] Abbas, S., Linseisen, J., and Chang-Claude, J., *Dietary Vitamin D and Calcium Intake and Premenopausal Breast Cancer Risk in a German Case-Control Study*. Nutrition and Cancer, 2007. **59**(1): p. 54-61.
- [31] Bolland, M., Grey, A., Gamble, G., and Reid, I., *Calcium and vitamin D supplements and health outcomes: a reanalysis of the Women's Health Initiative (WHI) limited-access data set*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **94**(4): p. 1144-1149.
- [32] Chlebowski, R., Johnson, K., Kooperberg, C., Pettinger, M., Wactawski-Wende, J., Rohan, T., et al., *Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**: p. 1581 - 1591.
- [33] Li, J., Koh, W.-P., Jin, A.-Z., Yuan, J.-M., Yu, M.C., and Butler, L.M., *Calcium intake is not related to breast cancer risk among Singapore Chinese women*. International Journal of Cancer, 2013. **133**(3): p. 680-686.
- [34] Lin, J., Manson, J., Lee, I., Cook, N., Buring, J., and Zhang, S., *Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women*. Arch Intern Med, 2007. **167**: p. 1050 - 1059.
- [35] Bonilla-Fernandez, P., Lopez-Cervantes, M., Torres-Sanchez, L., Tortolero-Luna, G., and Lopez-Carrillo, L., *Nutritional Factors and Breast Cancer in Mexico*. Nutrition and Cancer, 2003. **45**(2): p. 148-155.
- [36] Eliassen, A.H., Hendrickson, S.J., Brinton, L.A., Buring, J.E., Campos, H., Dai, Q., et al., *Circulating Carotenoids and Risk of Breast Cancer: Pooled Analysis of Eight Prospective Studies*. Journal of the National Cancer Institute, 2012. **104**(24): p. 1905-1916.
- [37] Larsson, S., Bergkvist, L., and Wolk, A., *Dietary carotenoids and risk of hormone receptor-defined breast cancer in a prospective cohort of Swedish women*. European Journal of Cancer, 2010. **46**(6): p. 1079-1085.
- [38] Sesso, H., Buring, J., Zhang, S., Norkus, E., and Gaziano, J., *Dietary and Plasma Lycopene and the Risk of Breast Cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2005. **14**(5): p. 1074-1081.
- [39] Wang, L., Li, B., Pan, M.-X., Mo, X.-F., Chen, Y.-M., and Zhang, C.-X., *Specific carotenoid intake is inversely associated with the risk of breast cancer among Chinese women*. British Journal of Nutrition, 2014. **111**(09): p. 1686-1695.
- [40] Zhang, X., Spiegelman, D., Baglietto, L., Bernstein, L., Boggs, D., van den Brandt, P., et al., *Carotenoid intakes and risk of breast cancer defined by estrogen receptor and progesterone receptor status: a pooled analysis of 18 prospective cohort studies*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2012. **95**(3): p. 713-725.
- [41] Kabat, G., Kim, M., Adams-Campbell, L., Caan, B., Chlebowski, R., Neuhouser, M., et al., *Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009. **90**(1): p. 162-169.
- [42] Dorjgochoo, T., Shrubsole, M.J., Shu, X.O., Lu, W., Ruan, Z., Zhen, Y., et al., *Vitamin supplement use and risk for breast cancer: the Shanghai Breast Cancer Study*. Breast Cancer Research and Treatment, 2008. **111**(2): p. 269-278.
- [43] Malin, A., Qi, D., Shu, X., Gao, Y., Friedmann, J., Jin, F., et al., *Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer*. International Journal of Cancer, 2003. **105**(3): p. 413-418.
- [44] Hutchinson, J., Lentjes, M.A.H., Greenwood, D.C., Burley, V.J., Cade, J.E., Cleghorn, C.L., et al., *Vitamin C intake from diary recordings and risk of breast cancer in the UK Dietary Cohort Consortium*. European Journal of Clinical Nutrition, 2012. **66**(5): p. 561-568.
- [45] Nagel, G., Linseisen, J., van Gils, C.H., Peeters, P.H., Boutron-Ruault, M.C., Clavel-Chapelon, F., et al., *Dietary beta-carotene, vitamin C and E intake and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Breast Cancer Research and Treatment, 2010. **119**(3): p. 753-765.
- [46] Knight, J., Lesosky, M., Barnett, H., Raboud, J., and Vieth, R., *Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2007. **16**(3): p. 422 - 429.

able I: Summarizes studies relating breast cancer and vitamins A, C, D and E.

Vitamins, Carotenoids and its association with beneficial effect in preventing breast cancer

Author, year, country and type of study	Estimated nutrient	Target Population	Observed effect	Supplementation	Method	Follow-up/ Recruit
Wang <i>et al.</i> , 2014, China, hospital-based case-control	Carotenoids	1.122 women	Inverse association with breast cancer risk and the highest vs lowest quartile of intake of α -carotene (<326-37vs>945-61, OR 0.61, 95% CI 0.43,0.88), β -carotene (<3933.00 vs >. 8382.49, OR 0.54, (95% CI 0.38, 0.78), β -cryptoxanthin (<49.76 vs >135.17, OR 0.38 (95% CI 0.26,0.52) and lutein/zeaxanthin (<3510.94 vs >. 7999-28, OR 0.49, 95% CI 0.34, 0.71).	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Ongoing, beginning in September 2011
Li, <i>et al.</i> , 2013, China, cohort	Calcium and vitamin D	34.028 women	No association between Calcium and breast cancer risk (highest quartile >345.6 mg/1000 kcal/day compared to lowest quartile <204.5mg/1000 kcal/day of intake)	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Follow-up mean 14.2 \pm 3.5 years
Yousef, <i>et al.</i> , 2013, Saudi Arabia, case-control	Vitamin D	240 women	Inverse association. Women with 25(OH)D \geq 10 and <20ng/mL- OR 4.0 (1.6-10.4 95% CI). Women with 25(OH)D <10ng/mL OR 6.1 (2.4, 15.1CI) for breast cancer risk compared to those with 25(OH)D concentrations >20ng/mL	There was no supplementation	Food-frequency questionnaire (FFQ) Serum samples	June to August 2009
Eliessen <i>et al.</i> , 2012, USA, pooled analysis 8 cohort studies	Carotenoids	10.066 women	Inverse association with breast cancer. High vs lowest quintile for α -carotene(<2.6vs \geq 11.3, RR 0.87, 95% CI = 0.71, 1.05, Ptrend = 0.04), β -carotene (<11.9 vs \geq 39.9, RR 0.83, 95% CI 0.70, 0.98), lutein+zeaxanthin (<16.9 vs \geq 37.3, RR 0.84, 95% CI 0.70, 1.01, Ptrend 0.05), lycopene (<15.7 vs \geq 45, RR 0.78, 95% CI 0.62, 0.99), and total carotenoids (<70.1 vs \geq 139, RR 0.81, 95% CI 0.68,0.96)	There were women with and without supplementation	Plasma or serum samples collected	-
Hutchinson <i>et al.</i> , 2012, UK, nested case control	Vitamin C	2.851	No association	There were women with and without supplementation. Mean dietary vitamin C intake: 66 to 118 mg/day. Mean total vitamin C intake: 118 to 251 mg/day	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	-
Zhang <i>et al.</i> , 2012, USA, meta-analysis pooled analysis 18 cohort	Carotenoids	1.028.438 women	Carotenoids intake inversely associated to ER negative breast cancer (highest vs lowest quintiles: α -carotene RR 0.87; 95% CI: 0.78, 0.97), β -carotene RR 0.84; 95% CI: 0.77, 0.93), and lutein/zeaxanthin RR 0.87; 95% CI: 0.79, 0.95)	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	-
Bolland <i>et al.</i> , 2011, New Zealand, intervention/c linical trial	Vitamin D and calcium	36.282 postmenopausal women	Reduces risk of breast cancer	1 g Ca 400 IU vitamin D daily	Food Frequency Questionnaire (FFQ) And supplement use questionnaire	7 years
Lee <i>et al.</i> , 2011, China, case-control	Vitamin D	400 women	Protective effect (lower breast cancer risk in women with a dietary vitaminD intake > 5 μ g/day (OR 0.48; 95% CI, 0.24-0.97) than women with an intake < 2 μ g/day)	Vitamin D supplement 3.48 μ g \pm 5.10 cases and 3.64 μ g \pm 5.02 μ g/day control. 47.5% cases and 55.5% control	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruitment 2004-2005
Engel <i>et al.</i> , 2011, France, cohort	Vitamin D	67.721 women	No association between dietary and supplemental vitamin D intakes and breast cancer risk. Protective effect in highest quartile daily ultraviolet radiation dose region(>2.7 kJ/m ² d in postmenopausal women with high tereil(>113IU/d, mean 143.2 IU/d)) dietary or supplemental vitamin D intake compared to lowest	There were women with and without supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	follow-up 10 years
Edvardsen <i>et al.</i> , 2011, Norway, cohort	Vitamin D	41.811 women	No effect	There was no supplementation. Mean vitamin D baseline intake : 9.4 μ g/day	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Follow-up 8.5 years
Nagel <i>et al.</i> , 2010, Europe, Cohort	Beta-carotene, vitamin C and vitamin E	288.776 women	In postmenopausal women with hormone replacement and alcohol consumption, a weak protective effect between b-carotene (highest 28,742 mg/d vs. lowest 22,606 mg/d quintile) and vitamin E (highest 28,742 mg/d vs. lowest 22,606 mg/d quintile)	There were women with and without supplementation. Median intake (mg/day): β -Carotene: 1.6 to 4.05. Vitamin C: 95.88 to 200.82. Vitamin E: 7.28 to 13.33	Country-specific validated questionnaires to capture local dietary habits(face-to-face dietary interview, quantitative, semi quantitative, dietary questionnaire combined with food records)	median follow-up time of 8.8 years
Larsson <i>et al.</i> , 2010, Sweden, cohort	Carotenoids	36.664 women	α and β -carotene inversely associated with the risk of breast cancer among smokers (highest \geq 1650 μ g/d vs lowest <318 μ g/d quintile of intake- 0.32 (95% CI 0.11-0.94; Ptrend = 0.01) for α -carotene and highest \geq 4783 μ g d vs lowest <1774 μ g/d quintile 0.35 (95% CI: 0.12-0.99; Ptrend = 0.03 for β -carotene) and in women who do not use dietary supplementation	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruitments 1987 to 1990, and 1997. Follow up 1998 to the date of breast cancer diagnosis, death, or December 31, 2007

Knight <i>et al.</i> , 2010, intervention	Vitamin D	101 women	Potential reduction	Vitamin D = 4 weekly doses of 28,000 IU(D ₃)	Blood sample	Recruitment in summer (June to September) and in winter (December to March)
Kabat <i>et al.</i> , 2009, EUA, cohort	Carotenoid s/ retinol/ tocopherol	5.450 women	Inverse association between the baseline serum α -carotene and the β -carotene and breast cancer. γ -tocopherol and lycopene – direct association (highest compared with lowest tertile)	No supplementation	blood samples years 1, 3 and 6 follow-up	Recruit 1 October 1993 and 31 December 1998 Median follow-up 8 years
Crew <i>et al.</i> , 2009, EUA, population-based case-control	Vitamin D	2101 women	Protective effect, greater in postmenopausal women	-	Food Frequency Questionnaire (FFQ) Plasma	Cases recruitment between August 1, 1996, and July 31, 1997
Mignone <i>et al.</i> , 2009, case-control	Carotenoid s	12268 women	In Premenopausal women, an inverse association with breast cancer was observed for high levels of vitamin A (>2309.6) (OR: 0.82, 95%CI: 0.68–0.98, p for trend = 0.01), β -carotene (>25022.9 mcg) (OR: 0.81, 95% CI 0.68–0.98, p trend = 0.009), α -carotene (> 5686.0 mcg) (OR: 0.82, 95% CI: 0.68–0.98, p trend = 0.07), and lutein/zeaxanthin (> 16454.4mcg) (OR: 0.83, 95% CI 0.68 – 0.99, p trend = 0.02).	There was no supplementation. 43.1% cases and 44.5% control reported multivitamin use	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Between 1996 and 2001
Chlebowski <i>et al.</i> , 2008, EUA, intervention/case-control	Vitamin D + calcium	36.282 postmenopausal women	No correlation	Supplementation 1000 mg of elemental calcium with 400 IU of vitamin D 3/day	Food Frequency Questionnaire (FFQ) Serum	7 years
Rossi <i>et al.</i> , 2009, Italy, case-control	Vitamin D	5.157 women	Intake inversely proportional to the breast cancer's risk. (Vitamin D intake >3.57 lg or 143IU have protective effect against breast cancer)	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	June 1991 to April 1994
Abbas <i>et al.</i> , 2007, Germany, population-based case-control	Vitamin D Calcium	944 women	Vitamin D intake was inversely associated with premenopausal breast cancer risk (OR 0.50 (95%CI = 0.26–0.96) for the highest intake (≥ 5 μ g/day) vs the lowest (<2 μ g/day; P trend = 0.02). Dietary calcium intake was not associated with breast cancer	There was no supplementation. Vitamin supplements reported by 25.2% cases and 25.9% controls. Median vitamin D intake: 2.51 μ g/day Median calcium intake: 894 mg/day	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	
Dorjgochoo <i>et al.</i> , 2008, Shanghai/EUA, population-based case-control	Multivitamin, A, B, C, and E	6.928 women	Decrease breast cancer risk with Vitamin E supplementation in women with low vitamin E dietary intake (OR=0.8; 95% CI, 0.6-0.9).	20.2% of case and control supplemented with any vitamin, 16.8% vitamin E supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruit August 1996-March 1998 (Phase I) and April 2002-February 2005
Lin <i>et al.</i> , 2007, EUA, cohort	Vitamin D calcium	31.487 women	Higher intakes of total calcium and vitamin D were moderately associated with a lower risk of premenopausal breast cancer (highest vs lowest quintile of intake HR 0.61 (95%CI, 0.40-0.92) for calcium and HR 0.65 (95% CI, 0.42-1.00) for vitamin D intake.	89.5% were supplementing calcium in the 5th. Quintile and 75.9% were supplementing vitamin D in the 5th. Quintile Mean calcium and vitamin D intake values 1021mg/d and 353IU/d.	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruitment 1993 and 1995 10 years of follow-up
Knight <i>et al.</i> , 2007, Canada, population-based case-control	Vitamin D	2.107 women	Protective effect associated with sun exposure from ages 10 to 19 (OR, 0.65; 95% CI, 0.50-0.85 for the highest quartile of outdoor activities vs the lowest), consumption of cod liver oil use (OR, 0.76; 95% CI, 0.62-0.92) and increasing milk consumption (OR, 0.62 95% CI 0.45-0.86 for >10 glasses/week versus none)	Vitamin D: 15% cases supplemented, and 22% control. Others vitamins: 7% cases and 11% controls	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruitment July 1, 2003 and August 31, 2004
Sesso <i>et al.</i> , 2005, EUA, cohort case-control	Carotenoid s	39.876 women	Cohort no association with breast cancer. Case-control no association with breast cancer	There was no supplementation. Mean lycopene intake: 9,199 μ g/day	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	9.9 years of follow-up
Bonilla-Fernández <i>et al.</i> , 2003, Mexico, case-control	Vitamin E Carotenoid s	282 women	Vitamin E: protective effect in postmenopausal (highest (23.9 α -Tocopherol equivalent.) vs lower (16.7 α -Tocopherol equivalent.) tertiles intake, OR=0.10, 95%CI=0.02-0.44)	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruitment 1994 to 1996
Malin <i>et al.</i> , 2003, EUA, population-based case-control	Fruits/Veg etables Vitamin E	3.015 women	Vitamin E were inversely associated with breast cancer risk with OR (95%CI) 0.72, (0.54–0.96) to Q4(15.6) and 0.69 (0.50–0.96) to Q5(19.9) vs lowest quintile. No association with breast cancer risk with intake of total carotene, vitamin C, retinol and total vitamin A.	There was no supplementation	Food Frequency Questionnaire (FFQ)	Recruit between August 1996 and March 1998

Sediyama, C.M.N.O., Graduated in Medicine (2001), specializing in Internal Medicine and Oncology. Master's degree in science of nutrition / Viçosa Federal University in 2011. Ph.D. student by the same program. Professor of Medicine, Department of Nursing and Medicine, Federal University of Viçosa, Brazil. It has experience in the Health Science, Nutrition and Molecular Biology, acting on the following topics: evaluation of antioxidant activity, anti-inflammatory and preventive vitamin in breast

cancer, experimentation with animal models, and genetics.

Dias, M.M.S., Graduated in Food Engineering from the Federal University of Viçosa (2006), master's and doctorate in Food Science and Technology at the Federal University of Viçosa. He held doctorate degrees at Texas A & M University. Performs post-doctorate in Nutrition Science. It has experience in the field of Food Science and Technology, Nutrition and Molecular Biology, acting on the following topics: development of new products with functional

Vitamins, Carotenoids and its association with beneficial effect in preventing breast cancer

properties, rheological analysis, evaluation of antioxidant activity, anti-inflammatory and pro-apoptotic of phenolic compounds in vitro quality protein food, experimentation with animal models.

Moraes, L.F.S, Nutritionist graduated from the Federal University of Viçosa - UFV (2011). Award Medal Arthur Bernardes (2011). Master of Science in Nutrition (UFV - 2013). PhD in Nutritional Sciences (UFV).

Sediyama-Bhering, C.A.Z., Graduated in Agronomy (2006), Master in Plant Science (2008) and PhD in Plant Science in Production Area and Seed Technology at the Federal University of Viçosa - UFV (2012). She is post-doctoral student at UFV, sponsored by CNPq. He has experience in Agronomy, with emphasis on Plant Science, Production and Seed Technology, Molecular Biology, Proteomics, Plant health, cultural Tracts, Great Cultures, Soja, Biological Control and Agricultural Entomology..

Priore, S.E., Graduated in Nutrition from the Federal University of Rio de Janeiro, residence in Public Health by the National School of Public Health - ENSP / FIOCRUZ, specialization in Public Health with emphasis in Nutrition, Faculty of Public Health / USP, master's and doctorate in nutrition from the Federal University of São Paulo / Paulista School of Medicine. It is Titular Professor, Department of Nutrition and Health of the Federal University of Viçosa. Coordinates the Adolescent Health Care Program - PROASA / UFV. It operates at UFV in Graduate Programs in the strict sense: Nutrition Science (line: Health and nutrition of individuals and populations) and Agroecology (line: agrifood systems of family farmers). With the University of Évora - Portugal, co-directed the Master in Health Education (domain: Obesity in childhood). By notice 33/2012 International Pro-Mobility Program - CAPES: Federal University of Viçosa and University of Lúrio (Nampula, Mozambique), was the first teacher of UFV to participate in loco of the project "Implementation of assessment strategies and Food Safety Nutrition (SAN) in Mozambique" has experience in Nutrition, with emphasis on nutritional Analysis of Population, acting on the themes: children, adolescents, nutritional status, metabolic syndrome, availability of food for consumption, food safety and nutrition, among others

Franceschini, S.C.C., Degree in Nutrition from the Methodist University of Piracicaba (1986), with specialization in Basic and Applied Nutrition at

Ribeirão Preto School of Medicine -University of São Paulo; Master's degree in Nutrition from the Federal University of São Paulo (1995) and Doctorate in Science from the Federal University of São Paulo (1999). Professor, Department of Nutrition and Health of the Federal University of Viçosa and Head of the Department from 1999 to 2001. He was a member (2004-2007) and coordinator (2007) Health Sciences Board of the Foundation for Mine State Research general (FAPEMIG). He was Head of the Department of Medicine and Nursing (2010 to 2011) and Health Division (2005 to 2011), both from the Federal University of Viçosa. Member (2009 mandate to 2013) of the Board of AGROS - UFV Social Security Institute and Chairman of the Board (2011-2013). Guiding the program Graduate in Nutrition Sciences, UFV and Health Program for Children and Adolescents, UFMG. Has experience in Nutrition, with emphasis on Nutritional Analysis populations, mainly in the following themes: nutritional status, anthropometry, iron deficiency anemia and other deficiency diseases, breastfeeding and nutritional assessment. June 2011 to July 2015 was Pro-Rector of Community Affairs at the Federal University of Viçosa. Southeast Regional Coordinator (2012-2013) and National Coordinator of Pro-Rectors Forum of Community Affairs and Student (FONAPRACE), 2013-2014

Peluzio, M.C.G., Degree in Nutrition from the Federal University of Viçosa (1981), Master in Agrochemical the Federal University of Viçosa (1992) and PhD in Biochemistry and Immunology at the Universidade Federal de Minas Gerais (2001). He is currently Associate Professor IV of the Federal University of Viçosa. Member of the Coordinating Committee of the Graduate Program in Nutrition Science, member of the Science Advisory Board of Health-FAPEMIG-MG (2012-2015). Coordinator of the Laboratory of Nutritional Biochemistry / DNS / UFV. Reviser of journals: European Journal of Cancer Prevention; Experimental and Molecular Pathology, Lipids Lipids Health and Disease, Genetics and Genomics. Line of research: the use of nutrients and foods with functional property claim in the prevention of chronic diseases with an emphasis on atherosclerosis and colon cancer (animal models), breast cancer; Intestinal microbiota correlating with the use of probiotics in obesity and metabolic syndrome. CNPq Researcher Level 2

3.2. Artigo 2 (Original – Aceito para publicação na revista *Nutrición Hospitalaria*)

THE RELATIONSHIP OF VITAMIN D STATUS AND PHYSICAL ACTIVITY WITH BREAST CANCER IN WOMEN

Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sedyama, Manoela Maciel dos Santos Dias, Lara Shulet, Sérgio Oliveira de Paula, Milene Cristine Pessoa, Renata Nascimento Freitas, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Abstract: Introduction: The prevention strategy of breast cancer is still the key factor for early diagnosis and the most effective method for tracking the disease. Objective: This study aimed to evaluate the association vitamin D level with breast cancer in women. Methods: This hospital case-control study was conducted with 181 women with breast cancer and 197 healthy controls. Vitamin D status, calcium, phosphorus and PTH serum dosage and data collection related to lifestyle and history of patients, besides anthropometric measurements was performed. Univariate analysis (chi-square and raw odds ratio) and multivariate analysis were performed through multivariate logistic regression. Results: This study shows a higher value of vitamin D in health controls (26.9 mg/dl) than in breast cancer women (24.8mg/dl). Higher numbers of women with sufficient vitamin D status (34.85%) were found in control group than cancer group. Using the multiple logistic regression model, the family history of breast cancer (*OR* 36.37, 95%CI 4.75-278.50) and menopause (*OR* 5.17, 95% CI 2.72-9.80) had a direct association with breast cancer, while the level of vitamin D (*OR* 0.95, 95%CI 0.91-0.99) and moderate physical activity (*OR* 0.31, 95%CI 0.10-0.93) maintained the inverse associations with the disease. Conclusion: Vitamin D and moderate physical activity were protective factors for breast cancer, while being in the menopause and have a family history of breast cancer were risk factors.

Keywords: breast cancer, vitamin D, menopause, physical activity, case-control study.

Introduction

Increasing life expectancy, adoption of western lifestyle, and growing urbanization has raised the global incidence of breast cancer (1). Breast cancer has known risk factors such as the cellular aging, family history, alcohol consumption (2), overweight (3), sedentary lifestyle, and high breast tissue density (4). Other risk factors are related to women's reproductive life, which leads to increased endogenous estrogen levels, as the later age at first childbirth, early menarche, and late menopause (1,3). Some studies indicated that sun exposure and vitamin D levels are inversely proportional to the risk of developing breast cancer (5,6). Moreover, it is suggested a greater benefit if sun exposure occurs during the breast tissue development in young stages of women's life (7). Furthermore, vitamin D may act directly in tumorigenesis, and extrarenal tissues such as breast tissue, expressing the CYP27B1 enzyme, that

provide instructions for the synthesis of 1- α -hydroxylase. This enzyme is responsible for converting the inactive precursor of vitamin D to the active form, namely, 1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)₂D₃]. This vitamin can have autocrine or paracrine activity, protecting the breast tissue cells from malignant transformation (8). The production of 1,25(OH)₂D₃ is controlled by its own levels and is controlled by the parathyroid hormone, fetal growth factor 23, and calcium and phosphorus levels in serum (9).

Parathyroid hormone (PTH) along with vitamin D is involved in calcium homeostasis acting directly or indirectly in organs related to its storage, excretion, and absorption. Moreover, PTH can promote both formation and reabsorption of the bone tissue. Also, drops in calcium levels of 10% are sufficient to increase PTH serum levels (10,11).

In this study, we aimed to evaluate the associations between lifestyle, vitamin D status, PTH, calcium and phosphorus levels in serum, with breast cancer in women in the Hospital Foundation of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Material and Methods

Study population

This study is a part of hospital-based case-control study, whose source of patients were health services, ambulatory care; hospital; compulsory notification or registration diseases. The study was conducted with women treated in the Mastology Service of Odete Valadares Maternity, of Hospital Foundation of Minas Gerais State (FHEMIG), in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Women who were referred to the ambulatory care were invited to participate in the study as volunteers. Those women who accepted signed the free and clarified consent term. The study followed the Declaration of Helsinki and was approved by the National Committee of Ethics in research (protocol number: 1889/2005) (12,13).

The case group (GCa) was composed by women who were referred for evaluation at the Maternity Odete Valadares, older than 18 years, living in rural or metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, with mammography result BI-RADS (14) (Breast Imaging Reporting and Data System) 0, 3, 4 or 5 (assessment incomplete, probably benign, suspicious abnormality and highly suspicious of malignancy, respectively) and breast cancer confirmed by biopsy. The control group (GCo) was composed by women who were older than 18 years old, lived in same area

in Brazil, and mammography's result BI-RADS 1 or 2 (negative and benign findings) (14).

The exclusion criteria were: the age below 18 years old, previous history of any other cancer type, benign, suspicious or indeterminate biopsy result or not having performed mammography.

A total of 378 women were selected for the study, 181 healthy women (GCo group) and 197 women with breast cancer (GCa group). Only those women with ductal or invasive lobular carcinoma were included in GCa group. Women with *in situ* disease, or *Phyllodes* malignant or borderline breast tumor or benign disease biopsy were not included in the study (Figure 1).

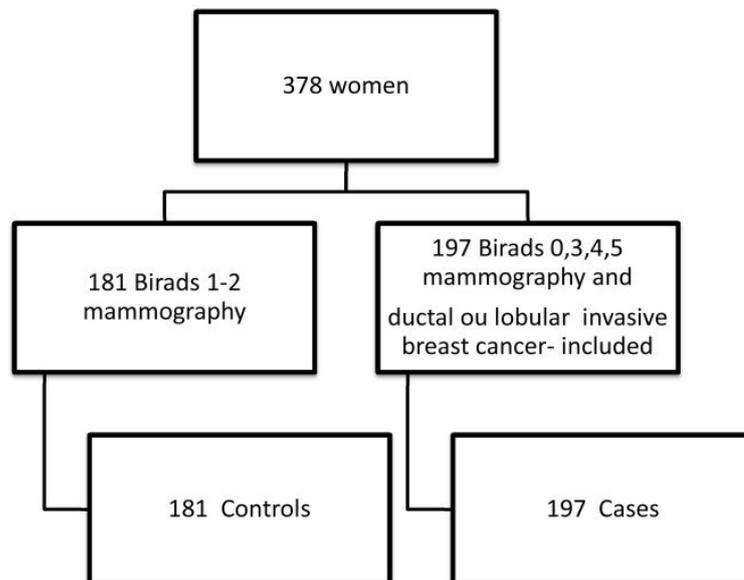


Figure 1 – Study design. Number of women selected in the case and control groups, according to inclusion and exclusion criteria.

Source: BIRADS (Breast Image Reporting and Data System) defined according to Eberl et al. (14).

Study design

Data collection was carried out in the ambulatory in two steps: In the first step, prior to diagnosis, nutritional interview, lifestyle characteristics, medical history (such as diabetes), family history data and anthropometric measurements were collected. In the second stage, after diagnosis, peripheral blood sample was collected for laboratory analysis.

The anthropometric assessment was performed considering the weight and percentage of fat using the Tanita Body Fat Monitor Scale (model TBF 531[®]) and

height was noted using the vertical stadiometer (Altura Exata[®]). The waist and hip circumferences were also measured and the body mass index (BMI) was calculated (12, 15).

A questionnaire previously validated by Pena et al. (12) was applied to the studied population to characterize the sample with regards to socioeconomic issues, medical history (such as diabetes), lifestyle, and food consumption.

Regarding the variables related to women's gynecological history, menarche and menopause age were requested. If they had children, the number of living children, abortion, breastfeeding, duration of breastfeeding for each child, age at first pregnancy, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy were also asked.

The patients provided information about lifestyle, as alcohol use, smoking behavior and physical activity. Those women who consumed at least one dose (10 g of alcohol) of any alcoholic beverage daily or more than 3 days a week were considered alcoholics (12, 16). Those who reported smoking at least one cigarette per day, regardless the time of use, were considered smokers (17). The practice of physical activity was assessed by the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) (18), short version, and the women were classified as sedentary, low active, or active (12).

Biochemical analyses

Blood samples (15 mL) were collected in opaque bottles containing EDTA at the Odette Valadares Maternity's ambulatory care on interview day. The blood was centrifuged to obtain plasma and stored at -80°C for further analysis.

Serum levels of vitamin D, calcium, phosphorus, and PTH were measured in 256 women. For the vitamin D dosage, the ABBOTT[®] chemiluminescence kit was used and the metabolite 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] was dosed (imprecision $\leq 10\%$, accuracy, 8,0 ng/mL detection limit, 8,0 - 160 ng/mL reference range). PTH was also dosed by chemiluminescence using the Beckman Coulter[®] Kit (imprecision $\leq 8\%$, accuracy, 1 pg/mL detection limit, 12–88 pg/mL reference range). Calcium and phosphorus were measured by colorimetric method according to the manufacturer's protocol (Beckman Coulter[®]) (Calcium; precision 0,95% coefficient of variation, detection limit 0,01 mmol/L, reference range 8,8 – 10,6 mg/dL, phosphorus: precision $<3\%$ CV, detection limit 1 mg/dL, reference range 3.7 – 7.2 mg/dL). The analyses were performed in the clinical laboratory of the Health Division at the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Statistical Analysis

The statistical analyses were carried out using Stata program, version 9.1. Kolmogorov Smirnov normality test was performed for each variable. The mean values for the variables net income, age, age at first pregnancy, age of menopause, patients' age when they performed the first mammography, weight, BMI, parathyroid hormone, calcium, phosphorus and vitamin D presented asymmetric distribution. Furthermore, Student's *t* test was used to evaluate the differences between the averages of the GCa and GCo groups. The Mann-Whitney test was used for determination of asymmetric distribution. In addition, the association between the breast cancer and each categorical variable was evaluated using the chi-square test. Univariate analysis (chi-square and raw odds ratio) and multivariate analysis were performed through multivariate logistic regression (cancer was considered dependent variable, and menopause, diabetes, age at first pregnancy, patients age when they made the first mammography, physical activity, income, contraceptive, body fat, vitamin D, alcoholism, breast cancer history family, nulliparity, age and breast-feeding were considered independent variables). A 5% level of significance was considered for the analysis.

Results

The characteristics of the women in each group are shown in Table 1. The women with breast cancer were older than healthy controls ($p < 0.001$). There was no difference between the groups regarding the level of education and rural or urban living. A total of 378 women were evaluated, with a median age of 51 years (44-59 years). Among them, 43.09% of women were from the rural zone and 29.63% had attended full middle school (full middle school, 7th grade, or more) (data not shown).

The average net income of the family and the minimum wage was assessed. Women from control group had higher income than women from case group ($p = 0.018$) (Table 1). In relation to reproductive factors, more women from GCo reported having at least one born child alive than the women from GCa ($p = 0.014$) (Table 1). There was no difference between the groups regarding breastfeeding, ($p = 0.120$) and use of hormone replacement therapy ($p = 0.45$). The contraceptive use was higher in control women ($p = 0.025$). The first term pregnancy equal to or more than 30 years old was higher in GCa group ($p = 0.024$) (Table 1).

Table 1 - Characteristics of women from case and control groups

Characteristics	n	Groups		P
		Case	Control	
Age (years) ^{a, **}	377	54 (48-62)	47.5 (42-53)	<0.001*
Average net income (RS) ^{a, **}	372	600 (350-1000)	700 (400-1200)	0.018*
Income in minimum wage ^{a, **}	362	1.714 (1-2.85)	2 (1.14-3.42)	0.018*
Income < RS700.00 (%) ^b	362	54.31	43.09	0.044*
Rural region (%) ^b	369	45.31	40.68	0.369
Schooling (full middle school/7th grade or more) (%) ^b	378	28.43	30.94	0.864
Previous history of benign breast disease (%) ^b	374	17.77	0	<0.001*
Family history of breast cancer (%) ^b	374	31.12	1.12	<0.001*
Age of first pregnancy (years) ^{a, **}	316	23 (19.5-26)	20 (18-24)	<0.001*
Age first pregnancy >=30 years (%) ^b	316	14.74	6.88	0.024*
Children (yes, %) ^b		79.70	88.95	0.014*
(n, %)		20.3	11.05	
Use of contraceptive (%) ^b	373	51.78	62.43	0.025*
Breast-feeding (%) ^b	371	74.62	82.32	0.120
Menopause (%) ^b	372	80.51	41.24	<0.001*
Age of first mammography (years) ^{a, **}	362	43 (39-52)	40 (36-46)	0.002*
High % body fat (%) ^b	363	48.11	58.43	0.049*
Weight (Kg) ^{a, **}	372	63.8 (56.8-75.2)	66.2 (57.2-75.6)	0.402
Body mass index (BMI) ^{a, **}	372	26.89 (23.57-30.73)	26.95 (24.08-30.49)	0.842
Diabetes mellitus (%) ^b		13.71	7.26	0.043*
Alcoholism (n, %) ^{b, ***}				<0.001*
Yes	56	31 (15.74)	25 (13.81)	
No	292	139 (70.56)	153 (84.53)	
No answer	30	27 (13.71)	3 (1.66)	
Physical activity (n, %) ^{b, ***}	375			0.001*
Sedentary lifestyle	167	102 (52.04)	65 (36.31)	
Mild	147	87 (44.39)	90 (50.28)	
Moderate	31	7 (3.57)	24 (13.41)	

^aMann Whitney, ^b χ^2 Test, ^{**}Median (interquartile interval), ^{***}estimated population size and percentage (n,%) are presented.

*Significant difference at P<0.05.

The average of age of women when they first underwent mammography was higher in the GCa group (43 years × 40 years, $p = 0.002$). Approximately 80.51% of cases and 41.24% of controls were in menopause ($p < 0.001$) (Table 1). However, no difference was observed for the age of menopause between the groups ($p = 0.61$). The mean age of menarche was the same in both groups approximately 13 years ($p = 0.611$) (data not shown).

Differences between groups were not found for anthropometric characteristics, like BMI, weight and waist-hip ratio (WHR) ($p=0.842$, $p=0.402$ and $p=0.464$). To assess the percentage of body fat, patients were classified as normal/eutrophic body fat or high body fat. More women of control group presented high percentage of body fat than in GCa ($p = 0.049$) (Table 1).

The lifestyle, current or previous smoking, alcoholism, and physical activity was assessed. In GCo group, 17.68% of women reported current smoking, while in GCa

group, only 12.69% reported smoking ($p = 0.014$). With regard to alcoholism, more women in GCo group did not consume alcohol in sufficient levels to configure alcoholism than in GCa ($p < 0.001$) In relation to the practice of physical activity, most of women from control group practiced mild physical activity. However, in case group, most of the women did not practice any physical activity. In GCo 13.41% had moderate physical activity, while in the GCa group 3.57% reported the same ($p = 0.001$) (Table 1).

The median value of vitamin D in GCo group was higher than GCa group ($p = 0.008$). In GCo group, 34.59% had vitamin D levels above 30ng/mL, while in the GCa group, only 21.95% had sufficient levels. Approximately 51.13 and 51.22% of controls and cases, respectively, had vitamin D levels considered as insufficient (between 21 and 29.9ng/mL); while 14.29% in GCo group and 26.83% in GCa group had deficient levels, less than 20 ng/mL ($p = 0.014$). The analysis of calcium, phosphorous, and PTH did not show any differences ($p > 0.05$) between the groups (Table 2).

Table 2 – Levels of vitamin D, calcium, phosphorus and PTH in case and control groups

Characteristics	n	Groups		P
		Case	Control	
Vitamin D (ng/mL) ^{a,**}	256	24.8 (20.5-29.3)	26.9 (22.3-32)	0.008*
Status of vitamin D ^b (n,%) [#]	256			0.014*
Deficient		33 (27.05)	19 (14.399)	
Insufficient		62 (50.82)	67 (50.76)	
Sufficient		27 (22.13)	46 (34.85)	
Calcium level (mg/dL) ^{a,**}	256	9.9 (9.6-10.3)	9.7 (9.4-10.1)	0.127
Phosphorus level (mg/dL) ^{a,**}	256	3.7 (3.3-4)	3.7 (3.4-4.2)	0.236
PTH level (pg/mL) ^{b,##}	256	8.5	9.0	0.660

^aMann Whitney, ^b χ^2 Test, ^{**}Median (interquartile interval), [#]mean, estimated population size (n) and percentage (%). ^{##}Mean.
*Significant difference at $P < 0.05$.

The results of the univariate analysis indicate a direct association between the disease and the age of women, nulliparity, age of first successful pregnancy, age the first mammography, *diabetes mellitus*, and family history of breast cancer. Inverse association was verified with moderate physical activity, percentage of body fat, use of hormonal contraceptive, and vitamin D levels ($p < 0.05$) (Table 3).

Table 3 – Association of patients’ characteristics and incidence of breast cancer among the study groups

Characteristics	OR	95% CI	P
Age	1.06	1.04-1.09	<0.001*
Menopause	5.89	3.70-9.36	<0.001*
Nulliparity	2.05	1.15-3.66	0.015*
Age at first successful pregnancy	1.08	1.03-1.13	0.001*
Age at first pregnancy > 30 years	2.34	1.10-4.99	0.027*
Age at first mammography	1.04	1.02-1.06	0.001*
Income	1.62	1.08-2.45	0.021*
First mammography performed after 40 years	1.93	1.27-2.94	0.002*
<i>Diabetes mellitus</i>	2.03	1.01-4.07	0.046*
Family history of breast cancer	39.76	9.55-165.52	<0.001*
Physical activity - Sedentary	1	-	-
Mild	0.62	0.40-0.95	0.027*
Moderate	0.19	0.08-0.46	<0.001*
High % body fat	0.66	0.44-0.99	0.049*
Use of hormonal contraceptive	0.62	0.41-0.93	0.022*
Alcoholism	1.37	0.77-2.43	0.289
Vitamin D	0.94	0.91-0.98	0.001*
Vitamin D levels- Deficient (<20)	1		
Insufficient (20-29,9)	0.53	0.28-1.03	0.062
Sufficient (>=30)	0.34	0.16-0.71	0.004*

OR, Odds Ratio; 95% CI, 95% Confidence Interval.

*Significant difference at $P < 0.05$.

Finally, a direct association was found between menopause ($OR = 5.17$, 95% CI = 2.72-9.80) and family history of breast cancer ($OR = 36.37$, 95% CI = 4.75-278.50). Moreover, an inverse association was also observed between vitamin D levels ($OR = 0.95$, 95%CI = 0.91-0.99) and moderate physical activity ($OR = 0.31$, 95%CI = 0.10-0.93) (Table 4).

Table 4 - Final model of multiple logistic regression analysis of breast cancer-related characteristics

Characteristics	OR	95% CI	P
Menopause	5.17	2.72 - 9.80	<0.001*
Vitamin D	0.95	0.91 - 0.99	0.012*
Mild physical activity	0.61	0.32 - 1.14	0.122
Moderate physical activity	0.31	0.10 - 0.93	0.037*
Family history of breast cancer	36.37	4.75 - 278.50	0.001*

OR, Odds Ratio; 95% CI, 95% Confidence Interval.

*Significant difference at $P < 0.05$.

Discussion

The results suggest that menopause (12 months or more of amenorrhea) is associated with breast cancer. GCa had more menopausal women than GCo. This result

was maintained in the final statistical model, even after the adjusted model for patient age. Despite the breast cancer patients were older than controls, it did not influence the association between breast cancer and menopausal status.

Although menopause is not considered a risk factor for breast cancer, the late menopause (after 55 years) is directed associated with the disease (19), due to longer exposure of endogenous hormones. The estrogen exposure has also been associated with conditions like nulliparity, late menopause age, early menarche and giving first birth older (20). There is an increased risk each year of late menopause, particularly in positive estrogen receptors tumors (21). Despite of it, this study did not show difference for the age of menopause ($p = 0.600$) and late menopause ($p = 0.083$) between GCa e GCo. This result is due the close menopause age between groups.

Age is considered a risk factor for breast cancer (22). In approximately 80% of cases, the disease occurs after age 50 (4). According to Howlader et al, the risk of developing breast cancer among American women increases 0.44% at 30 years, 2.38% at age 50 and 3.82% at 70 years (23). In this study, the patients of CaG had median age higher than controls, with a direct association with breast cancer. However, this association did not persist after the adjustment in the final model. In a systematic review, Cutler et al. (24) observed an average of cumulative breast cancer incidence of 0.22% each year of age in women less of 50 years and 0.23% per year among women either 50 years old or with surgically menopausal.

Family history of breast cancer is directly associated with the disease. Having a first degree relative with breast cancer is one of the most consistent risk factors for the disease (19,25). The breast cancer risk in lifetime is 7.8% in women without history family, and rises to 13.3 % with one case in family and 21.1% with two affected relatives (25). The increased risk of breast cancer is associated with different subtypes of the disease, both in cancers with hormone receptor positive and negative (26). Heredity accounts for about 27% of cases of breast cancer, for the sporadic cancer, most cases are related to the environment (27). Family history of breast cancer is also found in cases of hereditary breast cancer associated with gene mutations *BRCA1* and *BRCA2*, and other mutations, accounting for 5-10% of cases (28).

In our study more women in GCa were reported with family history of breast cancer than in GCo ($p < 0.001$) and there was a direct association with the disease (OR = 36.37). Moreover, only 1.12% of the patients in GCo presented cases of family history of breast cancer in first-degree relatives. This value is lower than the ones

reported in the national literature. For instance, Paiva et al. (29), in a case-control study observed a family history of breast cancer in 12.5% of the patients with breast cancer and in 13.1% of the controls. Matos et al. (30) also showed the prevalence of the disease in 2.3% mother, 3.9% sister and 0.2% daughter affected by the disease.

Some studies have shown that the practice of physical exercise reduces the risk of breast cancer (31-33). In United Kingdom, 3.4 % of post-menopausal breast cases in 2010 were associated with lack of exercise (34). Some possible mechanisms involved in breast cancer risk reduction are the reduction of hormone levels induced by exercise (35), body fat reduction (36,37), stimulation of antitumor immune activity and the reduction of insulin-like growth factors, which may increase cell division and inhibit cell death (35,37).

In our study, an inverse association was observed between the practice of moderate physical activity and breast cancer ($p < 0.001$). A greater number of GCo patients reported moderate physical activity practice ($p = 0.001$), while sedentary lifestyle was higher among the GCa. The moderate physical activity may have a protective effect against breast cancer according to the results.

The sedentary lifestyle is associated with 8% of breast cancer cases (38). Cohen et al. (39) in 2013 showed in white women that increased physical activity was associated with less chance of developing breast cancer, while sedentary lifestyle was associated with increased risk. The sedentarism is related with weigh gain, and cancer risk, including breast cancer, increases with increasing BMI (40). In a study with Japanese women, an inverse association with breast cancer was found among those who had the habit to walk more than an hour a day than those who walked less than an hour a day (33).

The benefits of practicing physical activity go beyond the disease prevention, also influencing the prognosis of breast cancer patients (41). Friedenreich et al. (42) observed that the practice of moderate to vigorous physical activity in post-menopausal women was enough to reduce the total body fat and adiposity. Therefore, this benefit may be related to the reduced risk of breast cancer in post-menopausal women.

Although there were a greater number of women practicing mild or moderate physical activity in the control group ($p = 0.001$), higher percentage of body fat (overweight or obese) was found in this group when compared to the GCa ($p = 0.049$). Thus, in this study, no association was observed between the level of physical activity practiced and the reduction of adiposity.

The GCo patients had higher levels of 25(OH)D than the GCa patients ($p = 0.008$) (Table 2). After stratification in deficient, insufficient, and sufficient vitamin D levels, the GCo group showed lower number of women with deficient levels and greater number of women with sufficient levels than GCa ($p = 0.014$) (Table 2). Besides, an inverse association with breast cancer in the final model ($OR = 0.95$, 95% CI 0.91 - 0.99, $p = 0.012$) was observed (Table 4). Similar to our study, Park et al. (43) also dosed the vitamin D levels and stratified the women in groups by the levels of vitamin D, as deficient, insufficient, and sufficient (20 ng/dl, 20–29.9 ng/dl, and 30 ng/dl, respectively). It was assessed the levels of 25(OH)D in Korean women with breast cancer and in the general population, and found a direct association with breast cancer in women with deficient vitamin D serum levels when compared to those with sufficient levels, with no variation of menopausal status.

In Brazil, studies have shown insufficient levels of vitamin D in the elderly. Camargo et al. (2014) found concentration of 25(OH)D of 24.8 ng/mL in patients aged 67.9 ± 8.6 years (44). Arantes et al. (2013) demonstrated deficient levels (<20 ng / mL) at 17% in women with age between 60 and 85 years old (45). Saraiva et al. (46) also found insufficient levels of 25(OH)D in 43.8% of outpatients and 71.2% of institutionalized elderly patients. Saraiva et al. (2005) found Vitamin D deficiency in 15.4% and insufficiency in 41.9% of patients aged 79.1 ± 5.9 years (47).

According to the Nurses' Health Study results, comparing the highest quintile with the lowest quintile of vitamin D in patients, there was a 30% breast cancer reduction risk (48), with even more impact in postmenopausal women aged over 60 years. The vitamin D action in the risk reduction of breast cancer could be explained by the inhibition and control of mammary cell growth demonstrated in animal model (49,50), by the antiproliferative action of 1,25 (OH)₂D in tumor-derived endothelial cells, by modulating the cell cycle, and by affecting tumor cell signaling (51). Vitamin D also has action on the expression of genes involved in growth, differentiation and apoptosis (52). The overexpression of p73 is associated with induction of apoptosis in animals and in humans and can be influenced by calcitriol (52,53). The presence of 25-hydroxyvitamin D3 1- α -hydroxylase (CYP27B1) in mammalian cells indicate that local production of vitamin D would lead to a paracrine or autocrine action in mammary cells protection (54). In the present study, breast cancer patients with low vitamin D levels, would probably have less protection against malignant transformation and tumor growth.

The menopausal *status* seems to influence the association between vitamin D and breast cancer. However, there is no consensus in the literature. In a recent meta-analysis evaluating nine prospective studies, no association of risk reduction was found for breast cancer in pre-menopausal women, however, for post-menopausal women a decrease of risk, especially for 25(OH)D levels between 27 and 35 ng/mL was verified (55). The protective effect of adequate levels of this vitamin in preventing breast cancer among post-menopausal women was demonstrated by Crew et al. (56). Other studies have found benefit in reducing breast cancer risk in pre-menopausal women with normal weight, mainly with an intake of 5 µg/day of vitamin D (57,58). Abbas et al.(59) found an inverse association between breast cancer in pre-menopausal women and vitamin D levels, without interaction with BMI and family history of breast cancer, also demonstrated among Japanese women.

Fedirko et al. (60) also demonstrated an inverse association between circulating levels of vitamin D and breast cancer among pre-and post-menopausal Mexican women in a case-control study. This study had a greater number of menopausal women among the cases. The 25(OH)D₃ average was 18.6 ng/mL in the cases and 21.9 ng/mL in controls. Furthermore, among the controls, 36% of women had deficient vitamin D levels (25(OH)D₃ <20 ng/mL) and 9% sufficient levels (>30 ng/mL). Similarly, in this study, in GCa group, a greater number of menopausal women was observed. Among GCo patients, 14.29% had deficient levels and 34.59% sufficient levels of vitamin D (Table 2).

The serum levels of calcium, phosphorus and PTH did not present difference between case and control groups, independent of vitamin D status and despite the vitamin D levels. The calcium and the vitamin D supplement intake may have a role in reduction of breast cancer risk (61-63), but more studies are needed to confirm this association.

The direct association was found in this study between *diabetes mellitus* and breast cancer in univariate analysis, but it did not remain after the final model analysis.

Conclusion

This case-control study demonstrated a direct association of menopause and family history of breast cancer in women with breast cancer independent of the women age.

An inverse association was found between the serum levels of 25(OH)D and breast cancer. Despite the vitamin D levels found in women with breast cancer being lower than those of the control group, both averages were stratified as sufficient level. The vitamin D status is not yet used for breast cancer screening in women. However, this result suggests that vitamin D may have a positive impact as strategy of breast cancer prevention or reduction. Thus, an interesting strategy would be to screening women with insufficient and deficiency vitamin D status to provide supplementation of this vitamin. Another strategy could be the encouragement of physical activity practice for health improvement, since the practice of moderate to intense physical activity was inversely associated with breast cancer. Thus, our findings will contribute to fill an important gap in the scientific literature.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) from Brazil for financially supporting this project.

Conflict of Interest

None of the authors have any conflicts of interest.

References

1. WHO. Breast cancer: prevention and control. 2014.
2. Rossi, M., McLaughlin, J., Laggiou, P., Bosetti, C., Talamini, R., Lipworth, L., et al., *Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy*. Ann Oncol. 2009; 20:374-78.
3. Lacey, J., Kreimer, A., Buys, S., Marcus, P., Chang, S.-C., Leitzmann, M., et al., *Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort*. BMC Cancer. 2009;9(1):84.
4. INCA Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*, Ministério da Saúde; 2014.
5. Anderson, L.N., Cotterchio, M., Kirsh, V.A., Knight, J.A., *Ultraviolet Sunlight Exposure During Adolescence and Adulthood and Breast Cancer Risk: A Population-based Case-Control Study Among Ontario Women*. Am. J. Epidemiol. 2011 August 1, 2011;174(3):293-304.

6. Grant, W., *Update on Evidence that Support a Role of Solar Ultraviolet-B Irradiance in Reducing Cancer Risk*. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(1):140-6.
7. Knight, J., Lesosky, M., Barnett, H., Raboud, J., Veith, R., *Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(3):422 - 29.
8. Welsh, J., *Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer*. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;347:6.
9. Norman, A.W., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health*. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):491S-99S.
10. Paula, F.J.A., *A insuficiência óssea na doença renal crônica: papel do paratormônio*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(9):1059.
11. Paula, F.J., Lanna, C.M., Shuhamam T., Foss, M.C., *Effect of metabolic control on parathyroid hormone secretion in diabetic patients*. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(9):7.
12. Pena, G.G., Maia, Y.C.P., Mendes, M.C.S., Furtado, W.R., Machado-Coelho, G.L.L., Freitas, R.N., *Physical Activity Is Associated with Malignant and Benign Breast Diseases in Low-Income Brazilian Women*. *Nutr Cancer*. 2013;66(4):707-15.
13. Abranches, M.V., Mendes, M.C.S., Pena, G.G., Paiva Maia, Y.R., Ribeiro S.M.R., Franceschini S.C.C., et al., *Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer*. *Eur J Cancer Prev*. 2011;20(5):403-10.
14. Eberl, M.M., Fox, C.H., Edge, S.B., Carter, C.A., Mahoney, M.C., *BI-RADS Classification for Management of Abnormal Mammograms*. *J Am Board Fam Med*. 2006;19(2):161-64.
15. WHO. WHO Expert Committee on Physical Status : the Use and Interpretation of Anthropometry(1993: Geneva, Switzerland). *Physical status: the use of and interpretation of anthropometry*. Geneva, World Health Organization, 1995. Available from: www.who.int/iris/handle/10665/37003.
16. WHO. *Global Status report on alcohol-World Health Organization*. Geneva; 2004; Available from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf
17. CDC. *Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress*. A Report of the Surgeon General Rockville, Maryland: Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Office on Smoking and Health; 1989. p. 89-8411.
18. CELAFISCS. Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul. 2004; Available from: www.celafiscs.com.br.

19. American Cancer Society. *What are the risk factors for breast cancer?* 2015; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>.
20. Lippman, M.E., Krueger, K.A., Eckert, S., Sashegyi, A., Walls, E.L., Jamal, S., et al., *Indicators of Lifetime Estrogen Exposure: Effect on Breast Cancer Incidence and Interaction With Raloxifene Therapy in the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation Study Participants*. J Clin Oncol. 2001;19(12):3111-16.
21. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol. 2012;13(11):1141-51.
22. WHO World Health Organization. *Breast cancer: prevention and control*. 2014. Available from : <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index3.html> [cited 2014 12/31/2014].
23. Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2012 [cited 2015 09/01/2015]; http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 11 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 12.].
24. Cutler, W., Bürki, R., Kolter, J., Chambliss, C., Friedmann, E., Hart, K., *Invasive Breast Cancer Incidence in 2,305,427 Screened Asymptomatic Women: Estimated Long Term Outcomes during Menopause Using a Systematic Review*. PLoS ONE. 2015;10(6):e0128895.
25. Phipps, A.I., Buist, D.S.M., Malone, K.E., Barlow, W.E., Porter, P.L., Kerlikowske, K., et al. *Family history of breast cancer in first-degree relatives and triple-negative breast cancer risk*. Breast Cancer Res Treat. 2010;126(3):671-78.
26. Bethea, T.N., Rosenberg, L., Castro-Webb, N., Lunetta, K.L., Sucheston-Campbell, L.E., Ruiz-Narváez, E.A., et al. *Family History of Cancer in Relation to Breast Cancer Subtypes in African American Women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2016;25(2):366-73.
27. Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., et al., *Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland*. N Engl J Med. 2000;343(2):78-85.
28. Fernandes, G.C., Michelli, R.A.D., Scapulatempo-Neto, C., Palmero, E.I., *Association of polymorphisms with a family history of cancer and the presence of germline mutations in the BRCA1/BRCA2 genes*. Hered Cancer Clin Pract. 2016;14:2.
29. Paiva, C.E., Ribeiro, B.S., Godinho, A.A., Meirelles, R.S.P., Silva, E.V.G., Marques, G.D.A., et al., *Fatores de Risco para Câncer de Mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle*. Rev. Bras. Cancerol . 2002;48(2):231-37.

30. Matos, J., Pelloso, S., Carvalho, M., *Prevalence of risk factors for breast neoplasm in the city of Maringá, Paraná state, Brazil*. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2010;18(3):352-59.
31. Maruti, S., Willett, W., Feskanich, D., Rosner, B., Colditz, G., *A Prospective Study of Age-Specific Physical Activity and Premenopausal Breast Cancer*. J Natl Cancer Inst. 2008;100(10):728-37.
32. Eliassen, A., Hankinson, S.E., Rosner, B., Holmes, M.D., Willett, W.C., *Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women*. Arch Intern Med. 2010;170(19):1758-64.
33. Suzuki, S., Kojima, M., Tokudome, S., Mori, M., Sakauchi, F., Fujino, Y., et al., *Effect of Physical Activity on Breast Cancer Risk: Findings of the Japan Collaborative Cohort Study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(12):3396-401.
34. Parkin, D.M., *Cancers attributable to inadequate physical exercise in the UK in 2010*. Br J Cancer. 2011;105(Suppl 2):S38-S41.
35. Rundle, A., *Molecular Epidemiology of Physical Activity and Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(1):227-36.
36. Friedenreich, C.M., Cust, A.E., *Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects*. Br J Sports Med. 2008;42(8):636-47.
37. Friedenreich, C.M., Orenstein, M.R., *Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms*. J Nutr. 2002;132(11):3456S-64S.
38. Zhou, Y., Zhao, H., Peng, C., *Association of sedentary behavior with the risk of breast cancer in women: update meta-analysis of observational studies*. Ann Epidemiol. 2015;25(9):687-97.
39. Cohen, S.S., Matthews, C.E., Bradshaw, P.T., Lipworth, L., Buchowski, M.S., Signorello, L.B., et al., *Sedentary behavior, physical activity, and likelihood of breast cancer among black and white women: a report from the Southern Community Cohort Study*. Cancer Prev. Res. 2013;6(6):566-76.
40. Reeves, G.K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E., Bull, D., *Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study*. BMJ. 2007;335(7630):1134.
41. Keegan, T.H.M., Milne, R.L., Andrulis, I.L., Chang, E., Sangaramoorthy, M., Phillips, K.-A., et al., *Past recreational physical activity, body size, and all-cause mortality following breast cancer diagnosis: results from the breast cancer family registry*. Breast Cancer Res Treat. 2010;123(2):531-42.
42. Friedenreich, C.M., Neilson, H.K., O'Reilly, R., et al., *Effects of a high vs moderate volume of aerobic exercise on adiposity outcomes in postmenopausal women: A randomized clinical trial*. JAMA Oncol. 2015;1(6):766-76.

43. Park, S., Lee, D., Jeon, J., Ryu, J., Kim, S., Kim, J., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and increased risk of breast cancer among Korean women: a case-control study*. Breast Cancer Res Treat. 2015;152(1):147-54.
44. Camargo, M.B., Kunii, L.S., Hayashi, L.F., Muszkat, P., Anelli, C.G., Marin-Mio, R.V., et al. *Modifiable factors of vitamin D status among a Brazilian osteoporotic population attended a public outpatient clinic*. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014;58:572-82.
45. Arantes, H.P., Kulak, C.A.M., Fernandes, C.E., Zerbini, C., Bandeira, F., Barbosa, I.C., et al., *Erratum to: Correlation between 25-hydroxyvitamin D levels and latitude in Brazilian postmenopausal women: from the Arzoxifene Generations Trial*. Osteoporos Int. 2013; 24:2.
46. Saraiva, G.L., Cendoroglo, M.S., Ramos, L.R., Araújo, L.M.Q., Vieira, J.G.H., Maeda, S.S., et al., *Prevalência da deficiência, insuficiência de vitamina D e hiperparatiroidismo secundário em idosos institucionalizados e moradores na comunidade da cidade de São Paulo, Brasil*. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007;51:437-42.
47. Saraiva, G.L., Cendoroglo, M.S., Ramos, L.R., Araújo, L.M.Q., Vieira, J.G.H., Kunii, I., et al., *Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of São Paulo (23 o 34'S), Brazil*. Osteoporos Int. 2005;16(12):1649-54.
48. Giovannucci, E., *Vitamin D and Cancer Incidence in the Harvard Cohorts*. Ann Epidemiol. 2009;19(2):84-88.
49. Fleet, J.C., *Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention*. Mol. Aspects Med. 2008;29(6):388-96.
50. Gross, M., Kost, S.B., Ennis, B., Stumpf, W., Kumar, R., *Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on mouse mammary tumor (GR) cells: Evidence for receptors, cellular uptake, inhibition of growth and alteration in morphology at physiologic concentrations of hormone*. J. Bone Miner. Res. 1986;1(5):457-67.
51. Bernardi, R.J., Johnson, C.S., Modzelewski, R.A., Trump, D.L., *Antiproliferative Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Vitamin D Analogs on Tumor-Derived Endothelial Cells*. Endocrinology. 2002;143(7):2508-14.
52. Mocellin, S., *Vitamin D and cancer: Deciphering the truth*. Biochim Biophys Acta. 2011;1816(2):172-78.
53. Ma, Y., Yu, W.-D., Hershberger, P.A., Flynn, G., Kong, R.-X., Trump, D.L., et al., *1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates cisplatin antitumor activity by p73 induction in a squamous cell carcinoma model*. Mol. Cancer Ther. 2008;7(9):3047-55.
54. Welsh J. *Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer*. Mol. Cell. Endocrinol. 2011;347(1-2):55-60.

55. Bauer, S.R., Hankinson, S.E., Bertone-Johnson, E.R., Ding, E.L., *Plasma Vitamin D Levels, Menopause, and Risk of Breast Cancer: Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies*. *Medicine*. 2013;92(3):123-31 doi:10.1097/MD.0b013e3182943bc2.
56. Crew, K., Shane, E., Cremers, S., McMahon, D., Irani, D., Hershman, D., *High prevalence of vitamin D deficiency despite supplementation in premenopausal women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy*. *J Clin Oncol*. 2009;27(13):2151 - 56.
57. Abbas, S., Linseisen, J., Chang-Claude, J., *Dietary Vitamin D and Calcium Intake and Premenopausal Breast Cancer Risk in a German Case-Control Study*. *Nutr Cancer*. 2007;59(1):54-61.
58. Lee, M.-S., Huang, Y.-C., Wahlqvist, M.L., Wu, T.-Y., Chou, Y.-C., Wu, M.-H., et al., *Vitamin D Decreases Risk of Breast Cancer in Premenopausal Women of Normal Weight in Subtropical Taiwan*. *J Epidemiol*. 2011;21(2):87-94.
59. Abbas, S., Chang-Claude, J., Linseisen, J., *Plasma 25-hydroxyvitamin D and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study*. *Int J Cancer*. 2009;124(1):250-55.
60. Fedirko, V., Torres-Mejía, G., Ortega-Olvera, C., Biessy, C., Angeles-Llerenas, A., Lazcano-Ponce, E., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: results of a large population-based case-control study in Mexican women*. *Cancer Causes Control*. 2012;23(7):1149-62.
61. Lappe, J.M., Travers-Gustafson, D., Davies, K.M., Recker, R.R., Heaney, R.P., *Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial*. *Am. J. Clin. Nutr*. 2007;85(6):1586-91.
62. McCullough, M.L., Rodriguez, C., Diver, W.R., Feigelson, H.S., Stevens, V.L., Thun, M.J., et al., *Dairy, Calcium, and Vitamin D Intake and Postmenopausal Breast Cancer Risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2005;14(12):2898-904.
63. Lin, J., Manson, J.E., Lee, I., Cook, N.R., Buring, J.E., Zhang, S.M., *Intakes of calcium and vitamin d and breast cancer risk in women*. *Arch Intern Med*. 2007;167(10):1050-59.

3.3. Artigo 3 (Original: submetido à Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde)

FATORES RELACIONADOS À IDADE DE REALIZAÇÃO DO PRIMEIRO EXAME DE MAMOGRAFIA EM MULHERES ATENDIDAS EM UM SERVIÇO PÚBLICO DE BELO HORIZONTE

Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sedyama, Manoela Maciel dos Santos Dias, Mariana de Moura e Dias, Milene Cristine Pessoa, Renata Nascimento Freitas, Sérgio Oliveira de Paula, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Resumo: O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer nas mulheres, e a realização do exame de mamografia é o melhor método de rastreamento para diagnosticar precocemente essa doença. Conhecer os fatores associados à idade de realização do primeiro exame de mamografia na população brasileira pode ajudar na identificação de condições relacionadas à realização inadequada do exame, com prejuízo no rastreamento e detecção do câncer de mama. Objetivo: Avaliar os fatores associados à realização da primeira mamografia em um serviço público de Belo Horizonte, Minas Gerais. Métodos: foram selecionadas 378 mulheres encaminhadas para um serviço de referência em mastologia. Medidas antropométricas foram aferidas e um questionário, com perguntas sobre estilo de vida, presença de comorbidades e aspectos relacionados à vida reprodutiva, foi aplicado. Resultados: a procedência urbana, o maior nível de escolaridade e renda, a pré-menopausa, a ausência de terapia de reposição hormonal, de *diabetes mellitus* e de história familiar de câncer de mama, o uso de contraceptivo oral, o sobrepeso ou obesidade e o tabagismo apresentaram associação ($p < 0,05$) com realização da primeira mamografia com idade mais jovem. Conclusão: sugere-se a existência de associação direta entre a realização precoce da mamografia e o maior nível de escolaridade, a menopausa e a obesidade. Já a procedência rural, o uso de contraceptivos orais e a baixa % de gordura corporal apresentaram associação inversa, sugerindo a necessidade de estratégias diferenciadas de acordo com as características da população, para garantir a realização da mamografia de maneira adequada, levando em consideração não apenas a idade das mulheres, mas também a condição social e a presença de fatores de risco para a doença.

Palavras-chave: Mamografia, epidemiologia, câncer de mama.

Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a detecção precoce continua a ser a pedra angular de controle do câncer de mama¹. Apesar dos avanços no conhecimento científico e aparatos utilizados nas intervenções, ainda hoje o diagnóstico é tardio, com mortalidade elevada em todo o mundo, sendo a quinta causa de óbito por câncer no mundo².

A estimativa brasileira de casos novos de câncer de mama para o ano 2016 é de 57.960 casos novos, com a mortalidade crescente no Brasil nas últimas décadas

chegando a 12,66 mulheres a cada 100.000 habitantes³. Existe no país um programa de rastreamento mamográfico nacional, através da prevenção secundária na população assintomática, objetivando o diagnóstico precoce e a redução da mortalidade⁴. No Brasil, fatores como baixa renda, idade avançada e grupo étnico podem contribuir para a pouca adesão à realização rotineira do exame de mamografia⁵.

A mamografia é o método mais efetivo para o diagnóstico precoce da doença, além de ser o único exame de rastreamento com impacto comprovado na redução da mortalidade pelo câncer de mama^{1, 6}. A redução do risco de desenvolver câncer de mama com o rastreamento mamográfico em geral chega a 19%, variando desde 15% naquelas mulheres na faixa dos 40 anos até 32% entre aquelas na faixa dos 60 anos. No entanto, há um risco cumulativo de exame falso positivo de 61% para as mulheres entre 40 e 50 anos, em rastreamento mamográfico anual⁷.

Segundo o *American Cancer Society*, as mulheres com risco médio para a doença devem iniciar o rastreamento aos 45 anos, de maneira regular⁸. Sendo a idade um fator de risco conhecido para o câncer de mama e, muitas vezes, o único fator de risco identificado^{1, 9}. Em mulheres com idade acima dos 70 anos, a mamografia deverá se estender bianualmente quando houver boas condições de saúde⁸. De acordo com Howlader et al., o risco de desenvolver câncer de mama entre mulheres americanas é crescente com a idade, chegando a 3,82% aos 70 anos¹⁰.

Conhecer as características da população submetida ao exame de mamografia pode ajudar a identificar os fatores associados à realização do exame ou, mesmo, aqueles relacionados à pouca adesão ao programa de rastreamento mamográfico do Ministério da Saúde.

Com base no exposto, este estudo tem como objetivos analisar os fatores associados à idade de realização da primeira mamografia e identificar o perfil de mulheres que realizam precocemente o exame no Sistema Único de Saúde, na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Material e Métodos

População

Este estudo foi realizado com mulheres encaminhadas para a realização de mamografia no Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), na cidade de Belo Horizonte, MG, durante um período de seis meses. Aquelas que aceitaram participar do estudo

assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo seguiu a Declaração de Helsinki, foi aprovada pelo Comitê Nacional de Ética em pesquisa (protocolo número: 1889/2005).

Os dados das mulheres que relataram já terem realizado exame de mamografia prévia ou terem feito o primeiro exame de mamografia na época da entrevista foram avaliados. Mulheres com idade inferior a 18 anos, ou que nunca realizaram exames de mamografia ou que não se recordavam da idade quando fez o primeiro exame foram excluídas do estudo. Assim, 378 mulheres foram incluídas e aceitaram participar do estudo.

Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada no ambulatório da Maternidade Odete Valadares. Primeiramente, foram coletados os dados de entrevista, utilizando-se o questionário previamente validado^{11, 12}.

Na entrevista foram coletadas informações socioeconômicas, como: procedência, situação conjugal, grau de escolaridade, tipo de ocupação, renda líquida familiar mensal aproximada e *per capita*, número de membros da família. As pacientes também responderam sobre sua história clínica (presença de diabetes, gota ou insuficiência renal, peso habitual, peso aos 18 anos, ganho ou perda de peso desde os 18 anos, história prévia de doença benigna e história familiar de câncer de mama). Sobre as variáveis relacionadas à história ginecológica da mulher, foi questionado sobre a data da menarca, a idade da menopausa, o número de filhos, o abortamento, a amamentação, o tempo de amamentação de cada filho, a idade da primeira gestação, o uso de contraceptivo oral e a terapia de reposição hormonal. A avaliação antropométrica foi realizada usando-se a balança eletrônica TANITA® e o antropômetro vertical Alturaexata® (peso, altura, IMC, circunferência da cintura e do quadril), e a composição corporal (% de gordura corporal) foi calculada utilizando a bioimpedância elétrica vertical TANITA®-Tanita Body Fat Monitor Scale antes de qualquer diagnóstico dado às pacientes. As pacientes foram classificadas como eutróficas, sobrepeso e obesas, de acordo com o IMC calculado ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$, $25 \text{ kg/m}^2 \leq IMC < 30 \text{ kg/m}^2$ e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, respectivamente) e em baixa (baixo peso/eutrofia) ou alta % de gordura corporal (sobrepeso/obesidade), de acordo com o % de gordura corporal conforme a idade das pacientes¹². Em relação ao estilo de vida das

pacientes, avaliaram-se também, por meio de questionário, o hábito do tabagismo e etilismo e a prática de atividade física.

Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Stata*, versão 9.1. Para cada variável foi testada a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram avaliadas com o teste *t*, de Student, e aquelas de distribuição não normal, pelo teste de Mann-Whitney. A associação entre o desfecho (idade de realização da primeira mamografia) e cada variável categórica foi avaliada usando o teste X^2 . Foram realizadas as análises univariadas (qui-quadrado e *odds ratio* bruta) e a análise multivariada (regressão logística), avaliando-se a associação entre a variável desfecho e a realização da mamografia com idade inferior a 40 anos com os fatores em estudo. As variáveis que, na análise univariada, mostraram-se associadas com a idade de realização da primeira mamografia, com nível de significância observado inferior ou igual a 0,20 no teste do qui-quadrado ($p \leq 0,20$), foram selecionadas para a análise multivariada por meio da regressão logística. Foi considerado o nível de significância de 5%.

Resultados

Foram avaliadas 378 mulheres, com mediana de idade de 51 anos (44-59 anos). Dessas, a maioria eram provenientes da zona urbana, com relacionamento conjugal e com baixa escolaridade (Ginásio Incompleto, menos de sete anos de estudo) (Tabela 1).

A história pregressa de doença benigna da mama foi relatada por 9,25% das entrevistadas e a história familiar de câncer de mama, por 16,66%. A nuliparidade estava presente em 15,87%, e o aleitamento materno foi relatado por maior número de pacientes. A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) foi, ou era, realizada por 16,71% das mulheres, sendo 21,83% das menopausadas, e 22,58% das pacientes com histórico familiar de câncer de mama relataram TRH (Tabela 1).

Tabela 1 – Características sociodemográficas e antropométricas, relacionadas à vida reprodutiva e estilo de vida das mulheres

Características	n	%	Mediana (p25 – p75)	Média (DP)
Idade (anos)			51 (44-59)	52 (±)
Escolaridade < 7 anos estudo	264	69,84		
≥ 7 anos de estudo ²	112	29,90		
Zona Rural	159	40,06		
Zona Urbana	210	55,55		
Situação conjugal: Com cônjuge	295	78,04		
Sem cônjuge	80	21,16		
Renda em Salário mínimo			2 (1,01-3,43)	2,67
História prévia de doença benigna da mama (sim)	35	9,25		
História familiar de câncer de mama (sim)	63	16,66		
Idade da primeira gestação (anos)			21 (19-25)	22,41
Filhos: (sim)	318	84,12		
(não)	60	15,87		
Uso de contraceptivos orais (sim)	215	56,88		
Terapia de Reposição Hormonal (sim)	62	16,40		
Idade da Menarca			13 (12-14)	13,2
Menopausa (sim)	230	60,84		
Idade da primeira mamografia (total de mulheres)			42 (37-49)	43,85
Primeira mamografia ≤ 40 anos	164	43,39		
Primeira mamografia > 40 anos	198	52,38		
Amamentação (sim)	296	78,31		
Diabetes (sim)	40	10,58		
Etilismo (sim)	56	14,81		
(não)	292	69,31		
Tabagismo (sim)	84	22,22		
Alta % de gordura corporal	193	51,05		
Atividade física: Sedentarismo	167	44,17		
Atividade leve	177	46,83		
Atividade moderada	31	8,20		
Eutrofia (IMC < 25 kg/m ²)	117	30,95		
Sobrepeso/obesidade (IMC ≥ 25 kg/m ²)	246	65,07		

IMC - Índice de Massa Corporal.

A idade de realização da primeira mamografia foi menor entre as mulheres que residiam na área urbana ($p < 0,001$) em relação às da área rural; naquelas com maior escolaridade ($p < 0,001$); com maior renda ($p = 0,007$); pré-menopausadas ($p < 0,001$); que não realizaram terapia de reposição hormonal ($p < 0,001$); que usavam ou relataram uso de anticoncepcionais orais ($p < 0,001$); e entre as tabagistas ($p < 0,001$). No entanto, observou-se que a idade de realização da primeira mamografia foi maior entre as pacientes portadoras de *Diabetes melittus* e com história familiar de câncer de mama, em comparação com aquelas sem essa característica ($p = 0,001$ e $p = 0,013$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 – Idade de realização da primeira mamografia (anos) de acordo com as características avaliadas

Variável		Mediana (p25 – p75)	IIQ	p
Procedência*	Urbana	40	35-47	<0,001
	Rural	44,5	40-52	
Situação conjugal*	Sem cônjuge	43	39-50	0,400
	Com cônjuge	41	37-48	
Escolaridade*	< 7 anos estudo	44	40-50	<0,001
	≥ 7 anos estudo	39	35-43	
Filhos*	Sim	41	37-48	0,140
	Não	44	38-52	
Renda*	< R\$700	45	39-50	0,007
	> R\$700	40	36-47	
Primeira gestação ≥30 anos*	Sim	45	40-48	0,160
	Não	41	37-48	
Menarca*	≥ 13anos	42	38-49	0,160
	< 13 anos	40	36-48	
Menopausa*	Sim	46	40-54	<0,001
	Não	40	35-42	
Amamentação*	Sim	41	37,5-48	0,110
	Não	45	37,5-52	
TRH*	Sim	46	40-53	<0,001
	Não	41	36-48	
Contraceptivos hormonais*	Sim	40	35-46	<0,001
	Não	45	40-55	
<i>Diabetes mellitus*</i>	Sim	48,5	41-58	<0,001
	Não	41	36-48	
HP doença benigna da mama*	Sim	44	38-51	0,290
	Não	41	37-48	
HF de câncer de mama*	Sim	45	40-54	0,013
	Não	41	36-48	
Atividade física [#]	Sedentarismo	42	37-50	0,890
	Leve	42	37-48	
	Moderada	43	40-48	
% gordura corporal*	Alta	41	36-47	0,012
	Baixa	43	39-50	
IMC [#]	Eutrofia	40	36-46	0,220
	Sobrepeso	42	38-49	
	Obesidade	42	38-50	
Etilismo*	Sim	40	35-49	0,220
	Não	42	38-48	
Tabagismo*	Sim	40	35-46	0,010
	Não	42	38-50	

* Mann Whitney, # Kruskal Wallis, IIQ - Intervalo inter quartil, 25-75, TRH - Terapia de Reposição Hormonal, HP - história progressiva, HF - história familiar e IMC - índice de massa corporal.

Tabela 3 – Características das pacientes e sua associação com a idade precoce de realização da primeira mamografia

Variável	OR	95% IC	p
Procedência rural	0,366	0,239-0,566	< 0,001
Situação conjugal	1,500	0,895-2,514	0,124
Mais de 7 anos de estudo	3,622	2,246-5,843	< 0,001
Ausência de filhos	0,661	0,369-1,184	0,164
Renda maior	1,908	1,250-2,911	0,003
Idade da primeira gestação a termo	1,411	0,898-2,217	0,136
Menarca	0,673	0,437-1,035	0,071
Idade da primeira gestação > 30 anos	1,044	0,998-1,091	0,060
Menopausa	4,259	2,705-6,706	< 0,001
TRH	2,220	1,225-4,019	0,009
<i>Diabetes mellitus</i>	0,287	0,128-0,645	0,003
HP doença benigna da mama	1,587	0,892-2,823	0,116
HF câncer de mama	1,655	0,938-2,920	0,082
Atividade física			
{ Sedentarismo			
{ Leve	0,926	0,600-1,428	0,728
{ Moderada	0,839	0,388-1,814	0,655
Alta % de gordura corporal	0,698	0,457-1,066	0,096
Uso de contraceptivo hormonal	0,477	0,311-0,734	0,001
Tabagismo	0,964	0,939-0,991	0,008
IMC			
{ Sobrepeso	1,416	0,861-2,327	0,170
{ Obesidade	1,469	0,861-2,504	0,158
Etilismo	0,669	0,374-1,195	0,174

OR - Odds ratio, CI - intervalo de confiança, TRH - Terapia de Reposição Hormonal, HP - história progressa, HF - história familiar e IMC - índice de massa corporal.

Na Tabela 4, pode-se verificar que a realização precoce da primeira mamografia esteve associada diretamente com a obesidade, com o maior grau de escolaridade e com a menopausa, enquanto a procedência da zona rural da paciente, a baixa % de gordura corporal (baixo peso e eutrofia) e a ausência do uso de contraceptivos orais foram associadas inversamente com a realização do exame.

Tabela 4 – Modelo final da análise por regressão logística múltipla das características relacionadas à idade de realização da primeira mamografia antes dos 40 anos

Variável	OR	95% IC	p	
Menopausa	2,80	1,62 - 4,87	<0,001 [#]	
Procedência rural	0,50	0,29 - 0,87	0,013 [#]	
Mais de 7 anos de estudo	2,55	1,35 - 4,83	0,004 [#]	
Uso de contraceptivo oral	0,56	0,32- 0,98	0,041 [#]	
Baixa % de gordura corporal	0,41	0,20 - 0,87	0,020 [#]	
IMC	Sobrepeso	2,07	0,96 - 4,44	0,062
	Obesidade	3,41	1,33 - 8,79	0,011 [#]

Diferença significativa para $p < 0,05$, OR - Odds Ratio, CI - intervalo de confiança e IMC - índice de massa corporal.

Discussão

Neste estudo, 164 mulheres (43,39%) realizaram a primeira mamografia com idade inferior a 40 anos. Fatores como tabagismo, renda, escolaridade, presença de comorbidade, procedência e fatores relacionados ao ciclo menstrual dessas mulheres foram associados à realização precoce do exame. O rastreamento mamográfico assintomático de mulheres entre 40 e 49 anos foi avaliado em um serviço público no Brasil, encontrando-se baixa frequência de diagnóstico de câncer de mama¹³. Portanto, a realização da mamografia com idade inferior a 40 anos na população estudada pode não refletir aumento no diagnóstico de câncer de mama assintomático.

A população avaliada nesse estudo apresentou idade de realização da primeira mamografia inferior à preconizada para início de rastreamento mamográfico pelo Ministério da Saúde (MS)^{14, 15}. Atualmente, o MS recomenda o exame clínico anual das mamas a partir dos 40 anos e, em casos alterados, complementar com a mamografia. O rastreamento mamográfico bilateral deverá ser realizado a partir dos 50 anos, com intervalo máximo de dois anos. Caso a mulher pertença a algum grupo de risco elevado para essa doença, o exame clínico da mama e a mamografia unilateral devem ser realizados anualmente a partir dos 35 anos^{4, 14}. São considerados risco aumentado para câncer de mama, a presença de caso da doença em parente de primeiro grau (unilateral) com idade inferior a 50 anos, a presença de história familiar de câncer de mama masculino, de câncer de mama bilateral ou de ovário e os pacientes com história prévia de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ*⁴.

Pereira et al.¹⁶, em revisão sobre a idade de realização e periodicidade da mamografia, ue o exame tenha regularidade bianual entre mulheres com idade entre 50 e 69 anos. Sobre a idade inferior e superior, mais estudos são necessários para definição da periodicidade desse exame. No Brasil, algumas entidades médicas ainda recomendam o rastreamento mamográfico bilateral bianual a partir dos 40 anos¹⁷.

Assim como o MS, alguns países não recomendam a realização rotineira da mamografia a partir dos 40 anos, devendo a decisão do rastreamento bianual em mulheres entre 40-49 anos ser individualizada. Para aquelas com idade entre 50 e 74 anos, essa avaliação pode ser a cada dois anos^{18, 19}. No entanto, nos Estados Unidos a recomendação é de mamografia anual dos 45 aos 54 anos e de bianual a partir dos 55 anos. Mulheres entre 40 e 44 anos poderão ser rastreadas anualmente⁸.

As pacientes provenientes da área urbana da cidade de Belo Horizonte realizaram o exame com idade inferior à das mulheres da zona rural ($p=0,000$). O acesso a serviços de saúde e ao exame com maior facilidade para aquelas mulheres da região metropolitana de Belo Horizonte poderia ser uma possível explicação para essa diferença encontrada de acordo com a procedência das mulheres. A associação inversa entre a procedência rural e a realização da mamografia precocemente se manteve no modelo estatístico final. O início do rastreamento mamográfico diferenciado de acordo com a procedência da paciente pode sugerir que o acesso ao exame seja diferenciado, com mulheres da zona urbana tendo maior facilidade para realizar a mamografia, e que estratégias devam ser adotadas para ampliar o acesso das mulheres residentes na área rural ao programa de rastreamento.

As mulheres com maior grau/nível de escolaridade (classificado como sete ou mais anos completos de estudo) realizaram a primeira mamografia com idade inferior à do grupo com menos anos de estudo, com diferença significativa entre os grupos. A associação direta entre maior escolaridade e a realização da primeira mamografia com idade precoce se manteve no modelo estatístico final. O grau de entendimento e compreensão sobre a doença e sobre a dinâmica do exame pode ser fator determinante na adesão das pacientes à rotina de exames periódicos da mama e de mamografia. Em pesquisa realizada avaliando o perfil de mulheres que realizaram mamografia em serviços público e privado, demonstrou-se que um terço das entrevistadas no serviço público não fez o exame de mamografia conforme solicitado anteriormente pelo médico²⁰. A não realização da mamografia e do exame clínico das mamas também foi associada ao baixo grau de escolaridade entre mulheres na cidade de Campinas (SP)⁵.

Isso corrobora a hipótese da importância do grau de escolaridade na adesão às orientações médicas e aderência aos programas de rastreamento do câncer de mama.

As mulheres de maior renda realizaram a primeira mamografia com idade inferior à daquelas com renda menor. Godinho et al. descreveram que 10% das mulheres no serviço público, avaliadas em um estudo na cidade de Goiânia (GO), não realizaram a mamografia por questões financeiras²⁰. Amorim et al.⁵, em estudo na cidade de Campinas, encontraram menos realização do exame na faixa de menor nível socioeconômico, inferindo ainda que a não realização da mamografia e do exame clínico das mamas estava relacionada ao fato de as pacientes pertencerem ao segmento de menor renda familiar *per capita*. Em ambos os estudos não foi avaliada a idade de realização do exame de acordo com a condição econômica dessas mulheres.

Em estudo avaliando os fatores associados à realização de mamografia por mulheres brasileiras, encontrou-se uma prevalência de 36%, e entre os fatores preditivos para a realização do exame estavam a renda elevada, a faixa etária de 40-59 anos, o acesso ao plano de saúde e a realização de consulta médica no último ano²¹. Ainda em estudo na cidade de Guarapuava (PR), a realização de exame preventivo de câncer de mama foi influenciada pela baixa renda e baixa escolaridade, ou seja, quanto menor o nível de renda e de formação, menor o acesso ao exame de mamografia²².

Considerando que esse é um fator de risco relacionado ao câncer de mama, as mulheres nessa faixa etária deveriam iniciar o rastreamento da doença precocemente⁴. Nessa população estudada, verificou-se que 16,66% possuía história familiar de câncer de mama em pelo menos um parente de primeiro grau. A idade de realização da primeira mamografia nessas mulheres foi superior à daquelas sem história familiar da doença ($p=0,013$), apesar de essa condição ser considerada fator de risco para o câncer de mama. Um estudo realizado em Goiânia²⁰ apontou história familiar de câncer de mama em 13,3% da população avaliada que foi atendida em um hospital público. Dessa amostra, 28,7% não havia realizado mamografia prévia.

A população feminina com idade entre 40 e 49 anos com risco duas vezes maior de câncer de mama podem se beneficiar do mesmo rastreamento realizado em mulheres na faixa etária acima de 50 anos²³. Assim, o rastreamento pode ser direcionado àquelas com características que possam conferir aumento de risco do câncer de mama, como a história familiar da doença, a alta densidade do tecido mamário e a história de doença benigna da mama²⁴.

As mulheres que relataram o uso de terapia de reposição hormonal (TRH) realizaram a primeira mamografia com idade superior à do grupo que não fazia uso dessa terapia. Entre as mulheres que se submetiam à TRH, 22,5% tinham história de câncer de mama na família. Esse é um conhecido fator de risco para o câncer de mama, devendo as mulheres nessa condição estar sob vigilância precoce⁵. Em estudo realizado em Goiânia, entre as mulheres que se submeteram à mamografia, 20% utilizavam TRH, e um quinto delas relatou não ter realizado exame mamográfico prévio²⁰. Esse é um dado preocupante, uma vez que o início tardio do rastreamento poderá prejudicar a eficiência do rastreamento nessa população.

O uso de contraceptivos orais é outra condição associada ao câncer de mama²⁵. Neste estudo, as mulheres que não mencionaram o uso de anticoncepcionais, no momento da pesquisa ou no passado, realizaram a primeira mamografia com idade superior à daquelas que relataram essa condição. Quando avaliada a realização da mamografia antes dos 40 anos, a utilização de contraceptivos orais foi associada indiretamente à realização precoce da primeira mamografia no modelo estatístico final. Em um estudo que avaliou a realização de mamografia em mulheres assintomáticas entre 40 e 49 anos, 6,8% delas faziam uso de anticoncepcionais orais¹³. Neste estudo, 57,64% das mulheres relataram essa condição atual ou pregressa.

Freitas et al.²⁶ relacionaram o uso de anticoncepcionais orais à dor e ao desconforto durante a realização do exame, possivelmente por maior sensibilidade mamária durante o uso do medicamento, fato esse que poderia influenciar a não realização do exame no futuro em 25% dos casos.

As mulheres menopausadas realizaram a primeira mamografia com idade superior à daquelas pré-menopausadas. O risco de câncer de mama aumenta com a idade e também naquelas mulheres que entraram na menopausa com idade acima de 55 anos ou, ainda, nas que fazem uso de TRH.²⁵ Considerando que um quinto das mulheres menopausadas desse trabalho fazia uso de reposição hormonal e um quarto tinha história familiar de câncer de mama, que são fatores de risco conhecidos para a doença, a idade de realização do início do rastreamento nessa população deveria ter sido menor.

Mulheres com baixa porcentagem de gordura corporal (baixo peso e eutróficas) realizaram a primeira mamografia com idade superior à daquelas com alta % de gordura corporal, mantendo essa associação inversa com a realização precoce da mamografia no modelo final de regressão logística múltipla. O sobrepeso e a obesidade são hoje

considerados fatores de risco para o câncer de mama²⁵, portanto a realização do rastreamento nessas condições mais precoces estaria justificada.

A presença de comorbidades também foi avaliada, e mulheres não diabéticas realizaram a primeira mamografia mais precocemente em relação àquelas com a doença, sem persistência no modelo final. Em estudo realizado em Teresina (PI) com mulheres diabéticas, demonstrou-se que apenas 40% das pacientes realizaram mamografia nos dois anos anteriores, sendo essa ação preventiva pouco realizada por essa população, com associação entre a baixa escolaridade e a não realização do exame²⁷. Uma possível explicação para esse fato é a atenção dada às medidas de controle glicêmico nos pacientes com *Diabetes melittus*, podendo haver prejuízo nas ações e adesão aos programas de rastreamento do câncer de mama²⁷. Essas medidas devem ser ajustadas para essa comunidade, uma vez que níveis glicêmicos elevados podem influenciar negativamente o prognóstico de mulheres portadoras de câncer de mama²⁸.

A idade de realização da mamografia foi menor ainda entre as mulheres tabagistas. A preocupação crescente com as implicações do tabagismo no aumento da incidência de câncer poderia explicar a adesão mais precoce dessas mulheres ao programa de rastreamento.

É crescente o desafio dos gestores em garantir o acesso ao exame de mamografia pela população em geral, especialmente pelas mulheres mais vulneráveis. Deve ser dada atenção especial à implantação de estratégias visando à estratificação do risco de câncer de mama nas mulheres e a correta indicação do início do rastreamento mamográfico, a fim de garantir a adoção de práticas preventivas direcionadas a essa população.

Conclusão

Este estudo sugere a existência de associação direta entre a realização precoce de mamografia e o maior nível de escolaridade, menopausa e obesidade. A procedência rural, o uso de contraceptivos orais e o baixo percentual de gordura corporal apresentaram associação inversa no modelo estatístico final.

A realização da mamografia em pacientes assintomáticas antes dos 40 anos nem sempre se reflete em aumento no número de diagnósticos de câncer de mama, podendo gerar exames falsos positivos e procedimentos invasivos desnecessários nessa faixa etária.

A realização de mamografia antes dos 50 anos é direcionada pela existência de riscos para o câncer de mama, mas deveria também levar em conta questões relacionadas à presença de comorbidades e estilo de vida das pacientes, questões hoje que têm influenciado o diagnóstico dessa doença.

Portanto, é preciso atenção aos fatores que contribuem negativamente para a realização tardia e precoce do primeiro exame de mamografia, além de identificar precisamente a população de maior risco de câncer de mama, para uma abordagem direcionada do programa de rastreamento mamográfico em relação à idade de início da realização do exame e à sua correta indicação.

Referências

1. World Health Organization. Breast cancer: prevention and control. [Online] 2016.
2. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer. 2015; 136 (5): E359-E86.
3. Instituto Nacional do Câncer (BR). Ministério da Saúde. *Atlas On-line de Mortalidade*. [Online] 2016.
4. Instituto Nacional do Câncer (BR). Ministério da Saúde. *Parâmetros Técnicos para o Rastreamento do Câncer de Mama-Recomendações para Gestores Estaduais e Municipais*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2009.
5. Amorim, V.M.S.L., Barros, M.B.A., César, C.L.G., Carandina, L., Goldbaum, M., *Fatores associados a não realização da mamografia e do exame clínico das mamas: um estudo de base populacional em Campinas, São Paulo, Brasil*. Cad Saude Publica. 2008; 24 (11): 2623-32.
6. Instituto Nacional do Câncer (BR). Ministério da Saúde. *Controle do Câncer de Mama-Detecção Precoce*. [Online] 2016.
7. Pace, L., Keating, N., *A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions*. JAMA. 2014; 311 (13): 1327-35.
8. Oeffinger, K., Fontham, E., Etzioni, R., Herzig, A., Michaelson, J., Shih, Y., et al., *Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update from the American Cancer Society*. JAMA. 2015; 314 (15): 1599-614.
9. Pinho, V.F.dS., Coutinho, E.S.F., *Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde*. Cad Saude Publica. 2007; 23 (5): 1061-9.
10. Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)* Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2012.

11. Abranches, M.V., Santos Mendes, M.C, Pena, G.G., Paiva Maia, Y.C., Ribeiro, S.M.R., Franceschini, S.C.C., et al., *Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer*. Eur J Cancer Prev. 2011; 20 (5): 403-10.
12. Pena, G.G, Maia, Y.C., Mendes, M.C., Furtado, W.R., Machado-Coelho, G.L., Freitas, R.N., *Physical Activity Is Associated with Malignant and Benign Breast Diseases in Low-Income Brazilian Women*. Nutr Cancer. 2013; 66 (4): 707-15.
13. Silva, F.X., Katz, L., Souza, A.S.R., Amorim, M.M.R., *Mamografia em mulheres assintomáticas na faixa etária de 40 a 49 anos*. Revista de Saúde Pública. 2014;48(6):931-9.
14. Instituto Nacional do Câncer (BR). Ministério da Saúde. *Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2004.
15. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 1.253, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2013. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
16. Pereira, M.B., Oliveira, J., Ribeiro, D.P., Castro, B., Yaphe, J., Sousa, J.Cd., *Grupo etário e periodicidade recomendados para a mamografia de rastreamento: uma revisão sistemática*. Ciênc Saúde Coletiva 2014; 19 (4): 1135-40.
17. Associação de Obstetrícia e Ginecologia do Estado de São Paulo. Canal Saúde Mulher - Guia de Saúde da Mulher Madura. [Online] 2015.
18. Screening for Breast Cancer: *U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. Ann Intern Med. 2009; 151 (10): 716-26.
19. Kalager, M., Zelen, M., Langmark, F., Adami, H.-O., *Effect of Screening Mammography on Breast-Cancer Mortality in Norway*. N Engl J Med. 2010; 363 (13): 1203-10.
20. Godinho, E.R., Koch, H.A., *O perfil da mulher que se submete a mamografia em Goiânia: uma contribuição a "Bases para um programa de detecção precoce do câncer de mama"*. Radiol Bras. 2002; 35 (3): 139-45.
21. Novaes, H.M.D., Braga, P.E., Schout, D., *Fatores associados à realização de exames preventivos para câncer nas mulheres brasileiras, PNAD 2003*. Ciênc Saúde Coletiva 2006; 11 (4): 1023-35.
22. Bim, C.R., Pelloso, S.M., Carvalho, M.D.dB., Previdelli, I.T.S., *Diagnóstico precoce do câncer de mama e colo uterino em mulheres do município de Guarapuava, PR, Brasil*. Rev Esc Enferm USP. 2010; 44 (4): 940-6.
23. Van Ravesteyn, N.T., Miglioretti, D.L., Stout, N.K., Lee, S.J., Schechter, C.B., Buist, D.S.M., et al., *Tipping the Balance of Benefits and Harms to Favor Screening Mammography Starting at Age 40 Years A Comparative Modeling Study of Risk*. Ann Intern Med. 2012; 156 (9): 609-17.
24. Kerlikowske, K., *Screening mammography in women less than age 50 years*. Curr Opin Obstet Gynecol. 2012; 24 (1): 38-43

25. American Cancer Society, *What are the risk factors for breast cancer?* [Online] 2015.
26. Freitas Júnior, R., Fiori, W.F., Ramos, F.J.dF., Godinho, E., Rahal, R.M.S., Oliveira, J.G.d., *Desconforto e dor durante realização da mamografia.* Rev Assoc Med Bras. 2006; 52 (5): 333-6.
27. Rezende Neta, D., Fontenele, T., Silva, G., Silva, K., Albuquerque, J., *Prevention of breast cancer in women with diabetes mellitus.* Northeast Network Nursing Journal. 2011; 12 937-42.
28. Monzavi-Karbassi, B., Gentry, R., Kaur, V., Siegel, E.R., Jousheghany, F., Medarametla, S., et al., *Pre-diagnosis blood glucose and prognosis in women with breast cancer.* Cancer & metabolism. 2016; 4 (1).

3.4. Artigo 4 (Original)

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE VITAMINA D E IL17 E ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS7975232 DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D EM MULHERES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA

Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sediya, Manoela Maciel dos Santos Dias, Milene Pessoa, Sérgio Oliveira de Paula, Renata Nascimento Freitas, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio

Resumo: Este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre o polimorfismo do receptor de vitamina D (VDR) e os níveis de vitamina D e de interleucina-17 (IL-17), bem como o risco de câncer de mama em mulheres atendidas em uma rede pública. Métodos: um total de 83 pacientes, 44 com câncer de mama e 39 mulheres saudáveis foram selecionadas para o estudo. O método de RT-PCR foi usado para definir o genótipo do SNP do gene VDR (*ApaI*-rs7975232). A quantificação da 25(OH)D no soro foi realizada por quimiluminescência, enquanto a quantificação de IL-17 foi realizada por citometria de fluxo. Resultados: houve diferença entre os níveis de 25(OH)D entre os grupos casos e controles, sendo maior nas mulheres saudáveis ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferença nos níveis de 25(OH)D entre os diferentes genótipos. Os níveis de IL-17 foram maiores no grupo controle ($p < 0,001$). Não foi encontrada associação entre o genótipo AA e o câncer de mama ($p = 0,73$). Conclusão: as mulheres portadoras de câncer de mama apresentaram níveis de vitamina D e IL-17 inferiores aos das mulheres saudáveis. O polimorfismo do gene VDR não foi associado ao câncer de mama e não influenciou os níveis de IL-17 e vitamina D.

1. Introdução

A incidência do câncer de mama vem aumentando nas últimas décadas, fenômeno atribuído ao processo de urbanização. Houve aumento na incidência tanto dos casos invasivos quanto dos não invasivos, em comparação com a década de 1970 (1). O principal fator de risco para o desenvolvimento dessa patologia é a idade (2). Outros fatores de risco conhecidos são a presença de mutações, densidade mamária, história familiar e pessoal de câncer de mama, álcool, obesidade, história reprodutiva e sexual (condições associadas ao maior tempo de exposição ao estrogênio), inatividade física, uso de terapia de reposição hormonal, história prévia de exposição à radioterapia na região do tórax antes dos 30 anos e o consumo de bebida alcoólica (3, 4). O risco de câncer de mama de uma mulher, individualmente, pode ser maior ou menor, dependendo da combinação de fatores de risco que ela possua (3).

A vitamina D é um hormônio produzido no corpo pela ação fotolítica dos raios ultravioletas (UV) na pele, sendo responsável por 50 a 90%. A quantidade de vitamina D produzida sofre influência do grau de exposição solar, da latitude, do uso de roupas

que cobrem a pele, da utilização de bloqueador solar e da pigmentação da pele (5, 6), ou pode ser adquirida pela alimentação.

Após sua formação na pele, a pré-vitamina D₃ é transformada em colecalciferol, sofrendo hidroxilação hepática formando a 25-hidroxivitamina D, ou calcidiol (25(OH)D (7), que é levada aos tecidos cujas células contêm a enzima 1- α -hidroxilase (CYP27B1), sofrendo nova hidroxilação e formando o metabólito ativo 1- α ,25-di-idroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol (5, 8). O principal local de ativação da 25(OH)D são as células tubulares renais proximais. No entanto, mama, cólon, próstata, células do sistema imune e beta pancreáticas, placenta, paratireoides e cérebro são locais adicionais de metabolização dessa vitamina (9, 10). O nível da vitamina D no soro é medido pela dosagem do metabólito 25(OH)D (6).

A vitamina D age através da ativação do receptor da vitamina D (RVD), altamente expresso no rim, intestino e ossos e expresso também na quase totalidade das células humanas, inclusive na mama (5, 11). A ligação da 1,25(OH)₂D ao RVD induz a formação do complexo hormônio-receptor, que se acopla a uma sequência específica de DNA nos seus genes-alvo, promovendo a ativação ou repressão gênica (12, 8).

Essa vitamina tem papel essencial no metabolismo do cálcio e fósforo e na manutenção da saúde óssea e dos dentes (13). São conhecidas também as ações não calcêmicas da vitamina D, atribuídas à presença dos RVD em diversas células humanas. Entre essas ações estão aquelas relacionadas ao sistema imunológico, o que influencia as células do sistema imune que possuem a enzima 25-hydroxyvitamina D₃ 1- α -hydroxylase e o RVD (14), agindo na regulação autócrina de linfócitos CD4+, CD8+, T e células apresentadoras de antígenos, que regulam a diferenciação das células do sistema monocítico-macrofágico e modulam também o equilíbrio entre as respostas T-helper (Th)1 (celular) e Th2 (humoral) (9, 15). A vitamina D exerce inibição da produção de IL2, IL-6, IL-12 e IL-23 (16), ao mesmo tempo que estimula a produção de IL-10 (17) e pode, nas células Th17, ter efeito supressor na produção de IL-17(18-21).

A vitamina D pode possuir ainda ação anticarcinogênica, com papel na diferenciação, proliferação e apoptose de células cancerígenas, já demonstradas *in vitro* e em modelos animais (22, 50). Estudos demonstraram a associação entre os níveis séricos de 25(OH)D e o risco reduzido de câncer de mama (23, 24).

O gene do receptor da vitamina D está localizado no cromossomo 12 (12q13.11), contém 11 exons (25) e pode influenciar o nível de vitamina D sérico (26), influenciando sua ação antiproliferativa (27). Vários polimorfismos do RVD foram

descritos, como o *BsmI* e o *ApaI* (ambos localizados no intron 8) e o *TaqI* (localizado no exon 9), que são as variantes mais estudadas (28). A presença do polimorfismo no receptor da vitamina D pode influenciar o risco de desenvolver câncer de mama em mulheres (29-31).

Considerando que muitos estudos demonstraram correlação entre níveis diminuídos de vitamina D e aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, além da associação da presença de polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo da vitamina D e com diferentes níveis dessa vitamina, este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre o nível de vitamina D e de IL-17, a presença de polimorfismos *ApaI* (rs7975232) no gene do receptor da vitamina D e o câncer de mama em mulheres atendidas em um serviço especializado na cidade de Belo Horizonte.

2. Metodologia

2.1. População do estudo: casuística

Este estudo é uma subamostra de um estudo caso-controle, realizado com mulheres encaminhadas para o Serviço de Mastologia da Maternidade Odette Valadares, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

As mulheres que foram encaminhadas para o atendimento ambulatorial foram convidadas a participar deste estudo. Aquelas que aceitaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo seguiu a Declaração de Helsinki e foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (protocolo número: 1889/2005).

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para selecionar a amostra: referências para propedêutica mamária, ou para rotina ou para exame ginecológico; idade igual ou superior a 18 anos; procedência da cidade de Belo Horizonte (zona rural e urbana); realização de mamografia, biópsia ou cirurgia de mama; dosagem positiva para IL-17 e vitamina D no soro; e estar de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido fornecido pelo pesquisador.

Os resultados das mulheres que realizaram mamografia com *Breast Imaging Reporting and Data System* (BI-RADS[®]) (32) de 1 ou 2 compuseram o grupo-controle (GCo), e aquelas que tinham patologia mamária maligna comprovada pelos resultados

da biópsia ou cirurgia (carcinoma ductal ou lobular invasivo) compuseram o caso grupo (GCa).

Os critérios de exclusão foram: a idade inferior a 18 anos, o diagnóstico prévio de quaisquer outros tipos de câncer, exame anatomopatológico com diagnóstico de outras neoplasias de mama (como doença *in situ*, tumor *Phyllodes* maligno ou *borderline* etc.), biópsia sem comprovação de malignidade (indeterminado) ou com doença benigna.

Aquelas pacientes com BI-RADS[®] de 0, 3, 4 ou 5 ou que não tinham laudo de mamografia foram excluídos do grupo de controle.

Foram realizadas as dosagens de vitamina D, IL-17 em 378 mulheres. A subamostra deste estudo foi constituída por 83 mulheres com dosagem de vitamina D e IL-17, nas quais foi pesquisada a presença do polimorfismo rs7975232, sendo 44 casos e 39 controles saudáveis.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Rede FHEMIG, sendo o Termo de Consentimento Livre e esclarecido apresentado a todas as pacientes.

2.2. Abordagem experimental

As mulheres selecionadas para o estudo foram entrevistadas, e foram coletados dados sociodemográficos e informações sobre a vida reprodutiva da mulher, hábitos de vida como tabagismo, etilismo e sedentarismo. Foi aplicado um questionário para avaliar a exposição aos fatores de risco para o câncer de mama, como padronizado por Abranches, M.V. et al. (33) e Pena, G. G. et al. (34).

2.3. Coleta sanguínea

Foram coletados 15 mL de sangue periférico em EDTA e em tubo sem anticoagulante, em frascos codificados. O sangue foi processado para obtenção de plasma e *buffy coat*, e as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento da análise. Do tubo sem EDTA foi extraído o soro, também armazenado a -80 °C, em tubo âmbar até o momento da análise.

2.4. Extração do DNA e Polimorfismo do Gene do Receptor da Vitamina D

A extração de DNA foi realizada com 2 ml de *buffy coat*, segundo o protocolo padronizado por Pena, G. G. (35), demonstrado na Figura 1.

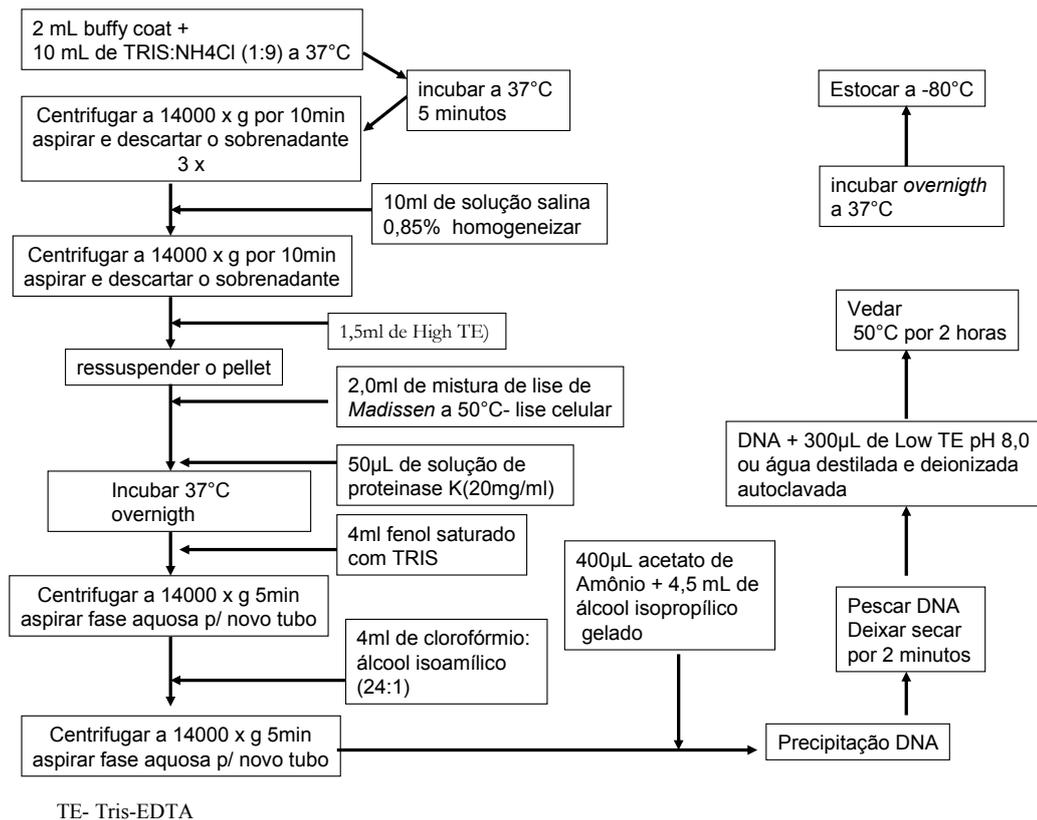


Figura 1 – Protocolo de extração do DNA.

O polimorfismo escolhido para este estudo foi selecionado a partir de trabalho previamente realizado com pacientes com câncer de mama (*ApaI* rs7975232) (31). O SNP A>C no RVD está localizado no cromossomo 12:48238837.

A genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real, e as reações de amplificação foram realizadas no equipamento 7300 PCR (Applied Biosystems®). O protocolo foi adaptado do modelo descrito por Ferrarezi, D. A. F. et al. (36). As análises foram realizadas em duplicata, e as repetições de controle de qualidade corresponderam a 100%, e os controles não apresentaram nenhuma amplificação.

As sondas com a sequência-alvo foram desenvolvidas pela *Applied Biosystems*®. A sonda marcada com FAM detectou a sequência do alelo 2 (C) e a sonda marcada com VIC, a sequência do alelo 1(A) (Tabela 1).

Tabela 1 – Polimorfismo ApaI (rs7975232) do receptor da vitamina D

SNP	Sondas	Variação de base
ApaI rs7975232	AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]CCTCACTGCTCAA TCCCACCACCCC	A/C

As reações de RT-PCR foram montadas num volume final de 25 µl, sendo 1,0 µl de DNA, 12,5 µl de *Tac Man master mix* (Applied Biosystems®), 1,25 µl de *Tac Man Genotyping assay mix* (Applied Biosystems®) e 10,25 µl de água. A reação foi realizada segundo estas especificações: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (anelamento). As medições de fluorescência foram registradas durante as etapas a 60 °C.

Os dados de emissão de fluorescência foram continuamente recolhidos durante o aumento das temperaturas.

2.5. Dosagem sérica de vitamina D e IL-17

Para a dosagem de vitamina D, o *kit* de quimiluminescência *ARCHITECT 25-OH Vitamin D* (Abbott Laboratories®-Barcelona, Espanha) foi usado e o metabólito 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], dosado (37). A IL-17 foi quantificada, usando-se o *kit BD CBA Human and Mouse Th1/Th2/Th17 Kits* (BD Biosciences®, San Jose, Estados Unidos) por citometria de fluxo. Ambas as dosagens foram realizadas no soro das pacientes.

2.6. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa Stata versão 9.1. Todas as variáveis quantitativas foram testadas pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para comparar as frequências genóticas encontradas, foi utilizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, usando-se o teste chi-quadrado.

A associação entre os polimorfismos, o *status* de vitamina D e a presença de câncer de mama foram avaliados pelo teste qui-quadrado, enquanto a presença de câncer de mama e os níveis de IL-17 foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney.

A correlação entre os níveis de IL-17 e de vitamina D foram avaliados pelo teste de correlação de Spearman.

Foram estimados a *Odds Ratio* e os respectivos intervalos de confiança de 95%, para verificar a associação entre a presença do polimorfismo no gene estudado e a presença de câncer de mama e os níveis de vitamina D.

O nível de significância adotado em todas as análises foi de 0,05.

3. Resultados

O resultado da frequência de heterozigoto AC foi de 54,54% nos casos e 56,41% nos controles. Não houve diferença entre os casos e controles em relação à presença do polimorfismo, e não houve associação entre o polimorfismo e o câncer de mama nessas mulheres ($p=0,73$). A frequência do homozigoto AA encontrada entre os casos foi de 29,55% e entre os controles, de 25,94%. A frequência alélica nos casos foi de 59% para o alelo A e 41% para o C, enquanto nos controles foi de 56% e 44%, respectivamente, sem diferença entre os grupos. Não foi encontrado nenhum homozigoto CC na amostra estudada. Não houve diferença entre os níveis de vitamina D e de IL-17 entre os grupos AA e AC (Tabela 2).

Tabela 2 – Polimorfismo do gene do receptor da vitamina D, níveis de vitamina D e IL-17 nos grupos caso e controle

Polimorfismo	AA n(%) ou mediana (IIQ)	AC n(%) ou mediana (IIQ)	Indeterminado	p
Casos*	13 (29,55)	24 (54,54)	7(15,90)	0,73
Controle	10 (25,94)	22 (56,41)	7(17,95)	
Vitamina D (ng/dl) [#]	25,1 (21,5-32,4)	27,1 (23,5-32)		0,38
Vit D \geq 30*	7 (31,82)	15 (68,18)		0,81
Vit D<30	16 (34,78)	30 (65,22)		
IL-17 [#]	26,43 (15,22-49,97)	31,66(15,09-62,73)		0,61

[#] Teste de Mann Whitney, * Teste de χ^2 -chi quadrado e IIQ - intervalo interquartil.

Os níveis de IL-17 e de vitamina D encontrados na população estudada são inferiores nos casos de câncer de mama, em comparação com os valores encontrados nos controles saudáveis (Tabela 3).

Neste estudo, o aumento da vitamina D e da IL-17 demonstrou associação inversa com o câncer de mama em mulheres (Tabela 4).

Tabela 3 – Níveis de vitamina D e IL-17 na amostra

	Casos (n=43) Mediana (IIQ)	Casos (n=39) Mediana (IIQ)	P
IL17 [#]	22,96 (11,7-42,01)	43,52 (26,43-67,38)	< 0,001
Vitamina D [#]	24,7 (21-28,9)	28,5 (24,7-34,5)	< 0,001

*IIQ - Intervalo interquartil, # Teste de Mann Whitney.

Tabela 4 – Associação entre câncer de mama e a vitamina D e a IL-17

Variável	OR	P	95% IC
Vitamina D	0,79	0.004	0,67-0,93
IL-17	0,95	0.005	0,91-0,98

OR - Odds Ratio Bruto, 95% CI- 95% de intervalo de confiança.

4. Discussão

Na população estudada, foi encontrada frequência de heterozigotos (AC) maior que a esperado para a população americana, que seria de 49,28% (38). Não foi encontrado nenhum homozigoto CC, não estando em equilíbrio pela lei de Hardy e Weinberg (princípio do equilíbrio gênico). Para a população americana, a frequência esperada dos alelos A e C são de 44% e 56% (38), e a frequência encontrada na população foi de 57,7% e 42,3% (p=0,03). Não houve associação entre a presença do polimorfismo AA e o câncer de mama na população estudada. O tamanho da amostra poderia explicar esse resultado, no entanto outros estudos relacionados à genotipagem já foram realizados em amostras de tamanho semelhante, apresentando resultados expressivos (25, 39).

O locus rs7975232 está localizado no intron 8-sequência não transladada 3' de gene do RVD, local onde são observados comumente SNPs no gene do RVD (31, 40-42). Mutações nessa região não mudam a sequência de aminoácidos da proteína do RVD, mas podem interferir com outras sequências do gene, interferindo nos níveis de RNA mensageiro (40, 28).

Em mulheres chinesas, o polimorfismo do gene do RVD *ApaI* no genótipo AA esteve associado à redução de risco de câncer de mama (31), assim como em mulheres tailandesas (39). Na população deste estudo não foi encontrada diferença entre os

grupos caso e controle em relação à presença do polimorfismo, sem associação entre essas características.

A associação entre os polimorfismos e o câncer de mama ainda tem resultados controversos na literatura. Em estudo realizado por Huang, Q.-Q. et al. (43), não foi encontrada associação entre os polimorfismos *Fok1*, *Apa1* e poly(A) no RVD. Wang, J. et al. (44) encontraram possível associação entre *Apa1* e câncer de mama na população asiática, e *Fok1* estava associado tanto na população asiática quanto na caucasiana. Ainda em caucasianos, o polimorfismo de *Fok1* e *Bsm1* possivelmente afete o risco de todos os tipos de câncer (45).

Não houve diferença nos níveis de vitamina D entre os genótipos AA ou AC na amostra estudada ($P=0,83$), apesar de o nível de vitamina D encontrada ser inferior nos casos em relação aos controles saudáveis ($p<0,001$). Estudos já apontaram associação entre níveis inferiores de vitamina D e risco aumentado de câncer de mama (46, 47), mas ainda de maneira controversa em relação ao benefício de acordo com a idade ou o *status* menopausal (48, 49).

As hipóteses pelo qual a vitamina D exerceria efeito protetor contra o câncer de mama seriam pelo efeito inibitório na angiogênese, pela atividade antiproliferativa e pela redução da invasividade de células tumorais (50, 51), além de indução da apoptose (52, 53).

Os níveis de IL-17 nos controles saudáveis foram mais elevados em relação aos casos ($p<0,001$). Os níveis mais elevados de vitamina D foram relacionados à inibição da produção de IL-17, segundo dados da literatura, com níveis consequentemente inferiores dessa citocina (20, 21). Na mostra estudada, obtiveram-se resultados contrários nos controles, apesar de o nível de vitamina D ser mais elevado em relação aos casos ($p<0,001$); os níveis encontrados de IL-17 foram maiores nos controles ($p<0,001$), não demonstrando efeito inibitório da vitamina D sobre a produção de IL-17. Uma possível explicação para esse achado seria de que, apesar da diferença estatística entre os níveis de vitamina D entre os casos e controles, a mediana do nível de vitamina D dos grupos está na mesma categoria funcional, classificada como insuficiente, portanto influenciando, de maneira semelhante, os níveis de IL-17, o que explica a ausência de diferença desses níveis, entre os grupos.

A IL-17 tem sido associada a um pior prognóstico em mulheres com câncer de mama, por promover a invasividade e aumentar a sobrevivência das células tumorais (54, 55), além do seu efeito pró-angiogênico nas células endoteliais, além de estimular a

produção de fatores como a *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e fatores pró-tumorais e pró-angiogênicos derivados dos fibroblastos (56, 57).

Em contrapartida, essa citocina, através do estímulo à produção de IL-6 e IL-12, pode ter papel importante ao estimular a atividade antitumoral dos linfócitos T citotóxicos tumor-específicos, com efeito no controle da neoplasia (56, 58), além do efeito na rejeição das células tumorais e mediação da resposta imune contra o tumor pelo IFN- γ produzido pelo Th17 (59, 60). A inibição do crescimento de neoplasias hematológicas pelo IL-17 também ocorre por aumento da atividade de linfócitos T citotóxicos (56, 61). As células TH17 são mais efetivas em eliminar tumores e também são encontradas em infiltrados linfocitários de tumores de mama, exercendo papel imunorregulador do microambiente tumoral (59), através do perfil de interleucinas secretadas, podendo estimular ou inibir a proliferação de células tumorais.

Embora nossos achados não tenham demonstrado associação entre a presença do polimorfismo rs7975232 e o câncer de mama na amostra estudada, é possível que existam outros polimorfismos associados ao aumento de risco para a doença. É importante que outros polimorfismos no receptor da vitamina D sejam estudados, assim como sua influência nos níveis de vitamina D e de outras interleucinas, a fim de investigar uma possível associação genética com a patogênese dessa enfermidade.

5. Conclusão

Este estudo de caso-controle evidenciou uma associação inversa dos níveis de vitamina D e de IL-17 com o câncer de mama.

Os níveis de vitamina D foram mais elevados nos controles saudáveis, indicando possível efeito protetor contra o câncer de mama nessa população. Os níveis de IL-17 também foram mais elevados entre os controles saudáveis, com associação inversa com o câncer de mama nessa amostra. A magnitude da diferença entre os níveis de vitamina D entre os grupos não foi suficiente para influenciar os níveis de IL-17.

O polimorfismo *ApaI* (rs7975232) do receptor da vitamina D não demonstrou associação com os níveis de vitamina D ou com o câncer de mama na população estudada.

A pesquisa de hipovitaminose D em mulheres e sua correção deveriam ser avaliadas pelos órgãos competentes, propondo uma política de saúde pública. Isso porque os resultados deste trabalho indicaram efeito protetor dessa vitamina no câncer

de mama, além de um número relevante das mulheres com câncer de mama ter apresentado níveis séricos pelo menos insuficientes de vitamina D.

6. Referências

1. Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., Altekruze, S.F., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations)*. National Cancer Institute 2012 [15/10/2013; http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops1909/].
2. Lacey Jr, J.V., Kreimer, A.R., Buys, S.S., Marcus, P.M., Chang, S.C., Leitzmann, M.F., et al., *Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort*. BMC Cancer, 2009. **9**(84).
3. NCI, N.C.I. *Breast Cancer Risk in American Women*. 2012 [cited 2013 15/10]; <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/probability-breast-cancer#r1>].
4. Society, A.C. 2013 [cited 15/10]; <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer>].
5. Castro, L., *O sistema endocrinológico vitamina D*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2011. **55**(8): p. 10.
6. Lips, P., *Worldwide status of vitamin D nutrition*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **121**(1–2): p. 297-300.
7. Ross, A.C., Taylor, C.L., Yaktine, A.L., and Del Valle, H.B., *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*, ed. C.t.R.D.R.I.f.V.D. and and C.I.o. Medicine. 2011, Washington, D.C.: THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. 1132 pages.
8. Castro, L.C.G.d., *O sistema endocrinológico vitamina D*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2011. **55**: p. 566-575.
9. Hewison, M., *Vitamin D and the intracrinology of innate immunity*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2010. **321**(2): p. 103-111.
10. Norman, A.W., *From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **88**(2): p. 491S-499S.
11. Kato, S., *The Function of Vitamin D Receptor in Vitamin D Action*. The Journal of Biochemistry, 2000. **127**(5): p. 717-722.
12. Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F., et al., *Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice*. Endocrine Reviews, 2008. **29**(6): p. 726-776.
13. Combs Jr., G.F., ed. *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. second edition ed. Vol. 1. 1999, Academy Press: San Diego. 618.

14. Lang, P.O., Samaras, N., Samaras, D., and Aspinall, R., *How important is vitamin D in preventing infections?* Osteoporos Int, 2013. **24**(5): p. 1537-1553.
15. Hewison, M., *An update on vitamin D and human immunity.* Clinical Endocrinology 2012 **76**: p. 315-325.
16. Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F., and Malaguarnera, L., *Vitamin D3: a helpful immuno-modulator.* Immunology, 2011. **134**(2): p. 123-139.
17. Etten, E.v. and Mathieu, C., *Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts.* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2005. **97**(1-2): p. 93-101.
18. Cantorna, M.T., Snyder, L., Lin, Y.-D., and Yang, L., *Vitamin D and 1,25(OH)(2)D Regulation of T cells.* Nutrients, 2015. **7**(4): p. 3011-3021.
19. Hewison, M., *An update on vitamin D and human immunity.* Clinical Endocrinology, 2012. **76**(3): p. 315-325.
20. Joshi, S., Pantalena, L.-C., Liu, X.K., Gaffen, S.L., Liu, H., Rohowsky-Kochan, C., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A.* Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(17): p. 3653-3669.
21. Zhang, X., Wu, X., Xiong, L., Yi, Z., He, Q., He, X., et al., *Role of Vitamin D3 in Regulation of T Helper Cell 17 and Regulatory T-Cell Balance in Rats With Immunoglobulin A Nephropathy.* Iran J Kidney Dis., 2014. **8**(5): p. 363-370.
22. Kennel, K.A. and Drake, M.T., *Vitamin D in the cancer patient.* Current Opinion in Supportive and Palliative Care, 2013. **7**(3): p. 272-277
210.1097/SPC.1090b1013e3283640f3283674.
23. Mohr, S.B., Gorham, E.D., Alcaraz, J.E., Kane, C.J., Macera, C.A., Parsons, J.K., et al., *Serum 25-Hydroxyvitamin D and Prevention of Breast Cancer: Pooled Analysis.* Anticancer Research, 2011. **31**(9): p. 2939-2948.
24. Yao, S., Sucheston, L.E., Millen, A.E., Johnson, C.S., Trump, D.L., Nesline, M.K., et al., *Pretreatment Serum Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D and Breast Cancer Prognostic Characteristics: A Case-Control and a Case-Series Study.* PLoS ONE 2011. **6**(2): p. e17251.
25. Hallak, J.A., Tibrewal, S., Mohindra, N., Gao, X., and Jain, S., *Single Nucleotide Polymorphisms in the BDNF, VDR, and DNASE 1 Genes in Dry Eye Disease Patients: A Case-Control Study Polymorphisms in Dry Eye Disease and Depression.* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015. **56**(10): p. 5990-5996.
26. Bhanushali, A.A., Lajpal, N., Kulkarni, S.S., Chavan, S.S., Bagadi, S.S., and Das, B.R., *Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels* Indian Journal of Human Genetics, 2009. **15**(3): p. 108-113

27. Buras, R.R., Schumaker, L.M., Davoodi, F., Brenner, R.V., Shabahang, M., Nauta, R.J., et al., *Vitamin D receptors in breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat.*, 1994;. **31**(2-3): p. 191-202.
28. Uitterlinden, A.G., Fang, Y., van Meurs, J.B.J., Pols, H.A.P., and van Leeuwen, J.P.T.M., *Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms*. *Gene*, 2004. **338**(2): p. 143-156.
29. Anderson, L.N., Cotterchio, M., Cole, D.E.C., and Knight, J.A., *Vitamin D-Related Genetic Variants, Interactions with Vitamin D Exposure, and Breast Cancer Risk among Caucasian Women in Ontario*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2011. **20**(8): p. 1708-1717.
30. Dorjgochoo, T., Delahanty, R., Lu, W., Long, J., Cai, Q., Zheng, Y., et al., *Common Genetic Variants in the Vitamin D Pathway Including Genome-Wide Associated Variants Are Not Associated with Breast Cancer Risk among Chinese Women*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2011. **20**(10): p. 2313-2316.
31. Guo, B., Jiang, X., Hu, X., Li, F., and Chen, X., *Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer in a Chinese population*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015. **8**(5): p. 8020-8024.
32. Eberl, M.M., Fox, C.H., Edge, S.B., Carter, C.A., and Mahoney, M.C., *BI-RADS Classification for Management of Abnormal Mammograms*. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 2006. **19**(2): p. 161-164.
33. Abranches, M., Mendes, M., Pena, G., Maia, Y., Ribeiro, S., Franceschini, S., et al., *Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer*. *European Journal of Cancer Prevention*, 2011. **20**(5): p. 403-410.
34. Pena, G.G., Maia, Y.C.P., Mendes, M.C.S., Furtado, W.R., Machado-Coelho, G.L.L., and Freitas, R.N., *Physical Activity Is Associated with Malignant and Benign Breast Diseases in Low-Income Brazilian Women*. *Nutrition and Cancer*, 2013. **66**(4): p. 707-715.
35. Pena, G.G., Fatores Clínicos, Nutricionais, Comportamentais, Polimorfismo Pro12Ala do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos gama (PPARG) e Risco de Câncer de Mama: Um estudo Caso-controle. 2007. 199 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil.
36. Ferrarezi, D.A.F., Bellili-Muñoz, N., Dubois-Laforgue, D., Cheurfa, N., Lamri, A., Reis, A.F., et al., *Allelic variations of the vitamin D receptor (VDR) gene are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetics: The DIABHYCAR prospective study*. *Diabetes & Metabolism*, 2013. **39**(3): p. 263-270.
37. Meng, J.E., Hovey, K.M., Wactawski-Wende, J., Andrews, C.A., LaMonte, M.J., Horst, R.L., et al., *Intraindividual Variation in Plasma 25-Hydroxyvitamin D Measures 5 Years Apart among Postmenopausal Women*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2012. **21**(6): p. 916-924.

38. NCBI, N.C.f.B.I. *dbSNPShort Genetic Variations*. 2016 [cited 2016 07/05]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=16654.
39. Hou, M.-F., Tien, Y.-C., Lin, G.-T., Chen, C.-J., Liu, C.-S., Lin, S.-Y., et al., *Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients**. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2002. **74**(1): p. 1-7.
40. John, E.M., Schwartz, G.G., Koo, J., Wang, W., and Ingles, S.A., *Sun Exposure, Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms, and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population*. *American Journal of Epidemiology*, 2007. **166**(12): p. 1409-1419.
41. John, P., Bhatti, A., Ain, N.u., Iqbal, T., Sadaf, T., and Malik, J.M., *Estudo caso-controle do polimorfismo do gene receptor da vitamina D em pacientes paquistaneses com artrite reumatoide*. *Revista Brasileira de Reumatologia*.
42. Miyamoto, K.-i., Kesterson, R.A., Yamamoto, H., Taketani, Y., Nishiwaki, E., Tatsumi, S., et al., *Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter*. *Molecular Endocrinology*, 1997. **11**(8): p. 1165-1179.
43. Huang, Q.-Q., Liao, Y.-Y., Ye, X.-H., Fu, J.-J., and Chen, S.-D., *Association Between VDR Polymorphisms and Breast Cancer: An Updated and Comparative Meta-analysis of Crude and Adjusted Odd Ratios*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **15** (2): p. 847-853.
44. Wang, J., He, Q., Shao, Y.-g., Ji, M., and Bao, W., *Associations between vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk*. *Tumor Biol.*, 2013. **34**(6): p. 3823-3830.
45. Raimondi, S., Johansson, H., Maisonneuve, P., and Gandini, S., *Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(7): p. 1170-1180.
46. Chen, P., Hy, P., Xie, D., Qin, Y., Wang, F., and Wang, H., *Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. **121**: p. 469 - 477.
47. Lowe, L., Guy, M., Mansi, J., Peckitt, C., Bliss, J., Wilson, R., et al., *Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population*. *European Journal of Cancer*, 2005. **41**(8): p. 1164-1169.
48. McCullough, M., Stevens, V., Patel, R., Jacobs, E., Bain, E., Horst, R., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and postmenopausal breast cancer risk: a nested case control study in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort*. *Breast Cancer Res*, 2009. **11**: p. R64.
49. Scarmo, S., Afanasyeva, Y., Lenner, P., Koenig, K., Horst, R., Clendenen, T., et al., *Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: a nested case-control study*. *Breast Cancer Research*, 2013. **15**(1): p. R15.

50. Bernardi, R.J., Johnson, C.S., Modzelewski, R.A., and Trump, D.L., *Antiproliferative Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and Vitamin D Analogs on Tumor-Derived Endothelial Cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(7): p. 2508-2514.
51. Bortman, P., Folgueira, M.A.A.K., Katayama, M.L.H., Snitcovsky, I.M.L., and Brentani, M.M., *Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on breast cells: a mini review*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002. **35**: p. 01-09.
52. Flynn, G., Chung, I., Yu, W.D., Romano, M., Modzelewski, R.A., Johnson, C.S., et al., *Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) Selectively Inhibits Proliferation of Freshly Isolated Tumor-Derived Endothelial Cells and Induces Apoptosis*. *Oncology*, 2006. **70**(6): p. 447-457.
53. Ylikomi, T., Laaksi, I., Lou, Y.-R., Martikainen, P., Miettinen, S., Pennanen, P., et al., *Antiproliferative Action of Vitamin D*, in *Vitamins & Hormones*. 2002, Academic Press. p. 357-406.
54. Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.-S., et al., *IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2015. **522**(7556): p. 345-348.
55. Welte, T. and Zhang, X.H.-F., *Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease*. *Mediators of Inflammation*, 2015. **2015**: p. 6.
56. Murugaiyan, G. and Saha, B., *Protumor vs Antitumor Functions of IL-17*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(7): p. 4169-4175.
57. Numasaki, M., Fukushi, J.-i., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., et al., *Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2620-2627.
58. Antonysamy, M. A., W. C. Fanslow, F. Fu, W. Li, S. Qian, A. B. Troutt et al., *Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection:IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors*. *J. Immunol.* 1999.162(1): p.577–584.
59. Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., et al., *Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma*. *Blood*, 2008. **112**(2): p. 362-373.
60. Ye, J., Livergood, R.S., and Peng, G., *The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity*. *The American Journal of Pathology*, 2013. **182**(1): p. 10-20.
61. Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Saute`s-Fridman, C., et al., *Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism*. *Blood*. 2002. 99(6): p.2114 –2121.

3.5. Artigo 5 (Original publicado no International Journal of New Technology and Research)

International Journal of New Technology and Research (IJNTR)
ISSN:2454-4116, Volume-2, Issue-5, May 2016 Pages 82-86

Comparison Between two Markers in the Identification of Free Plasma DNA Fractions in Patients with Breast Cancer

Oliveira-Sediyama C. M. N., Abranches M. V., Sousa Moraes L. F., Freitas R. N., Ribeiro A.Q., Paula S. O., Peluzio M. C. G.

Abstract— Cancer is one of the most cause of death in the world, with increased incidence each year. About 1.7 million women died in 2012, 1.7 million women died in the world with breast cancer. This study aimed to quantify the FDNAF by two markers, the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin, and evaluate which is the best to detect women with breast cancer. 50 women were recruited to dose the FDNAF, 30 with breast cancer and 20 healthy controls. DNA was extracted from plasma, and Real time PCR reaction using the GAPDH and β -actin were performed. The GAPDH was the most adequate marker to identify the patients with breast cancer, because they presented higher levels of fragments of free DNA, when compared to healthy controls.

Index Terms— Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), β -Actin.

I. INTRODUCTION

Cancer is one of the leading causes of death, mainly in developed countries. In 2012, the World Health Organization estimated over 14 million new cases of cancer and almost 8.2 million deaths worldwide. Breast cancer were diagnosed in 1.7 million with 521 000 deaths (1, 2). Among women, breast carcinoma appears as the most common type of cancer, with about 1.7 million new cases and nearly 530 thousands deaths annually (3). In addition, incidence rate of breast cancer has increased due to growth in life expectancy, urbanization and adoption of occidental lifestyle.

Non-invasive methods of breast cancer detection have been the major focus of experts. Usually, these methods are easy to perform, which allow them to be used in large scale among the population. Consequently, they might produce a positive impact on both early diagnosis and mortality rate.

Oliveira-Sediyama, C. M. N. (First Author) Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sediyama, Department of Nursery and Medicine, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,
Abranches, M. V. - Monise Viana Abranches, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Viçosa, Rio Paranaíba, Brazil,
Sousa Moraes, L. F. Luis Fernando de Sousa Moraes, Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil .
Freitas, R. N. - Renata Nascimento de Freitas, Department of Clinical and Social Nutrition, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil,
Ribeiro, A.Q. - Andréia Queiroz Ribeiro, Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,
Paula, S. O. - Sérgio Oliveira de Paula, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil,
C. G. - Maria do Carmo Gouveira Peluzio, Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil ,

Determination of the free DNA fraction (FDNAF) correlates with the diagnosis of several types of cancers (4-8). Furthermore, such correlation was also described in lupus, preeclampsia and in patients with multiple organ dysfunction (9-11).

In plasma, the presence of DNA fragments was first described in 1948 (12). Later on, it was observed that patients with cancer or under treatment also exhibited FDNAF in serum. Higher FDNAF levels were associated with presence of metastases and after radiotherapy, with prognostic correlation (4). Nevertheless, the mechanism by which the FDNAF gets into the blood circulation is not yet clear. It is hypothesized that could be due to cellular necrosis, with irregular fragments pattern, or apoptosis (13, 14). Furthermore, it has not been established normal reference values for cases and healthy controls.

Thus, this study aimed to quantify the FDNAF by two markers, the gene expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin, and evaluate which is the best to detect women with breast cancer.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Study Design

This was a population-based case-control study. Women were examined at a local mastology center (Odete Valadares Maternity, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) from January until July, 2006.

The adopted inclusion criteria were to be female, over eighteen-years old, and to have been referred to a mammography screening at the center. On the other hand, women under the age of eighteen, with a previous personal history of any etiology of cancer and with no mammography request or negative biopsy exam for malignancy were excluded from the study.

In total, 50 women were recruited to dose the FDNAF. The control group was composed of 20 women without benign or malignant mammary pathology, with routine mammography screenings considered normal (BIRADS 1 or 2) (15). The cases were consisted of 30 women whose mammograms were highly suspicious of malignancy (BIRADS 4 or 5) (15). Thereafter, malignant breast neoplasia (invasive carcinoma) was confirmed by biopsy.

The study was approved by the local ethical committee (The study followed the Declaration of Helsinki and was approved by the National Committee of Ethics in research

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram avaliadas mulheres com câncer de mama e controles saudáveis, em que ficou demonstrado que a menopausa e a história familiar são fatores de risco para o câncer de mama. Demonstrou-se ainda que tanto a prática de atividade física moderada quanto os níveis de vitamina D possuem efeitos protetores contra o câncer de mama em mulheres. Não foi encontrada nenhuma associação entre os níveis de cálcio, fósforo e paratormônio e o câncer de mama.

Dentre as características da população estudada, o maior nível de escolaridade, menopausa e obesidade foram associados com a realização do primeiro exame de mamografia antes dos 40 anos de idade, enquanto a procedência rural, o uso de contraceptivos e a baixa % de gordura corporal foram associados ao início do rastreamento mamográfico após os 40 anos de idade.

A presença do polimorfismo *ApaI* (rs7975232) do receptor da vitamina D não foi associada aos níveis de vitamina D ou ao câncer de mama na amostra estudada. Este estudo encontrou efeito protetor entre os níveis de vitamina D e de IL17 e o câncer de mama. Não houve correlação entre os níveis de vitamina D e de IL17 encontrados, apesar de o nível de vitamina D obtido ter sido superior nos controles, isso não influenciou os níveis de IL-17 encontrados.

Uma vez que o efeito protetor da vitamina D contra o câncer de mama foi demonstrado e a hipovitaminose D foi muito prevalente nessa população, a dosagem do nível de vitamina D e a correção de hipovitaminose D na população feminina poderiam contribuir para a redução de risco de câncer de mama.

São necessários estudos adicionais para avaliar a magnitude do efeito do nível da vitamina D no nível de IL-17 e o efeito desse achado no risco do câncer de mama em mulheres.

ANEXO A – Questionário semiquantitativo de frequência alimentar

Alimentos	Quantidade			Frequência			Observações	
	Medidas caseiras	Diária	Semanal	Quinzenal	Mensal	Nunca ou raramente		
Vegetais folhosos								
Alface								
Almeirão cru								
Almeirão refogado								
Agrião cru								
Acelga () crua, () refogada								
Couve crua							Produto que adicionava nas saladas: () maionese, () azeite, () sal, () óleo, () limão, () vinagre	
Couve refogada								
Espinafre () cru, () refogado								
Mostrada () crua, () refogada								
Ora-pro-nóbis								
Repolho cru								
Repolho refogado								
Taioba refogada								
Cheiro-verde								
Vegetais B e C								
Abobrinha								Quando cozinhava os legumes, o que fazia com a água de cocção? () descartava, () aproveitava
Batata-baroa								
Batata-doce								
Batata-inglesa cozida								
Batata-inglesa frita								
Mandioca cozida								
Mandioca frita								
Purê de batatas								
Couve flor cozida								
Brócolis								
Cenoura crua								
Cenoura cozida								
Beterraba crua								
Beterraba cozida								
Chuchu refogado								
Vagem								
Quiabo								
Berinjela frita								
Berinjela cozida								
Pepino								
Tomate								
Moranga								
Jiló								
Carnes em geral								
Bacon							Comia mais vegetais: () cozidos, () refogados, () fritos	
Costelinha suína								
Frango assado								
Frango frito								
Carne bovina cozida _____								
Carne bovina grelhada _____								
Carne bovina frita _____								
Carne bovina moída _____								
Carne suína cozida _____								
Carne suína grelhada _____								
Carne suína frita _____								
Torresmo								
Peixe frito _____								
Peixe ensopado _____								
Peixe empanado _____								
Linguiça () suína, () frango								
Hamburger/steak/nuggets								
Almôndega () bovina, () frango								
Salame								
Mortadela/Pres./Apresuntado								
Miúdo fígado () boi, () frango								
Miúdos moela								
Miúdos coração () boi, () frango								
Sardinha enlatada () c/, () s/ óleo								
Atum () sem óleo, () com óleo								
Salsicha hot dog								
Ovo de galinha frito								
Ovo de galinha cozido								
Omelete								
Chouriço								

Continuação

Alimentos	Quantidade			Frequência		Observações
	Medidas caseiras	Diária	Semanal	Quinzenal	Mensal	
Leite e derivados						
Leite integral						
Leite desnatado						
Iogurte/Coalhada						Costumava retirar a nata do leite para beber? () Sim, () Não
Extrato solúvel de soja						
Queijo de minas frescal						
Queijo prato/mussarela						
Requeijão cremoso						
Lipídios						
Margarina () comum, () light, () c/sal, () s/sal						Produto utilizado na cocção? () óleo, () gordura, () banha, () gordura hidrogenada
Manteiga () c/sal, () s/sal						
Nata						
Leguminosas						
Feijão simples						
Feijoadá						
Soja cozida						
Ervilha enlatada						
Ervilha vagem/lentilha/grão de bico						
Amendoim						
Salgadinhos e outros industrializados						
Coxinha frita						
Pastel frito						
Quibe frito						
Empadinha assada						
Pizza						
Pipoca						
Chip's (batatas e outros)						
Sopa industrializada						
Achocolatado						
Cafê						
Chá-mate						
Chá-preto						
Chá-verde						
Refrigerante						
Molho-inglês						
Molho de soja (Shoyo)						
Molho de pimenta						
Ketchup						
Mostarda						
Pães e similares						
Biscoito de polvilho frito						
Biscoito de polvilho assado						
Biscoito papa-ovo						
Biscoito de nata						
Biscoito amanteigado						
Biscoito recheado industrial						
Biscoito água e sal						
Biscoito doce						
Pão francês						
Pão de forma						
Pão integral						
Pão de queijo						
Bolo simples						
Broa de fubá						
Cereais e farináceos						
Arroz cozido						
Angu						
Macarrão						
Farinha de mandioca						
Farinha de milho						
Canjiquinha						
Bambá de couve						

Continuação

Alimentos	Quantidade			Frequência			Observações
	Medidas caseiras	Diária	Semanal	Quinzenal	Mensal	Nunca ou raramente	
Sobremesa							
Cajuzinho							
Gelatina							
Pudim							
Doce de leite em pasta							
Chocolate/Bombons							Utiliza adoçante? () Sim, () Não
Goiabada							Marca: _____
Doce de fruta							
Balas/pirulitos/chicletes							
Ambrosia/quindim							
Sorvete							
Fruta A,B,C							
Abacate							
Abacaxi							
Banana							
Castanha							
Laranja							
Maçã							
Mamão							
Melão							
Manga							
Uva							
Sucos							
Suco natural sabor _____							
Suco industrializado sabor _____							
Suco (pó) sabor _____							

Consumo familiar mensal ou semanal					
Alimento	Quantidade mensal	Semanal	Nº pessoas que consomem	Consumo individual	Observação
1. Leite condensado					
2. Creme de leite					
3. Maionese					
4. Açúcar					
5. Óleo de _____					
6. Gordura hidrogenada/banha					
7. Azeite					Somatório dos alimentos cozidos (+ 1 ml óleo): _____
8. Alho					Somatório dos alimentos fritos (+ 2 ml óleo): _____
9. Cebola					Total de óleo adicionado: _____
10. Caldo Knorr/Arisco					
11. Pasta de alho e sal					
12. Sal					

Número de pessoas que fazem a maior parte das refeições em casa? _____

Mudança nos hábitos alimentares nos cinco anos? () Sim () Não

Motivo (em caso afirmativo)? _____

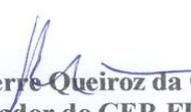
ANEXO B – Declaração



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado “**Correlação entre fatores dietéticos, clínicos e genéticos e a ocorrência de câncer de mama em mulheres atendidas pelo Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte, MG**”, sob responsabilidade da pesquisadora professora Renata Nascimento de Freitas, da Universidade Federal de Ouro Preto, foi **analisado e aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (CEP/FHEMIG), no dia 14 de julho de 2005, conforme parecer nº 310, e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CONEP/CNS/MS), no dia 29 de novembro de 2005, conforme parecer nº 1889/2005.

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2007.


Dr. Robespierre Queiroz da Costa Ribeiro
Coordenador do CEP-FHEMIG

ANEXO C – Termo de consentimento livre e informado

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
MATERNIDADE ODETE VALADARES

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: N° _____ ÓRGÃO EXPEDIDOR: _____

SEXO: _____ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

TELEFONE: () _____

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: N° _____ ÓRGÃO EXPEDIDOR: _____

SEXO: _____ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

2. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROJETO: Correlação entre fatores dietéticos, clínicos e genéticos e a ocorrência de câncer de mama em mulheres atendidas em serviço público de mamografia em Belo Horizonte, MG.

COORDENADORA: Professora Renata Nascimento de Freitas / Escola de Nutrição / UFOP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: Risco mínimo

DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 meses

3. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

A pesquisa que a senhora está sendo convidada a participar tem como objetivos investigar os fatores da dieta, da composição corporal e genéticos que fazem com que uma mulher tenha mais ou menos chances de desenvolver câncer de mama.

Nesta pesquisa cada participante deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe no dia da consulta no hospital. De cada participante serão também tomadas medidas de peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril e das dobras de gordura subcutânea. Se por acaso, a senhora for submetida à cirurgia ou a biópsia para

diagnóstico ou tratamento, serão coletadas uma amostra de sangue (10 mL) e uma amostra de gordura da mama (0,5 a 1,0 g) retirada normalmente nestes procedimentos. O sangue e a amostra de gordura serão enviados para o Laboratório de Epidemiologia Molecular da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto para extração de DNA (material genético) e análises bioquímicas. No DNA serão pesquisados os genes da MTHFR, TYMS, MTR, APOE, LDL-R, PPAR e FAS. Estes genes estão relacionados ao metabolismo de gorduras e de ácido fólico (uma vitamina) que são consumidos na dieta. Existem evidências de que alguns tipos de gorduras e o ácido fólico da dieta possam estar associados com o risco de câncer de mama e é isto que queremos pesquisar. Na gordura da mama serão pesquisados os tipos de ácidos graxos (constituintes das gorduras) presentes. A partir da análise dos resultados destes dados é que pesquisaremos que características podem influenciar no desenvolvimento do câncer de mama. O material coletado para este estudo receberá um código e apenas a professora Renata Nascimento de Freitas da Universidade Federal de Ouro Preto saberá a origem do mesmo.

Este material será utilizado apenas para os estudos descritos acima e ao final, será descartado. Em nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com este material saberão que é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Nenhuma outra pessoa ou instituição, que não aquelas envolvidas no presente projeto, terá acesso aos questionários ou dados individuais gerados por esta pesquisa. Os resultados deste trabalho serão publicados apenas em veículos de divulgação científica (revistas especializadas e congressos) garantindo-se o anonimato dos participantes. Sua participação ou não neste estudo não influenciará de nenhuma forma no tipo e na qualidade do atendimento médico que você está recebendo ou poderá receber no futuro. Você poderá solicitar aos pesquisadores, a qualquer momento, o seu desligamento do estudo e a retirada dos seus dados.

Você poderá ter conhecimento, se quiser e no momento que desejar, dos resultados da avaliação nutricional e das análises bioquímicas e genéticas. Se necessário e se for de seu interesse, nossa equipe agendará uma consulta para que a senhora receba aconselhamento genético e aconselhamento nutricional.

É através deste tipo de pesquisa e da divulgação dos resultados, que esperamos poder aumentar nosso conhecimento sobre os fatores que aumentam ou diminuem os riscos de desenvolvimento de câncer de mama. Sua participação poderá ajudar a melhorar os conhecimentos necessários para melhor orientar programas de prevenção que poderão contribuir para diminuir a ocorrência deste câncer que é o que mais mata mulheres em todo mundo.

Caso a senhora queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora, ou no futuro, poderá entrar em contato com a Profa. Renata N. Freitas na Escola de Nutrição da UFOP pelo telefone (31) 3559 1838 ou por ligação gratuita para o telefone 9 031 31 3552 0121 por e-mail: rfreitas@enut.ufop.br. Obrigada!

4. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Acesso a qualquer tempo aos resultados desta pesquisa com aconselhamento genético e/ou nutricional se necessário.

Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

5. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo da pesquisa acima especificado.

Belo Horizonte, de de 2000.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou representante legal.

Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

ANEXO D – Questionário de avaliação dos fatores de risco para câncer de mama

Data da avaliação: _____

Número: _____

Prontuário: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Identidade: _____ Órgão expedidor: _____

Idade: _____ Data Nascimento: _____

Residência atual: Rua: _____ N° _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Tempo de residência: _____ anos Zona: (U) Urbana (R) Rural

Residência anterior: Rua: _____ N° _____

Zona: (U) Urbana (R) Rural Bairro: _____ Cidade: _____

Cidade do nascimento: _____ Estado: _____

Zona: (U) Urbana (R) Rural Tempo de residência: _____ anos

Situação conjugal (IBGE/2000):

- (1) Casada/Consensual
- (2) Separada/Divorciada/Desquitada
- (3) Solteira
- (4) Viúva

Escolaridade (IBGE/2000-INCA/2000):

- (1) Não alfabetizada
- (2) Alfabetizada/Alfabetização de adultos
- (3) Antigo primário incompleto/1ª a 3ª série
- (4) Antigo primário incompleto/Elementar completo/1ª a 4ª série
- (5) Ginásio incompleto/5ª a 7ª série
- (6) Ginásio completo/5ª a 8ª série
- (7) Antigo clássico incompleto/Normal incompleto/Ensino médio incompleto
- (8) Antigo clássico completo/Normal completo/Ensino médio completo
- (9) Superior/Superior mestrado/Superior doutorado

Ocupação: _____

Renda líquida mensal: _____

Nº de membros da família: _____

HISTÓRIA CLÍNICA

1. História prévia de lesão benigna na mama?

- () Sim
- () Não

2. História familiar de câncer de mama?

- () Não há casos
- () Sim, há casos. Quem? () Avó, () Mãe, () Tia, () Filha, () Irmã

3. História pessoal de diabetes?

- () Sim

Não

4. História pessoal de gota?

Sim

Não

5. História pessoal de insuficiência renal?

Sim

Não

HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA

Idade da menarca: _____

Idade da primeira gestação completa: _____

Número de gestações com filhos vivos: _____

Número de abortos: _____

Número de natimortos: _____

Já amamentou? Sim Não

Quanto tempo amamentou seus filhos? (OMS/1992)

Filho 1: AME _____ meses

Filho 2: AME _____ meses

Filho 3: AME _____ meses

Filho 4: AME _____ meses

Filho 5: AME _____ meses

Filho 6: AME _____ meses

Filho 7: AME _____ meses

Filho 8: AME _____ meses

Filho 9: AME _____ meses

Filho 10: AME _____ meses

Uso de contraceptivo hormonal:

Oral

Vaginal

Adesivo

Outro

Início: _____ Término: _____ Tempo: _____

Idade da menopausa:

Sim _____ anos

Não

Causa da menopausa:

Espontânea

Radiação

Histerectomia ou retirada dos ovários

Terapia de reposição hormonal:

Sim

Não

Nome comercial: _____

Tipo: (J) Conjugado (NJ) Não conjugado

Administração: (O) Oral (V) Vaginal (A) Adesivo Outro

Início: _____ Término: _____ Tempo: _____

Utiliza(ou) algum medicamento por longo prazo?

Sim

() Não

Qual? _____ Indicação: _____

Início do uso: _____ Término do uso: _____

Já fez alguma mamografia?

(S) Sim

(N) Não

Com que idade fez a primeira mamografia? _____ anos.

Quando foi a sua última mamografia? _____

Desde a primeira mamografia com que frequência fez as outras?

(1) de 6 em 6 meses

(2) Anualmente

(3) 1 vez a cada 2 anos

(4) 1 vez a cada 3 anos

(5) 1 vez a cada 4-5 anos

(6) 1 vez a cada 6-10 anos

(7) Fez menos frequentemente que a cada 10 anos

(8) Só fez uma vez

ATIVIDADE FÍSICA (AGITA/2002-INCA/2002)

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade leve (aquela na qual não há aumento dos batimentos cardíacos)? _____

Quanto tempo gasta se exercitando? _____

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade moderada e intensa (aquela na qual há aumento dos batimentos cardíacos)? _____

Quanto tempo gasta se exercitando? _____

ANTROPOMETRIA

Peso atual: _____

Peso usual: _____

Altura: _____

IMC: _____

% GC: _____

Peso aos 18 anos: _____

IMC aos 18 anos: _____

Circunferência cintura: _____

Circunferência quadril: _____

Ganho de peso?

() Sim

() Não

Quantos quilos? _____

Quando? _____

Perda de peso?

() Sim

() Não

Quantos quilos? _____

Quando? _____

BEBIDAS ALCOÓLICAS E FUMO

Consome bebida alcoólica?

- Sim
 Não
 Já utilizou

Bebida	Início	Término	Tempo	Quantidade/recipiente	Frequência
Pinga				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês
Cerveja				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa <input type="checkbox"/> lata	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês
Martini				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês
Campari				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês
Vinho				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês
Outros				<input type="checkbox"/> copo <input type="checkbox"/> garrafa	<input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> semana <input type="checkbox"/> mês

Fuma?

- Sim
 Não
Tempo? _____
Cigarros/dia? _____
Tipo cigarro: Filtro Sem filtro Fumo/rolo

Já fumou?

- Sim
 Não
Início: _____ Término: _____ Cigarros/dia? _____
Tipo cigarro: Filtro Sem filtro Fumo/rolo

ANEXO E



Catarina Oliveira <catynogueira@gmail.com>

Fwd: Nutr hosp 9982

Catarina Oliveira <catynogueira@gmail.com>
To: Catarina Oliveira <catynogueira@gmail.com>

Tue, Jul 19, 2016 at 5:57 PM

----- Forwarded message -----

From: **MARIA DO CARMO PELUZIO** <mcgpeluzio@gmail.com>
Date: Mon, Jul 18, 2016 at 9:27 AM
Subject: Fwd: Nutr hosp 9982
To: Catarina Oliveira <catynogueira@gmail.com>, Manoela Maciel <manoelamaciel810@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: **Nutrición Hospitalaria** <nutricion@grupoaran.com>
Date: 2016-07-18 8:56 GMT-03:00
Subject: Nutr hosp 9982
To: mcgpeluzio@gmail.com

Dear Peluzio, MD:

The Editorial Committee of the **Nutricion Hospitalaria** journal has decided that your article "**The relationship of vitamin D status and physical activity with breast cancer in women**", reference 9982, has been accepted for publication in our journal.

The Financial Department will contact you for the payment of the article in a few days.

Yours faithfully,

Rosa Palacios

Departamento Editorial

Nutrición Hospitalaria

917451729

e-mail: nutricion@grupoaran.com

—
Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Associado IV - Departamento de Nutrição e Saúde
Universidade Federal de Viçosa
Av. P.H. Rolfs, S/N - Centro - Viçosa, Minas Gerais
CEP. 36.570-000
Telefones: + 55 31. 3899.1275 e 3899.2545
Fax: + 55 31.3899.2541