

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação ultra-sonográfica da função endotelial em usuárias de letrozol e tamoxifeno**

**Aluna:** Carolina Oliveira Nastri

**Orientador:** Professor Doutor Francisco José Cândido dos Reis

**Ribeirão Preto**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINA OLIVEIRA NASTRI

**Avaliação ultra-sonográfica da função endotelial em usuárias de letrozol e tamoxifeno**

Dissertação de Mestrado apresentada no curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Área de Concentração:** Tocoginecologia

**Orientador:** Professor Doutor Francisco José Cândido dos Reis

**Ribeirão Preto**

**2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Nastri, Carolina Oliveira

Avaliação ultra-sonográfica da função endotelial em usuárias de letrozol e tamoxifeno / Carolina Oliveira Nastri; orientador Francisco José Cândido dos Reis. –Ribeirão Preto, 2009

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Medicina. Área de concentração: Tocoginecologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Neoplasia da Mama, 2. Antineoplásicos hormonais, 3. Marcadores biológicos

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Oliveira Nastri

Avaliação ultra-sonográfica da função endotelial em usuárias de letrozol e tamoxifeno.

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de mestre.

Área de Concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a).: \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, pela imensa contribuição intelectual que permitiu a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Mauad Filho, pela atenção e apoio, além da viabilização deste trabalho científico ao disponibilizar a Escola de Ultra-Sonografia de Ribeirão Preto (EURP).

---

## **Resumo**

Entre as mulheres brasileiras, a principal causa de mortalidade são as doenças cardiovasculares, seguida em frequência pelo câncer, sendo o mais comum o de mama. É bastante conhecida a associação de câncer com eventos tromboembólicos, mas pouco estabelecida sua relação com os demais eventos cardiovasculares. Para estudar estes eventos desde suas alterações primordiais, como a lesão e disfunção endotelial e a formação da placa aterosclerótica, vários métodos têm sido utilizados. É clara a associação entre câncer, em especial o de mama, com lesão endotelial e risco cardiovascular.

A terapia endócrina para tumores de mama com receptores hormonais positivos é amplamente usada tanto de forma paliativa no câncer de mama metastático, quanto na adjuvância, para tumores iniciais. O tamoxifeno (TMX) tem sido usado como droga de escolha com este propósito há cerca de 30 anos com boa eficácia e perfil razoavelmente seguro. O desenvolvimento dos inibidores de aromatase (IAs) de terceira geração promoveu estudos comparativos que têm demonstrado superioridade dos IAs em relação ao TMX na adjuvância, favorecendo seu uso tanto em substituição, quanto de forma seqüencial. Em geral, os IAs são tão bem tolerados quanto o TMX, preocupando ainda questões como aumento de risco cardiovascular, de osteoporose e alterações no perfil lipídico.

Neste cenário temos alguns estudos demonstrando um menor número de eventos cardiovasculares em mulheres previamente tratadas de câncer de mama, o que indica um possível efeito protetor do tratamento com tamoxifeno. O efeito cardiovascular dos inibidores da aromatase permanece controverso. O objetivo deste estudo foi comparar alguns marcadores de risco cardiovascular entre mulheres sobreviventes do câncer de mama após

tratamento com tamoxifeno, letrozol ou sem tratamento endócrino. Para isso, avaliamos o total de 103 sobreviventes de câncer de mama: 35 em uso de tamoxifeno (TMXg), 34 em uso de letrozol (LTZg) e 34 sem tratamento endócrino (STEG). Os parâmetros estudados foram: a dilatação da artéria braquial mediada por fluxo (DMF), a espessura da íntima-média (EIM) e o índice de rigidez ( $\beta$ ) da artéria carótida, colesterol total, HDL e triglicérides.

Observamos que os três grupos apresentaram valores semelhantes de HDL e EIM. No TMXg foi encontrado o menor valor de colesterol total ( $219,29 \pm 36,31$ mg/dL vs.  $250,59 \pm 38,37$ mg/dL vs.  $245,09 \pm 35,35$ mg/dL; TMXg vs. LTZg vs. STEG respectivamente;  $p < 0,01$  - ANOVA), o maior valor de triglicérides ( $139,34 \pm 41,82$ mg/dL vs.  $111,35 \pm 28,22$ mg/dL vs.  $122,09 \pm 33,42$ mg/dL;  $p < 0,01$ ), o maior valor de DMF ( $6,32 \pm 2,33\%$  vs.  $4,10 \pm 2,06\%$  vs.  $4,66 \pm 2,52\%$ ;  $p < 0,01$ ) e o valor mais baixo do índice de rigidez ( $\beta$ ) ( $5,08 \pm 1,68$  vs.  $6,28 \pm 1,75$  vs.  $5,99 \pm 1,86$ ;  $p = 0,01$ ). O LTZg não diferiu significativamente do STEG em nenhum dos parâmetros estudados.

Nós não observamos nenhuma diferença entre o LTZg e o STEG em nenhum dos parâmetros de risco cardiovascular avaliados. Desta forma, a diferença observada nos valores dos lipídios séricos, no índice de rigidez ( $\beta$ ) e na DMF entre as mulheres em tratamento com tamoxifeno e letrozol pode ser mais bem atribuída a um efeito benéfico do tamoxifeno do que a um efeito prejudicial do letrozol.

The main cause of death among Brazilian women is cardiovascular disease followed by cancer; breast cancer is the most incident in this population. The relationship between cancer and thrombosis is well known, although its association with other cardiovascular events is poorly understood. In order to study these events since its primordial findings, as endothelial injury and dysfunction and the evolving atherosclerotic plaque, many methods are currently being used. There is a clear association between cancer, mainly breast cancer with endothelial injury and cardiovascular risk.

Endocrine therapy for breast cancer with positive receptors has been widely applied either for advanced metastatic cancer as for initial tumors. For more than 30 years tamoxifen (TMX) has been the first choice for this purpose with an acceptable safety profile. The emerging third generation aromatase inhibitors (IA) promoted comparative trials which have proved the IA to be superior to TMX in the adjuvant setting - what supported its use both in substitution and in a sequential manner. Broadly, the IA are as well tolerated as TMX, still concerning issues as cardiovascular risk and osteoporosis increase and lipid profile changes.

In this scenario, studies have shown that women previously treated for breast cancer present fewer cardiovascular events, indicating a possible protective effect of tamoxifen treatment. The effects of the aromatase inhibitors on cardiovascular protection remain controversial. The aim of this study was to compare some cardiovascular risk markers among breast cancer survivors following treatment with tamoxifen, letrozole or no endocrine treatment. So a total of 103 breast cancer survivors: 35 using tamoxifen (TMXg), 34 using letrozole (LTZg) and 34 using no endocrine treatment (NETg) were evaluated. Ultrasonographic

evaluation of brachial artery flow-mediated dilation (FMD), carotid intima-media thickness (IMT) and stiffness index ( $\beta$ ); and blood total cholesterol, HDL and triglycerides were assessed.

All three groups presented similar values of HDL and IMT. TMXg showed the lowest total cholesterol ( $219.29 \pm 36.31 \text{ mg/dL}$  vs.  $250.59 \pm 38.37 \text{ mg/dL}$  vs.  $245.09 \pm 35.35 \text{ mg/dL}$ ; TMXg vs. LTZg vs. NETg respectively;  $p < 0.01$  - ANOVA), the highest triglycerides ( $139.34 \pm 41.82 \text{ mg/dL}$  vs.  $111.35 \pm 28.22 \text{ mg/dL}$  vs.  $122.09 \pm 33.42 \text{ mg/dL}$ ;  $p < 0.01$ ), the highest FMD ( $6.32 \pm 2.33\%$  vs.  $4.10 \pm 2.06\%$  vs.  $4.66 \pm 2.52\%$ ;  $p < 0.01$ ) and the lowest stiffness index ( $\beta$ ) ( $5.08 \pm 1.68$  vs.  $6.28 \pm 1.75$  vs.  $5.99 \pm 1.86$ ;  $p = 0.01$ ). LTZg did not differ significantly from NETg on any evaluated parameter.

We did not observe any difference of LTZg on the evaluated cardiovascular risk parameters compared to NETg. As such, the observed difference on lipid values, stiffness index ( $\beta$ ) and FMD between women receiving tamoxifen and letrozole might be best attributed to the beneficial effect of tamoxifen than to a detrimental effect of letrozole.

## Lista de siglas

---

ABCSG	<i>Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group</i>
ARNO	<i>Arimidex-Nolvadex</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATAC	<i>Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination</i>
DMF	Dilatação mediada por fluxo dependente do endotélio
EIM	espessura da íntima-média
FGF-2	fator de crescimento de fibroblasto
fvW	fator de von Willebrand
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
IA	inibidor de aromatase
ITA	<i>Italian Tamoxifen Anastrozole</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LTZ	letrozol
LTZg	grupo letrozol
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
STEG	grupo sem tratamento endócrino
TMX	tamoxifeno
TMXg	grupo tamoxifeno
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

## Sumário

---

	Resumo	6
	Resumo em língua portuguesa	7
	Resumo em língua inglesa	9
	Lista de siglas	11
1	Revisão da literatura	14
1.1	O uso de tamoxifeno e inibidores da aromatase na terapia endócrina para o câncer de mama	15
1.2	Câncer de mama e disfunção endotelial	22
2	Justificativa da proposição	30
3	Objetivos	33
4	Métodos	35
5	Resultados	46
6	Discussão	51
7	Conclusões	56
8	Referências bibliográficas	58
10	Anexos	65
Anexo A	Artigo publicado: O uso de tamoxifeno e inibidores da aromatase na terapia endócrina para o câncer de mama	66

Anexo B	Artigo publicado: Câncer de mama e disfunção endotelial	72
Anexo C	Artigo publicado: Sonographic evaluation of endothelial function in letrozole and tamoxifen users	77
Anexo D	Comentários e respostas aos comentários dos revisores do artigo “Sonographic evaluation of endothelial function in letrozole and tamoxifen users”	84
Anexo E	Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todas as participantes da pesquisa.	100
Anexo F	Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP	104

---

## **1. Revisão da literatura**

## 1.1 O uso de tamoxifeno e inibidores da aromatase na terapia endócrina para o câncer de mama (Anexo A)

---

No Brasil, câncer representa a segunda maior causa de mortalidade, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres brasileiras, excluindo os tumores de pele não melanoma (INCA, 2006b). O câncer de mama apresenta incidência crescente mundialmente sendo, no Brasil, o risco estimado em 71 casos novos por 100.000 mulheres, pelo INCA (INCA, 2006b). Cerca de dois terços dos tumores diagnosticados na pós-menopausa expressam receptores de estrogênio (RE+) e/ou progesterona (RP+). Os efeitos do estrogênio ocorrem através da ligação a proteínas receptoras específicas, localizadas no núcleo celular: os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . O estradiol, o mais potente dos estrogênios endógenos, é sintetizado pelo complexo enzimático aromatase localizado no citocromo p450 em diversos tecidos, como exemplo: ovários, tecido gorduroso e no tecido normal e tumoral da mama (BRUEGGEMEIER et al., 2005).

Em 1896 foi publicada no *Lancet* a observação de que a ooforectomia poderia trazer benefícios para o tratamento de casos de câncer de mama considerados inoperáveis (BEATSON, 1896). Em 1962 foi descrita a existência do receptor de estrogênio e pouco tempo depois a sua presença foi demonstrada em tumores mamários (JORDAN; BRODIE, 2007). A descoberta do papel do estrogênio nesta doença promoveu grande avanço em sua terapêutica, com a pesquisa de drogas anti-estrogênicas que pudessem agir na prevenção e tratamento do câncer de mama (JORDAN; BRODIE, 2007). Motivadas por resultados positivos em estudos com animais, as pesquisas utilizando tamoxifeno iniciaram-se na década de 70 mostrando alta efetividade do tratamento, mesmo por um ano, em tumores com receptores positivos (TORMEY; JORDAN, 1984). Pouco tempo depois se iniciaram os estudos visando o

bloqueio da enzima aromatase, tendo em vista minimizarem-se os efeitos adversos da terapia com tamoxifeno (JORDAN; BRODIE, 2007). Uma droga chamada formestano foi a pioneira, passando-se alguns anos até o desenvolvimento da terceira geração de inibidores da aromatase, utilizada na prática clínica na atualidade.

### **Tamoxifeno (TMX) e o tratamento do câncer de mama**

Desde a aprovação do uso de TMX para o tratamento do câncer de mama pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos em 1977, esta tem sido a droga de escolha para o tratamento endócrino do câncer de mama em mulheres com tumores que expressam receptores hormonais. O TMX age ligando-se ao receptor de estrogênio e exercendo atividade antagonista em alguns tecidos (como no próprio tumor) e agonista em outros, o que propicia tanto benefícios como também efeitos colaterais sérios. A indicação de seu uso é baseada nos resultados de alguns estudos como os do NSABP B-14, que mostrou melhora da sobrevida para as pacientes que usaram TMX por 5 anos: sobrevida de 76% para 80% em 10 anos,  $p = 0,02$  (FISHER et al., 1996). O uso prolongado (mais de 5 anos) é contra-indicado por não trazer benefícios adicionais, enquanto que os efeitos colaterais se mantêm (FISHER et al., 2001).

### **Inibidores de Aromatase**

Esta classe engloba dois inibidores não esteroidais, o letrozol e o anastrozol, e um esteroide, o examestano (BRUEGGEMEIER et al., 2005). Grandes estudos controlados e randomizados sugerem a superioridade dos IAs em relação ao TMX refletida no aumento do tempo de sobrevida livre de doença (CARPENTER, 2008).

## Tratamento endócrino adjuvante na atualidade

No documento de consenso publicado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) em 2003 o TMX era considerado como o tratamento preferencial na adjuvância para o câncer de mama responsivo à terapia endócrina. A indicação do uso dos IA se restringia aos casos de contra-indicação ao uso do TMX (WINER et al., 2003). Desde então, publicações dos resultados de grandes estudos randomizados e controlados levaram instituições como a própria ASCO (WINER et al., 2005), o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (CARLSON et al., 2006) e o Consenso Internacional de St. Gallen (St. Gallen) (THUERLIMANN et al., 2007) a publicarem recomendações sobre o uso dos IA no tratamento de mulheres pós-menopausadas com câncer de mama inicial responsivo a terapia endócrina.

### IA após o tratamento tradicional com TMX

O letrozol é atualmente o único dos IA indicados para uso posterior à terapia tradicional com 5 anos de TMX. Tal indicação é baseada nos resultados do MA-17, estudo que incluiu mulheres após a menopausa logo após completarem a terapia adjuvante com 5 anos de TMX. Mais de 5.000 mulheres foram distribuídas para receberem letrozol (2,5mg ao dia) ou placebo e, na análise realizada após 2,4 anos do início do estudo, foi optado pela sua abertura e oferecimento do uso do letrozol para todas as mulheres em seguimento, em razão da significativa redução no número de recidivas entre as usuárias desta droga (GOSS, 2007). O seguimento foi mantido e os resultados após 48 meses mostraram aumento da sobrevida livre de doença para todas as pacientes que optaram pelo uso do letrozol e diminuição em 60% na mortalidade para as mulheres com linfonodos positivos (GOSS, 2006). Baseando-se nestes resultados há a recomendação de uso do letrozol por 5 anos após a terapia tradicional com TMX pelo Consenso de St Gallen (THUERLIMANN et al., 2007), pelo NCCN (CARLSON et al., 2006) e pela ASCO (WINER et al., 2005).

## IA em substituição ao TMX

Os IA letrozol e anastrozol são indicados como sendo de uso preferencial em mulheres com câncer de mama sensível ao tratamento endócrino, sendo o TMX opção quando há contra-indicação ao uso dos IA ou quando é considerado o tratamento seqüencial com TMX e IA, segundo o consenso de St Gallen (THUERLIMANN et al., 2007), o NCCN (CARLSON et al., 2006) e a ASCO (WINER et al., 2005). A recomendação do uso de letrozol como tratamento endócrino inicial é baseada nos resultados do BIG 1-98, estudo que comparou o uso de TMX e letrozol (2,5mg ao dia) na adjuvância incluindo 8028 mulheres na pós-menopausa. Após 5 anos de uso, observou-se redução do número de recorrências em 18% ,  $p=0,007$ , no grupo que usou letrozol (COATES et al., 2007). Já o estudo ATAC "*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*" justifica a recomendação de uso inicial de anastrozol (por ter demonstrado redução de 13%,  $p=0,01$ , no número de recorrências com o uso de anastrozol (1mg ao dia) por 5 anos quando comparado ao uso de TMX no mesmo período (HOWELL et al., 2005).

## Uso seqüencial de TMX e IA

O tratamento com TMX por 2 a 3 anos seguido pelo uso de IA por mais 2 ou 3 anos (completando 5 anos no total) é também uma opção para o tratamento pós cirúrgico de mulheres na pós-menopausa, indicado pelo consenso de St Gallen (THUERLIMANN et al., 2007), pelo NCCN (CARLSON et al., 2006) e pela ASCO (WINER et al., 2005). O estudo IES "*Intergroup Exemestane Study*" observou redução de 24% no número de recorrências ( $p=0,0001$ ) e no grupo de pacientes que usou examestano (25mg ao dia) por 2 a 3 anos após TMX (5 anos no total) comparado com aquelas que usaram somente TMX por todo o período (COOMBES et al., 2007). Em relação ao uso de anastrozol (1mg ao dia) de forma seqüencial

após o TMX por 5 anos no total também se mostrou superior ao uso exclusivo de TMX, com redução de 41%,  $p < 0,0001$ , no número de recorrências em meta-análise que incluiu os estudos *Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group – ABCSG 8*, *Arimidex-Nolvadex – ARNO 95*, e o *Italian Tamoxifen Anastrozole – ITA* (JONAT et al., 2006).

### **Efeitos indesejáveis da terapia endócrina**

Os estudos aqui apresentados comprovam a eficácia do tratamento endócrino para as mulheres menopausadas com diagnóstico de câncer de mama. Entretanto é importante a consideração da relação entre risco e benefício de forma global para a formulação da decisão terapêutica, especialmente sobre o tratamento adjuvante, situação em que as pacientes receberão o tratamento por ao menos cinco anos.

#### Risco cardiovascular

O uso de TMX foi relacionado à redução dos níveis séricos de colesterol total e de LDL e aumento da concentração de triglicérides, durante o período de tratamento (IMPERATO et al., 2003), sendo que após 6 meses da interrupção do uso já pode ser notada alteração desse padrão, com aumento do colesterol total e LDL e diminuição de triglicérides (MARKOPOULOS et al., 2006). No entanto tal melhora no perfil lipídico parece não se traduzir em diminuição do risco cardiovascular. Uma publicação da análise de 4 estudos envolvendo o uso de TMX como tratamento adjuvante do câncer de mama mostrou não haver diferença no número de mortes por doença arterial coronariana, enquanto que verificou-se aumento em 90% do risco de diagnóstico de tromboembolismo nessas pacientes, quando comparado com uso de placebo (CUZICK, 2003).

Em relação aos efeitos dos IA sobre o perfil lipídico, estes parecem não influenciá-lo quando comparados ao placebo. Em publicação de dados do MA.17 sobre esses parâmetros foi demonstrado que com 36 meses de uso do letrozol na adjuvância estendida (após uso de 5 anos de TMX) não foi observada alteração significativa nas dosagens séricas de colesterol total, LDL, HDL, triglicérides quando comparado ao uso de placebo (WASAN et al., 2005).

### Osteoporose

Nos estudos que comparam diretamente o uso de TMX e IA nota-se significativo aumento do número de fraturas ósseas no grupo de pacientes que usaram IA, aumento de 48% no risco associado ao uso de letrozol (COATES et al., 2007) e de 49% associado ao uso de anastrozol (HOWELL et al., 2005). Essa diferença no risco pode ser em parte justificada pelo efeito de agonista estrogênico do TMX no tecido ósseo, reduzindo o número de fraturas em 32% quando comparado com o uso de placebo no tratamento adjuvante do câncer de mama, conforme observado no *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study - NASBP P1* (FISHER et al., 2005). Além disso, os IA podem também contribuir para a diferença de risco no sentido em que expõem todos os tecidos aos efeitos da privação estrogênica. O MA-17 mostrou aumento da incidência de osteoporose em 35% no grupo de pacientes que usou letrozol em relação às que usaram placebo após seguimento de 2,4 anos (após uso prévio de TMX por 5 anos), adicionalmente um aumento não significativo no número de fraturas ósseas também foi reportado (GOSS, 2006).

### Outros efeitos colaterais

O uso de TMX é associado a aumento de mais de três vezes no risco de câncer de endométrio e em 21% o risco de desenvolver catarata (FISHER et al., 2005), efeitos não observados na utilização de IA em outros estudos.

O tratamento com IA associa-se com maior taxa de artralgia e de sintomas relacionados ao hipoestrogenismo, como fogachos (HOWELL et al., 2005; GOSS, 2006; COATES et al., 2007).

## 1.2 Câncer de mama e disfunção endotelial (Anexo B)

---

As doenças do sistema circulatório correspondem à principal causa de morte no Brasil, tendo ocorrido 285.543 mortes por essa causa (total de 1.024.073) durante o ano de 2004, segundo dados mais recentes do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde). Em segundo lugar aparecem as mortes por câncer, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma. O câncer de mama apresenta incidência crescente mundialmente sendo, no Brasil, o risco estimado em 2006 em 52 casos novos por 100.000 mulheres, pelo INCA (INCA, 2006a).

A associação de câncer e trombofilia foi descrita pela primeira vez em 1865, pelo clínico francês Armand Trousseau (TROUSSEAU, 1865), porém somente nas três últimas décadas maior atenção foi dada à questão da associação molecular entre a ativação da coagulação e a progressão do câncer (RICKLES, 2006).

### **Doença Cardiovascular e Aterosclerose**

A maneira mais efetiva de prevenir a trombose arterial e, conseqüentemente, eventos cardiovasculares, é a prevenção da aterosclerose (BLANN, 2003; CROWTHER, 2005). Em 1912 dois patologistas americanos da Universidade de Pittsburgh publicaram um resumo de seus estudos sobre artérias humanas e concluíram: “É bastante inútil discutir questões a respeito do desenvolvimento da esclerose da íntima se somente discutirmos sobre os estágios avançados da doença. Se pretendermos avançar na complexa questão da aterosclerose deve-se preocupar em entender a lesão desde seus primórdios” (KLOTZ; MANNING, 1912). Tais

autores julgavam haver forte indicação de que a produção de tecido pela íntima dos vasos se devia ao resultado da irritação direta deste tecido pela presença de infecção ou toxinas, ou ainda pela estimulação de produtos da degeneração primária desta camada.

A aterosclerose é um processo que acomete artérias de médio e grande calibre e se inicia com o aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais como resposta ao fluxo turbulento em um ambiente sérico desfavorável do ponto de vista do perfil lipídico. Não é mais considerada simplesmente uma desordem secundária a anormalidades no metabolismo lipídico, atualmente é bem descrito o papel da inflamação desde os estágios iniciais da formação da placa aterosclerótica: na promoção da mitogênese, proliferação da matriz intracelular, angiogênese e desenvolvimento das células espumosas (LIBBY; THEROUX, 2005). A proteína C reativa (pCr) e o fibrinogênio são marcadores associados a patogenia da aterosclerose em modelos animais e seus efeitos incluem diminuição do óxido nítrico (NO) e prostaciclina endoteliais (DANENBERG et al., 2003). A evolução da placa aterosclerótica é marcada pelo crescimento gradual, conseqüente à deposição de células espumosas, com a placa fibrosa definitiva sendo elaborada lentamente pela proliferação de células musculares lisas e de matriz intracelular. Entretanto, o infarto miocárdico muitas vezes ocorre em artérias com pouca oclusão prévia, sugerindo um crescimento abrupto destas placas. A oclusão trombótica aguda se dá como conseqüência da súbita ruptura da placa aterosclerótica através de fissura espontânea, quando exposta ao estresse do turbilhonamento em locais de estenose ou de ramificação arterial. Tal dano provoca a denudação endotelial estimulando a formação de trombo local (DAVIES, 1990), este pode obstruir parcial ou totalmente a parede do vaso, sendo responsável pelo evento clínico.

A lesão da parede do vaso caracteriza-se por perda de continuidade do endotélio e pode ser causada em algumas situações: angioplastia, estresse hemodinâmico, tabagismo, hipercolesterolemia ou por enzimas liberadas por plaquetas e leucócitos (CROWTHER, 2005). A

perda de células endoteliais expõe o subendotélio às plaquetas e aos fatores da coagulação. A adesão plaquetária é mediada por diversas substâncias, entre elas o fvW. O endotélio exposto a endotoxinas, citocinas, trombina e hipóxia acaba promovendo a coagulação e regulando o fluxo sanguíneo através de substâncias vasoconstrictoras, como endotelinas, e vasodilatadoras, como prostaciclina e NO (CROWTHER, 2005).

### **Função endotelial**

A disfunção endotelial é observada em estágios iniciais da maioria das doenças cardiovasculares e surge como um fator preditor independente para eventos clínicos na doença coronariana, hipertensão e falência cardíaca. Neste contexto, a avaliação da função endotelial passa de um intermediário na avaliação do benefício de tratamentos cardiovasculares e emerge como um alvo farmacológico direto (JOANNIDES et al., 2006).

### **Marcadores de função endotelial**

#### *Fator de von Willebrand*

O fator de von Willebrand (fvW) é uma glicoproteína sintetizada pelo endotélio e é responsável pela mediação entre a adesão plaquetária ao subendotélio durante o processo de hemostasia primária. O aumento dos níveis séricos de fvW é associado com maior risco de eventos clínicos da doença cardiovascular, principalmente tromboembolismo, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (BLANN, 2006). Níveis elevados de fvW foram também descritos em alguns tipos de cânceres (cabeça e pescoço, próstata) e bem correlacionados ao câncer de mama (ROHSIG et al., 2001). Em um estudo foi comparada a dosagem de fvW em 128 pacientes com câncer de mama, em 47 pacientes com doença

mamária benigna e em 27 controles. A média e desvio padrão da dosagem de fvW no grupo controle foi de  $130,6 \pm 45$  U/dl, nas pacientes com doença benigna  $148,4 \pm 59$  U/dl e nas com câncer  $170,7 \pm 78$  U/dl, sendo significativa a diferença encontrada entre as pacientes com câncer e os outros dois grupos (ROHSIG et al., 2001). Durante a fase ativa da angiogênese tumoral, são sintetizados fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2), que contribuem para a proliferação e diferenciação do endotélio vascular, o maior produtor de fvW, resultando em aumento dos níveis séricos de fvW (GIL-BAZO et al., 2003). O fvW também contribui para a adesão entre plaquetas e células tumorais, através das integrinas, sendo este um passo importante na determinação de como a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária podem ser mediadas pela célula tumoral. Outro resultado importante da ligação entre plaquetas e células neoplásicas é a capacidade que esta adquire de migrar, auxiliando no processo de metástase. De fato, é demonstrada taxas de fvW sérico mais altas em pacientes com câncer de estadios mais avançados do que em estadios iniciais (ROHSIG et al., 2001).

O aumento dos níveis séricos do fvW tem sido descrito como fator de risco para desfechos clínicos da doença cardiovascular como tromboembolismo, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (BLANN, 2006). Em uma meta-análise foi confirmada a relação do fvW com doença coronariana, sendo verificado que o grupo constituído das pessoas com níveis séricos acima do percentil 67 apresentou 50% mais risco de doença cardiovascular quando comparado ao grupo das pessoas com níveis séricos abaixo do percentil 33 (WHINCUP et al., 2002).

### *Selectinas*

A família das selectinas é composta por três membros: L-selectina, P-selectina e E-selectina, sendo esta última a única encontrada apenas no endotélio. Esta especificidade

proporciona uma oportunidade para o estudo de aspectos fisiopatológicos do endotélio na doença cardiovascular e inflamatória (JOANNIDES et al., 2006).

Tanto a E-selectina como a P-selectina são moléculas expressas na superfície do endotélio quando estimulado por algumas citocinas inflamatórias (interleucinas 1 e 10, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ); a P-selectina pode ser também encontrada na superfície de plaquetas ativadas. Quando expressas, as selectinas promovem a adesão do leucócito ao endotélio. A fração solúvel da E-selectina é proveniente da clivagem proteolítica da molécula expressa na membrana celular (JOANNIDES et al., 2006). O papel destas moléculas na história natural do câncer não é completamente esclarecido, mas acredita-se que desempenhe função fundamental no processo de disseminação por via hematogênica do tumor, promovendo a adesão da célula neoplásica ao endotélio (SHEEN-CHEN et al., 2004).

Níveis séricos aumentados de E-selectina são associados com estágios avançados de câncer de mama e com a presença de células tumorais circulantes (SILVA et al., 2006). Em outra publicação, foi obtida média da dosagem sérica de E-selectina significativamente maior em pacientes com câncer de mama quando comparado com mulheres saudáveis: 73,7 e 36,3ng/ml, respectivamente, além de significativa correlação positiva com o estadiamento clínico (SHEEN-CHEN et al., 2004). Além disso, o aumento da concentração sérica de E-selectina foi associado com tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, doença arterial coronariana, doença cérebro-vascular e diabetes mellitus (ROLDAN et al., 2003). Acredita-se que o aumento da concentração sérica observada na hipertensão arterial deva refletir a disfunção endotelial, mas não necessariamente, predizer o desenvolvimento de lesão de órgão alvo (GALEN, 2002), pois, diferentemente do fvW, a E-selectina está mais relacionada com a regeneração do endotélio após o dano tissular provocado pela progressão da doença (BLANN, 2003). Apesar da capacidade da dosagem de E-selectina em predizer eventos adversos e suas implicações clínicas serem bastante controversas, pode-se dizer que, em pacientes sofrendo

de um evento cardiovascular agudo, a E-selectina freqüentemente se encontra aumentada, quando comparado com controles pareados por sexo e idade (ROLDAN et al., 2003).

Outra selectina, a P-selectina, está também presente em maior concentração sérica em pacientes com câncer de mama (BLANN et al., 2001). Quanto ao seu papel na disseminação neoplásica, sabe-se que esta molécula expressa pelas células endoteliais estimuladas promove a adesão de células tumorais circulantes mediando a disseminação tumoral por via hematogênica, enquanto a interação dessas células com a P-selectina expressa em plaquetas ativadas supre o tumor com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas (CHEN; GENG, 2006). Além do câncer, esta molécula é encontrada em níveis elevados em situações como diabetes, hipertensão, tabagismo e hipercolesterolemia e parece ser capaz de prever a ocorrência de um evento cardiovascular adverso (BLANN et al., 2003).

#### *Dilatação mediada por fluxo dependente do endotélio (DMF)*

O estudo da doença vascular pré-clínica se tornou mais viável através da aplicação de técnicas ultra-sonográficas não invasivas. A avaliação da dilatação da artéria braquial foi originalmente descrita em 1992 e é realizada por ultra-sonografia após oclusão arterial temporária através de torniquete aplicado ao membro superior (CELERMAJER et al., 1992; CORRETTI et al., 2002). Retirado o torniquete, é então observada a dilatação do vaso em resposta a tensão de cisalhamento associada ao súbito aumento de fluxo, resposta esta dependente de NO e independente de prostaciclina (CORRETTI et al., 2002). O NO é produzido no endotélio via L-arginina por enzimas óxido nítrico sintases, a ativação desta via se dá através de estímulos como hipóxia, acetilcolina, bradicinina e serotonina. O NO promove vasodilatação direta; inibe a liberação de fatores vasoconstritores, proliferação de células musculares lisas, adesão leucocitária e agregação plaquetária (JOANNIDES et al., 1995).

Uma porcentagem de dilatação menor que o normal é observada tanto em pacientes com doença aterosclerótica como naqueles em risco para tal: mulheres pós-menopausadas, hipertensos, diabéticos, obesos, sedentários, tabagistas ativos e passivos e naqueles com aumento dos níveis séricos de colesterol e homocisteína. O controle destes fatores de risco melhora a função endotelial ao aumentar a DMF, o que expressa um aumento na liberação de NO (ESPER et al., 2006). Em um estudo que seguiu por 5 anos 74 pacientes com dor torácica mostrou que aqueles com DMF normal, considerada como dilatação maior ou igual a 10%, apresentaram menor número de eventos coronarianos e foram submetidos a angioplastia e/ou revascularização cardíaca menos freqüentemente. A análise destes dados mostrou sensibilidade de 86%, especificidade de 51% e valor preditivo negativo de 85%, considerando como positivo o exame que resultou em menos de 10% de dilatação na artéria braquial e o desfecho positivo como infarto agudo do miocárdio, angioplastia ou revascularização do miocárdio (NEUNTEUFL et al., 2000).

Esse padrão de achados é semelhante aos identificados para fvW e além disso, ambos são capazes de predizer o desenvolvimento de eventos cardiovasculares maiores. É demonstrada inclusive correlação inversa entre os dois, ou seja, aqueles indivíduos com os maiores níveis séricos de fvW apresentam também DMF alterada, enquanto que aqueles com baixos níveis de fvW apresentam DMF normal (BLANN, 2003).

#### *Células endoteliais circulantes*

O achado de células endoteliais livres na circulação sanguínea é raro em indivíduos saudáveis, e tem sido indicada como um estágio final do injúrio endotelial. De fato, sua presença é fortemente correlacionada com doença coronariana aguda; o aumento de seus níveis nas primeiras 48 horas após um evento coronariano é também considerado fator preditivo de morte. Este promissor marcador de dano endotelial apresenta boa correlação

com outros marcadores de função endotelial, como fvW e DMF, em pacientes com síndrome coronariana aguda. Tais achados sugerem que o dano endotelial agudo, como o manifestado pelo aumento das CEC pode ser o principal determinante da alteração da vasodilatação mediada por fluxo, provavelmente devido à diminuição da biodisponibilidade de NO. Na doença coronariana estável, há um menor grau de injúria endotelial, representada pela menor quantidade de CEC, entretanto, a mantida disfunção endotelial e inflamação, indicadas pelos altos níveis de fvW e IL-6 em relação aos controles, pode ser refletida pela alteração da FMD nesses pacientes (LEE et al., 2006).

---

## **2. Justificativa da proposição**

## 2 Justificativa da proposição

---

O tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais inclui o tratamento endócrino com tamoxifeno e, mais recentemente, com os inibidores de aromatase de terceira geração (IA). No campo da adjuvância, essas medicações são utilizadas por pelo menos cinco anos sendo, portanto, a segurança em longo prazo uma questão de grande importância. Dados publicados (LAMONT et al., 2003) mostram que mulheres idosas com história de câncer de mama tratado na pós-menopausa apresentam risco 34% menor de hospitalização por infarto agudo do miocárdio comparado aquelas sem história de câncer de mama. Os autores atribuem esse fato ao possível efeito protetor do tratamento com tamoxifeno sobre a saúde cardiovascular. De fato, uma meta-análise recentemente publicada (CUPPONE et al., 2008) mostrou que pacientes recebendo IA apresentam um risco 31% maior de eventos cardiovasculares graves que aqueles recebendo tamoxifeno. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com tamoxifeno por 6 meses melhorou a dilatação da artéria braquial mediada por fluxo (DMF) e reduziu a espessura da íntima-média da carótida (EIM) em mulheres tratadas de câncer de mama (STAMATELOPOULOS et al., 2004).

Vários marcadores podem ser utilizados para estabelecer o risco de doença cardiovascular, incluindo o perfil lipídico e o estudo ultra-sonográfico da função endotelial. O tratamento com tamoxifeno mostrou exercer um efeito benéfico sobre o colesterol em mulheres menopausadas (LEWIS, 2007), reduzindo os níveis séricos de colesterol total e LDL. Entretanto, um efeito indesejável de aumento nos triglicérides pode também ser verificado. Por outro lado, o efeito dos IA sobre os lipídios séricos permanece ainda controverso, sendo improvável que haja um efeito significativo (LEWIS, 2007). Um avanço recente na cardiologia é

a avaliação da função endotelial através da ultra-sonografia, através de marcadores como a DMF e a EIM (KAPUKU et al., 2006). A DMF constitui um método robusto e reprodutível para quantificação da função endotelial (DONALD et al., 2006) enquanto que a EIM é um marcador da aterosclerose inicial capaz de predizer eventos cardiovasculares como acidentes vasculares cerebrais e infarto agudo do miocárdio (LORENZ et al., 2007). Adicionalmente, o índice de rigidez ( $\beta$ ) permite o estudo das propriedades funcionais das artérias (LAURENT; BOUTOUYRIE, 2007).

---

## **3. Objetivos**

### 3 Objetivos

---

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da terapia endócrina sobre o risco cardiovascular em mulheres tratadas por câncer de mama.

#### 3.2 Objetivos específicos

Verificar se há diferença nos lipídios séricos em mulheres sobreviventes de câncer de mama submetidas a nenhum tratamento endócrino comparando-as com mulheres em uso de tamoxifeno ou letrozol como terapia endócrina adjuvante.

Verificar se há diferença na DMF em mulheres sobreviventes de câncer de mama submetidas a nenhum tratamento endócrino comparando-as com mulheres em uso de tamoxifeno ou letrozol como terapia endócrina adjuvante.

Verificar se há diferença na EIM em mulheres sobreviventes de câncer de mama submetidas a nenhum tratamento endócrino comparando-as com mulheres em uso de tamoxifeno ou letrozol como terapia endócrina adjuvante.

Verificar se há diferença no índice de rigidez ( $\beta$ ) em mulheres sobreviventes de câncer de mama submetidas a nenhum tratamento endócrino comparando-as com mulheres em uso de tamoxifeno ou letrozol como terapia endócrina adjuvante.

---

## **4. Métodos**

## 4 Métodos

---

### 4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo de série de casos.

### 4.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão adotados foram o diagnóstico de câncer de mama entre dois a sete anos após a menopausa e já término da radioterapia e quimioterapia há mais de seis meses.

### 4.3 Critérios de exclusão

As pacientes foram excluídas por serem tabagistas, por apresentar antecedente de acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio ou diabetes ou por apresentar índice de massa corporal (IMC) acima de  $30\text{Kg/m}^2$ .

### 4.4 Casuística

Todas as 56 pacientes atendidas no Ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em uso corrente de letrozol foram convidadas a participar deste estudo. Quarenta mulheres preencheram todos os critérios de inclusão e foram recrutadas (grupo de letrozol – LTZg). Pareando por idade, outras 40 pacientes com câncer de mama em uso corrente de tamoxifeno (grupo de tamoxifeno – TMXg), atendidas no mesmo ambulatório,

foram recrutadas. A escolha pelo tipo de tratamento endócrino empregado havia sido previamente feita pelo médico assistente do caso, baseando-se na história prévia de eventos cardiovasculares e tromboembólicos, status endometrial, experiência pessoal e possibilidade do paciente ter acesso à droga prescrita. Todas as pacientes estavam usando regularmente as drogas por mais de seis meses como tratamento endócrino adjuvante, para assegurarmos de que o efeito do tamoxifeno sobre a DMF e a EIM havia ocorrido (STAMATELOPOULOS et al., 2004). Por fim, outras 40 mulheres, também pareadas por idade, sobreviventes do câncer de mama e sem qualquer forma de tratamento há mais de seis meses foram recrutadas. Essas mulheres tiveram tumores que não expressavam receptores hormonais e, conseqüentemente, não foram submetidas a nenhum tratamento endócrino (grupo sem tratamento endócrino – SETg). No total 17 mulheres foram excluídas: seis do SETg, cinco do TMXg e seis do LTZg; as causas de exclusão de cada uma das pacientes encontram-se na Tabela 1. Todas as mulheres recebendo tratamento endócrino apresentaram tumores positivos para receptores hormonais. Das 34 pacientes do LTZg, uma havia previamente usado tamoxifeno por um mês e o trocou por letrozol por apresentar reação alérgica; todas as outras mulheres estavam usando letrozol como primeira escolha. Todas as características estudadas das componentes dos três grupos encontram-se na Tabela 2. Todas as mulheres assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (Anexo D).

**Tabela 1** Causas de exclusão de cada paciente dos três grupos estudados: Sem Tratamento Endócrino (STeg), tamoxifeno (TMXg) e letrozol (LTZg).

<i>Grupo</i>	<i>Sujeito</i>	<i>Razão da exclusão</i>
STeg	1	IMC > 30 (33,1)
	2	Tabagista
	3	IMC > 30 (39,1) + AVC prévio + DM
	4	IMC>30 (32,2)
	5	IMC>30 (35,6) + DM
	6	IMC>30 (30,9) + Tabagismo
TMXg	1	IMC > 30 (31,6)
	2	IMC > 30 (33,2) + DM
	3	IAM prévio
	4	DM
	5	IMC > 30 (31,2) + IAM prévio
LTZg	1	IMC > 30 (30,4)
	2	AVC prévio
	3	IMC > 30 (37,3) + DM
	4	AVC prévio
	5	IMC > 30(34,2) + DM
	6	IMC > 30 (31,1) +AVC prévio

IMC = índice de massa corporal; IAM = infarto agudo do miocárdio; AVC = acidente vascular cerebral.

**Tabela 2** Características clínicas e laboratoriais dos três grupos: Sem Tratamento Endócrino (STeg), tamoxifeno (TMXg) e letrozol (LTZg).

	<b>STeg</b>	<b>TMXg</b>	<b>LTZg</b>	
	N (%)	N (%)	N (%)	p
Estadio clínico I <sup>#</sup>	14(41,2)	16(45,7)	20(58,8)	0,32*
Estadio clínico II <sup>#</sup>	16(47,1)	13(37,1)	12(35,3)	0,57*
Estadio clínico III <sup>#</sup>	4(11,8)	6(17,1)	2(5,9)	0,35*
Total	34	35	34	
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	p
Idade (anos)	60,16±4,38	62,24±5,56	61,47±5,82	0,26**
Diagnóstico (anos)	4,27±1,07	4,13±1,07	4,30±0,78	0,74**
Tempo de tratamento (anos)		2,90±1,04	3,13±0,73	0,29***
Menopausa (anos)	13,08±3,16	14,53±4,25	14,30±5,01	0,31**
Diâmetro braquial (mm)	3,24±0,13	3,27±0,11	3,26±0,10	0,46**
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,57±1,68	24,95±1,96	25,44±1,84	0,34**
PAS (mmHg)	133,38±12,15	134,29±13,11	135,03±10,43	0,85**
PAD (mmHg)	80,44±9,10	81,77±9,45	82,06±9,81	0,75**
Glicose (mg/dL)	90,62±11,82	91,09±12,54	89,50±10,52	0,85**
Colesterol total (mg/dL)	245,09±35,35 <sup>a</sup>	219,29±36,31 <sup>a,b</sup>	250,59±38,37 <sup>b</sup>	<0,01**
HDL (mg/dL)	50,15±7,55	50,49±7,66	49,18±6,40	0,74**
Triglicérides (mg/dL)	122,09±33,42	139,34±41,82 <sup>c</sup>	111,35±28,22 <sup>c</sup>	<0,01**

\*= valor de p obtido através do  $\chi^2$ ; \*\* = valor de p obtido através de ANOVA; \*\*\* = valor de p obtido através de teste t de Student não pareado.

A mesma letra em diferentes colunas mostra diferenças significantes utilizando-se pós teste de Tukey: a=(p=0,01); b,c=(p<0,01).

<sup>#</sup> = De acordo com a 6ª edição da Classificação TNM (SINGLETARY; GREENE, 2003).

IMC = índice de massa corporal; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica.

#### 4.5 Dosagens séricas

---

Todas as participantes possuíam dosagens séricas prévias de colesterol total, HDL, triglicérides e glicemia com pelo menos 12 horas de jejum prévio, realizadas até seis meses antes da data de entrada no estudo.

#### 4.6 Avaliação ultra-sonográfica e medida da pressão arterial

---

Todas as avaliações foram realizadas pela manhã, entre 7 e 9 horas, após um período de repouso de 15 minutos durante o qual a paciente permaneceu deitada em posição supina em uma sala com temperatura controlada entre 20 e 23 graus Celsius na Escola de Ultra-Sonografia e Reciclagem Médica de Ribeirão Preto (EURP). Todas as pacientes fizeram um jejum noturno de, no mínimo 8 horas. A pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram aferidas no braço superior esquerdo utilizando um esfigmomanômetro convencional. Foi considerada a média de três medidas consecutivas. Os exames ultra-sonográficos foram então realizados utilizando-se um transdutor linear de 3 a 12MHz de um aparelho Philips HD11 (Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA) com um eletrocardiograma acoplado. Todas as medidas da pressão arterial e os exames ultra-sonográficos foram realizados pelo mesmo operador (WPM), que desconhecia a história da paciente.

##### Espessura da íntima-média da carótida (EIM)

A medida da EIM foi realizada como previamente descrita na literatura (RAITAKARI et al., 2003; MARTINS et al., 2008). A imagem da carótida comum esquerda, incluindo a imagem do bulbo, foi obtida e então foi gravado um filme de cinco segundos incluindo o sinal contínuo do eletrocardiograma. O filme gravado era avaliado logo após o término de toda a avaliação ultra-sonográfica pelo mesmo operador. Guiado pela onda do eletrocardiograma, o quadro correspondente ao final da diástole (coincidente com a onda r) com a melhor qualidade subjetiva era escolhido. Desta imagem, eram realizadas quatro medidas da espessura da camada íntima-média da parede distal da carótida comum esquerda, aproximadamente 10 a

20mm proximal ao bulbo carotídeo. A média de quatro medidas foi considerada como a EIM de cada paciente.

#### Índice de rigidez ( $\beta$ )

Para o cálculo deste índice os diâmetros sistólico (DSC) e diastólico (DDC) da carótida foram obtidos usando o modo B durante as ondas R e T do eletrocardiograma, respectivamente (TSIVGOULIS et al., 2006; MARTINS et al., 2008). Essas medidas foram feitas quatro vezes, aproximadamente 10 a 20mm proximal ao bulbo da carótida, medindo a partir da íntima da parede distal até a íntima da parede proximal. A média destas quatro medidas era considerada como o DSC e DDC de cada paciente. O índice de rigidez ( $\beta$ ) da carótida era então calculado conforme fórmula descrita na literatura (MACKENZIE et al., 2002):  $(\beta) = \ln(\text{PAS}/\text{PAD})/((\text{DSC}-\text{DDC})/\text{DDC})$ ; onde  $\ln$  = logaritmo natural.

#### Dilatação mediada por fluxo da artéria braquial (DMF)

A artéria braquial direita era visualizada aproximadamente 5 a 10cm proximal à fossa ante-cubital no plano longitudinal. Um segmento que apresentasse clara interface entre a o lúmen e a parede vascular era então selecionado e gravado um filme com 5 segundos de duração incluindo o sinal contínuo do eletrocardiograma. Este filme era também analisado logo após o término de toda a avaliação ultra-sonográfica. De forma subjetiva, era escolhido o melhor quadro correspondendo ao final da diástole (coincidente com a onda R do eletrocardiograma) e quatro medidas do diâmetro arterial eram realizadas, da íntima da parede distal até a íntima da parede proximal. A média destas quatro medidas era considerada como o diâmetro basal da artéria braquial ( $\text{DB}_{\text{pré}}$ ). Com a finalidade de induzir a vasodilatação, um manguito pneumático de um esfigmomanômetro convencional era posicionado no

antebraço imediatamente abaixo do epicôndilo medial e inflado até 50mmHg acima da PAS ou 200mmHg, qual fosse maior, e assim permanecia por cinco minutos. Decorridos cinco minutos o manguito era esvaziado rapidamente e, 60 segundos após, um novo filme com cinco segundos de duração era gravado. Novos valores do diâmetro da artéria braquial ( $DB_{pós}$ ) eram obtidos como já descrito anteriormente e a DMF calculada através da fórmula:  $DMF = ((DB_{pós} - DB_{pré}) / DB_{pré})$ . O intervalo de 60 segundos entre a liberação do manguito e a realização das medidas foi escolhido porque diversos estudos mostram que o máximo aumento do diâmetro ocorre neste período (CORRETTI et al., 2002; CRAIEM et al., 2008).

## 4.7 Estatística

---

O tamanho amostral foi calculado baseado na DMF, a variável principal deste estudo. Conforme estimativa publicada, em um estudo de desenho transversal são necessários 23 sujeitos por grupo para mostrar uma diferença de 60% (bi-caudal) na DMF (por exemplo, de 5% para 8%, com poder de 90%). Da mesma forma, para demonstrar-se uma diferença de 40% (por exemplo, de 5% para 7%, com poder de 90%) são necessários 46 sujeitos por grupo. Em nosso serviço havia 56 mulheres em uso de letrozol e um número ainda maior de usuárias de tamoxifeno e de mulheres após tratamento de câncer de mama não submetidas a nenhum tratamento endócrino. Desta forma, se convidássemos todas as pacientes usuárias de letrozol e um número semelhante para os outros dois grupos, o poder para demonstrar uma diferença clinicamente significativa na DMF (>2%) seria alto o suficiente.

Os dados de cada variável foram testados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. A média e desvio padrão (DP) foram determinados e os dados submetidos à análise de variâncias (ANOVA) com pós-teste de Tukey para detectar diferenças entre os grupos. Teste t de Student não pareado foi utilizado para comparação do tempo desde o início do tratamento entre TMXg e LTZg.

Considerando a natureza não prospectiva da metodologia empregada, alguns fatores de risco tradicionais foram considerados na análise estatística de forma que o acúmulo de pequenas diferenças no perfil de risco de cada grupo não se somasse afetando as diferenças encontradas nos parâmetros estudados. Desta forma, os dados foram submetidos à análise de covariâncias (ANCOVA) utilizando como co-variáveis idade, IMC, tempo desde a menopausa,

PAS e PAD. Todas as análises foram feitas utilizando o SPSS 16.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

---

## **5. Resultados**

## 6 Resultados

---

Todas as características dos três grupos incluindo o perfil lipídico encontram-se na Tabela 2. Os grupos não diferiram significativamente nos valores de HDL enquanto que o TMXg apresentou o menor valor de colesterol total e o maior de triglicérides quando comparados aos dois outros grupos.

Os valores dos parâmetros ultra-sonográficos estudados foram comparados através de ANOVA, todos os valores obtidos estão na Tabela 3. Nenhuma diferença significativa na EIM foi observada entre os três grupos. O TMXg apresentou o maior valor de DMF quando comparado aos dois outros grupos além de um valor menor do índice de rigidez ( $\beta$ ) em comparação ao LTZg. Podemos ainda observar que nenhuma das medidas ultra-sonográficas diferiu significativamente entre LTZg e STEg.

Após ajuste para alguns possíveis fatores geradores de confusão como idade, IMC, tempo desde a menopausa, PAS e PAD através da aplicação de ANCOVA, estimamos novos valores de média e erro padrão para cada parâmetro ultra-sonográfico (Tabela 4). Os resultados obtidos desta forma foram similares aos encontrados através do ANOVA.

Finalmente, considerando o desvio padrão observado para a DMF nas nossas pacientes (2,5%), o poder para encontrarmos uma diferença maior que 2% foi mais alto que 90% (poder de 90% para 33 sujeitos por grupo). Em relação à EIM, observamos um desvio padrão de 0,11mm, o que corresponde em nosso estudo a um poder maior que 95% para a detecção de uma diferença maior que 0,1mm, valor considerado como variação mínima para que seja atribuído aumento de risco cardiovascular (LORENZ et al., 2007) (poder de 95% com 31

sujeitos por grupo). Como o índice de rigidez carotídeo ( $\beta$ ) não é um parâmetro estudado extensivamente na literatura, não encontramos o mínimo valor com importância clínica.

**Tabela 3** Comparação das medidas ultra-sonográficas dos três grupos através de ANOVA: grupos Sem Tratamento Endócrino (STeg), tamoxifeno (TMXg) e letrozol (LTZg).

	<i>EIM (mm)</i>	<i>DMF (%)</i>	<i>Índice de rigidez (β)</i>
STeg	0,72±0,11	4,66±2,52	5,99±1,86
TMXg	0,71±0,11	6,32±2,33	5,08±1,68
LTZg	0,72±0,11	4,10±2,06	6,28±1,75
p (ANOVA)	0,93	<0,01	0,01
Comparações pareadas (p)			
STeg vs, TMXg	0,92	0,01	0,08
STeg vs, LTZg	0,97	0,57	0,78
TMXg vs, LTZg	0,99	<0,01	0,02

Dados expressos através de média ± desvio padrão da média.

**Tabela 4** Comparação das medidas ultra-sonográficas dos três grupos ajustadas para alguns possíveis fatores de confusão (idade, índice de massa corporal, tempo desde a menopausa, pressão arterial sistólica e diastólica) através de ANCOVA: grupos Sem Tratamento Endócrino (STeg), tamoxifeno (TMXg) e letrozol (LTZg).

	<i>EIM (mm)</i>	<i>DMF (%)</i>	<i>Índice de rigidez (<math>\beta</math>)</i>
STeg	0,73±0,01	4,63±0,34	6,04±0,15
TMXg	0,71±0,01	6,33±0,34	5,03±0,15
LTZg	0,71±0,01	4,11±0,34	6,28±0,15
p (ANCOVA)	0,33	<0,01	<0,01
Comparações pareadas (p)			
STeg vs, TMXg	0,17	<0,01	<0,01
STeg vs, LTZg	0,24	0,29	0,26
TMXg vs, LTZg	0,84	<0,01	<0,01

Dados expressos através de média estimada  $\pm$  erro padrão utilizando ANCOVA.

---

## **6. Discussão**

## 7 Discussão

---

Assim como outros moduladores seletivos do receptor de estrogênio, o tamoxifeno apresenta efeito estrogênico sobre alguns marcadores séricos de risco cardiovascular (LOVE et al., 1994; CLARKE et al., 2001). No presente estudo, nós observamos os menores níveis de colesterol total no TMXg em comparação aos dois outros grupos, enquanto que não identificamos diferença significativa entre o LTZg e o STEg. Nossos achados estão de acordo com relatos prévios no qual o uso de tamoxifeno no tratamento do câncer de mama mostrou ser capaz de reduzir o nível sérico de colesterol total e de não exercer efeito sobre o HDL comparando com pacientes não submetidas a tratamento endócrino (LOVE et al., 1994). Em uma análise de segurança do estudo BIG 1-98 (MOURIDSEN et al., 2007), tanto o tamoxifeno quanto o letrozol causaram diminuição na concentração sérica de colesterol total, entretanto a diminuição foi mais precoce e mais pronunciada no grupo de usuárias de tamoxifeno. Quanto aos triglicérides, o maior valor encontrado foi no grupo TMXg, apesar de esta diferença ser significativa somente quando comparado com o LTZg. O uso de tamoxifeno é associado ao aumento da trigliceridemia sendo até mesmo descrita a ocorrência de hipertrigliceridemia acentuada (HOZUMI et al., 1998), enquanto que o efeito dos inibidores de aromatase sobre o perfil lipídico permanece controverso (LEWIS, 2007). No presente estudo nenhuma diferença significativa foi encontrada no perfil lipídico (colesterol total, HDL ou triglicérides) entre o TMXg e o LTZg.

EIM é um marcador estrutural da parede arterial útil na predição de eventos cardiovasculares (IGLESIAS DEL SOL et al., 2002; LORENZ et al., 2007). O uso de tamoxifeno para o tratamento do câncer de mama foi associado ao aumento da EIM (SIMON et al., 2002;

STAMATELOPOULOS et al., 2004). Um destes estudos (STAMATELOPOULOS et al., 2004) compara a diferença na EIM inicial e após seis meses entre mulheres usando tamoxifeno como parte do tratamento do câncer de mama e controles saudáveis. Os autores observaram uma sutil redução na EIM combinada (média das medidas da carótida comum, do bulbo e da carótida interna):  $-0,09 \pm 0,11$ mm versus  $0,04 \pm 0,11$ mm; média  $\pm$  DP;  $p=0,018$ ; grupos tamoxifeno e controle respectivamente. Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada na EIM da carótida comum entre os dois grupos ( $-0,07 \pm 0,14$ mm versus  $-0,01 \pm 0,04$ mm;  $p=0,10$ ; grupos tamoxifeno e controle, respectivamente). No presente estudo não conseguimos encontrar diferença significativa na EIM entre os grupos mesmo quando ajustando para outros fatores de risco cardiovascular: idade, IMC, tempo desde a menopausa, PAS e PAD. Isso pode se dever ao fato de que a alteração esperada na espessura da íntima-média ao longo do tempo é bastante pequena enquanto que o desvio padrão observado é relativamente grande. Como tal, uma diferença poderia ser mais facilmente detectada avaliando-se as variações individuais ao longo do tempo. Uma outra questão importante com relação à medida da EIM é o segmento da carótida que se investiga: há considerável heterogeneidade nas definições do segmento carotídeo utilizado nos estudos (LORENZ et al., 2007). Uma revisão a respeito da reprodutibilidade da EIM mostrou ser a carótida comum o segmento mais confiável para a realização desta medida (KANTERS et al., 1997). Sendo assim, optamos por avaliar a EIM na carótida comum.

O termo rigidez arterial descreve o grau de elasticidade da parede de uma artéria, sendo que o seu endurecimento faz parte do processo natural de envelhecimento (NAJJAR et al., 2005). A rigidez arterial pode ser estimada valendo-se de uma grande variedade de técnicas tais como a avaliação da pressão de pulso e da velocidade de onda do pulso, além de diversos índices derivados da ultra-sonografia e da ressonância magnética. Entretanto, a maioria dessas técnicas ainda é mais usada em estudos experimentais e de fisiologia do que na prática clínica (MACKENZIE et al., 2002). Dentre os índices ultra-sonográficos, o índice de rigidez ( $\beta$ ) pode ser

considerado um dos mais úteis para estimar-se a rigidez arterial, pois é o menos dependente da pressão arterial (MACKENZIE et al., 2002). No presente estudo, nós observamos o menor valor do índice de rigidez ( $\beta$ ) no TMXg, apesar da diferença ser significativa somente quando comparada com o LTZg. Tanto o LTZg quanto o STEg apresentaram valores semelhantes deste índice. Desta forma, atribuímos tais achados preferencialmente a um efeito benéfico do tamoxifeno sobre a rigidez carotídea do que a um efeito prejudicial do letrozol.

A disfunção endotelial pode ser observada em estágios iniciais de doença cardiovascular e é considerada como sendo um fator preditor independente de eventos clínicos como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (JOANNIDES et al., 2006). Os moduladores seletivos do receptor de estrogênio são conhecidos por apresentarem efeitos benéficos sobre a parede vascular. Em coelhas submetidas à ooforectomia e uma dieta rica em colesterol, o tamoxifeno mostrou-se capaz de reduzir a quantidade de placas ateroscleróticas na aorta (KALLAS HUEB et al., 2005). Existem poucos estudos direcionados à avaliação do efeito endotelial do tamoxifeno em mulheres na pós-menopausa. Em um deles (ONG et al., 2001) foi demonstrado que o uso de quatro semanas de tamoxifeno como tratamento do câncer de mama não foi capaz de afetar a DMF. Adicionalmente, não foi notado nenhum efeito da suspensão do uso de tamoxifeno sobre a DMF. Em outro estudo (STAMATELOPOULOS et al., 2004), foi demonstrado que o uso de seis meses de tamoxifeno como tratamento do câncer de mama causou uma discreta melhora na DMF quando comparado com mulheres saudáveis ( $2,22 \pm 3,46\%$  versus  $0,08 \pm 3,78\%$ ;  $p=0,012$ ; média $\pm$ DP; grupo de tamoxifeno e controle, respectivamente). Em nosso estudo, o TMXg apresentou a média mais alta de DMF, significativamente mais alta que ambos os outros grupos. Entre o LTZg e o STEg não foi encontrada diferença significativa no valor da DMF, mesmo quando esses valores foram ajustados para os fatores de risco cardiovasculares estudados. Mais uma vez, atribuímos tais achados ao efeito benéfico do tamoxifeno sobre o endotélio e não a um efeito deletério do letrozol.

O presente estudo apresenta as limitações metodológicas inerentes a um estudo transversal no que concerne à ausência de conhecimento dos valores basais dos parâmetros estudados. A metodologia empregada também não permitiu uma distribuição aleatória dos sujeitos e algum grau de heterogeneidade entre os grupos seria esperado. Outra questão importante quanto às limitações deste estudo é o número relativamente pequeno de sujeitos em cada grupo, o que pode causar alguma preocupação quando consideramos que não houve diferença significativa entre o LTZg e o STEg em nenhum dos parâmetros ultra-sonográficos estudados.

---

## **7. Conclusões**

## 7 Conclusões

---

1. Concluimos que as diferenças encontradas nos valores dos lipídeos séricos, no índice de rigidez ( $\beta$ ) e na DMF entre as mulheres recebendo tamoxifeno e letrozol podem ser preferencialmente atribuídas ao efeito benéfico do tamoxifeno do que a um possível efeito deletério do letrozol.

2. Verificamos que as pacientes que usam tamoxifeno apresentam concentração significativamente maior de triglicérides comparado com as que usam letrozol e concentração significativamente maior de colesterol total do que as que usam letrozol ou nenhum tratamento endócrino. Entre estes dois últimos grupos não foi verificada nenhuma diferença significativa no colesterol total e triglicérides. Não foi encontrada diferença significativa no HDL entre os três grupos.

3. Verificamos que as pacientes em uso de tamoxifeno apresentam valores mais favoráveis de função endotelial (DMF) do que as pacientes em uso de letrozol ou sem nenhum tratamento endócrino. Verificamos também não haver diferença na DMF entre estes dois últimos grupos de pacientes.

4. Verificamos que as pacientes em uso de tamoxifeno apresentam valores mais favoráveis de rigidez carotídea - índice de rigidez ( $\beta$ ) - do que as pacientes em uso de letrozol ou sem nenhum tratamento endócrino. Verificamos também não haver diferença no índice de rigidez ( $\beta$ ) entre estes dois últimos grupos de pacientes.

5. Quanto à EIM não foi encontrada diferença significativa ente os três grupos.

---

## **8. Referências bibliográficas**

## 8 Referências bibliográficas

---

BEATSON, G. Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mama; Suggestion for New Method of Treatment with Illustrative Cases. **Lancet**, v.2, p.104-162. 1896.

BLANN, A.D. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v.33, n.5-6, Sep-2004 Dec, p.256-61. 2003.

BLANN, A.D. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. **Thromb Haemost**, v.95, n.1, Jan, p.49-55. 2006.

BLANN, A.D. et al. Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: a comparison with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.12, n.1, Jan, p.43-50. 2001.

BLANN, A.D. et al. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. **Eur Heart J**, v.24, n.24, Dec, p.2166-79. 2003.

BRUEGGEMEIER, R.W. et al. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. **Endocr Rev**, v.26, n.3, May, p.331-45. 2005.

CARLSON, R.W. et al. NCCN Task Force Report: Adjuvant Therapy for Breast Cancer. **J Natl Compr Canc Netw**, v.4 Suppl 1, Mar, p.S1-26. 2006.

CARPENTER, R. Choosing early adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone-sensitive breast cancer: aromatase inhibitors versus tamoxifen. **Eur J Surg Oncol**, v.34, n.7, Jul, p.746-55. 2008.

CELERMAJER, D.S. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, v.340, n.8828, Nov 7, p.1111-5. 1992.

CHEN, M. , GENG, J.G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, Mar 24. 2006.

CLARKE, S.C. et al. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. **Circulation**, v.103, n.11, Mar 20, p.1497-502. 2001.

COATES, A.S. et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. **J Clin Oncol**, v.25, n.5, Feb 10, p.486-92. 2007.

COOMBES, R.C. et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. **Lancet**, v.369, n.9561, Feb 17, p.559-70. 2007.

CORRETTI, M.C. et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **J Am Coll Cardiol**, v.39, n.2, Jan 16, p.257-65. 2002.

CRAIEM, D. et al. New assessment of endothelium-dependent flow-mediated vasodilation to characterize endothelium dysfunction. **Am J Ther**, v.15, n.4, Jul-Aug, p.340-4. 2008.

CROWTHER, M.A. Pathogenesis of atherosclerosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p.436-41. 2005.

CUPPONE, F. et al. Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer? Meta-analysis of randomized trials. **Cancer**, v.112, n.2, Jan 15, p.260-7. 2008.

CUZICK, J. Aromatase inhibitors in prevention--data from the ATAC (arimidex, tamoxifen alone or in combination) trial and the design of IBIS-II (the second International Breast Cancer Intervention Study). **Recent Results Cancer Res**, v.163, p.96-103; discussion 264-6. 2003.

DANENBERG, H.D. et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. **Circulation**, v.108, n.5, Aug 5, p.512-5. 2003.

DAVIES, M.J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation**, v.82, n.3 Suppl, Sep, p.1138-46. 1990.

DONALD, A.E. et al. Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? **J Am Coll Cardiol**, v.48, n.9, Nov 7, p.1846-50. 2006.

ESPER, R.J. et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovasc Diabetol**, v.5, p.4. 2006.

FISHER, B. et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. **J Natl Cancer Inst**, v.97, n.22, Nov 16, p.1652-62. 2005.

FISHER, B. et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. **J Natl Cancer Inst**, v.88, n.21, Nov 6, p.1529-42. 1996.

FISHER, B. et al. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. **J Natl Cancer Inst**, v.93, n.9, May 2, p.684-90. 2001.

GALEN, F.X. Cell adhesion molecules in hypertension: endothelial markers of vascular injury and predictors of target organ damage? **J Hypertens**, v.20, n.5, May, p.813-6. 2002.

GIL-BAZO, I. et al. [Von Willebrand factor as an intermediate between hemostasis and angiogenesis of tumor origin]. **Rev Med Univ Navarra**, v.47, n.3, Jul-Sep, p.22-8. 2003.

GOSS, P. Update on the MA.17 extended adjuvant trial. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.20 Suppl 1, Dec, p.S5-S13. 2006.

- GOSS, P.E. Letrozole in the extended adjuvant setting: MA.17. **Breast Cancer Res Treat**, v.105 Suppl 1, p.45-53. 2007.
- HOWELL, A. et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. **Lancet**, v.365, n.9453, Jan 1-7, p.60-2. 2005.
- HOZUMI, Y. et al. Effect of tamoxifen on serum lipid metabolism. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, n.5, May, p.1633-5. 1998.
- IGLESIAS DEL SOL, A. et al. Carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident myocardial infarction; The Rotterdam Study. **Eur Heart J**, v.23, n.12, Jun, p.934-40. 2002.
- IMPERATO, F. et al. [Effects of tamoxifen and estrogen replacement therapy on lipid metabolism and some other cardiovascular risk factors. A prospective study in hysterectomised women]. **Minerva Ginecol**, v.55, n.1, Feb, p.87-93. 2003.
- INCA. Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil., v.[http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5). 2006a.
- INCA. Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil. 2006b.
- JOANNIDES, R. et al. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. **Fundam Clin Pharmacol**, v.20, n.3, Jun, p.311-20. 2006.
- JOANNIDES, R. et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, v.91, n.5, Mar 1, p.1314-9. 1995.
- JONAT, W. et al. Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. **Lancet Oncol**, v.7, n.12, Dec, p.991-6. 2006.
- JORDAN, V.C. , BRODIE, A.M. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. **Steroids**, v.72, n.1, Jan, p.7-25. 2007.
- KALLAS HUEB, C. et al. Repercussions of raloxifen, tamoxifen and estrogen on aortic atherosclerotic lesions of female rabbits submitted to ovariectomy and hypercholesterol diet. **Maturitas**, v.50, n.1, Jan 10, p.30-8. 2005.
- KANTERS, S.D. et al. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. **Stroke**, v.28, n.3, Mar, p.665-71. 1997.
- KAPUKU, G.K. et al. Early markers of cardiovascular disease. **Vascul Pharmacol**, v.45, n.5, Nov, p.277-80. 2006.
- KLOTZ, O. , MANNING, M. Fatty streaks in intima of arteries. **J Pathol Bacteriol**, v.16, p.211-220. 1912.
- LAMONT, E.B. et al. Favorable cardiac risk among elderly breast carcinoma survivors. **Cancer**, v.98, n.1, Jul 1, p.2-10. 2003.

LAURENT, S. , BOUTOUYRIE, P. Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? **J Nephrol**, v.20 Suppl 12, Nov-Dec, p.S45-50. 2007.

LEE, A.Y. , LEVINE, M.N. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. **Circulation**, v.107, n.23 Suppl 1, Jun 17, p.117-21. 2003.

LEE, K.W. et al. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. **Int J Cardiol**, v.111, n.2, Aug 10, p.302-8. 2006.

LEWIS, S. Do endocrine treatments for breast cancer have a negative impact on lipid profiles and cardiovascular risk in postmenopausal women? **Am Heart J**, v.153, n.2, Feb, p.182-8. 2007.

LIBBY, P. , THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, n.25, Jun 28, p.3481-8. 2005.

LORENZ, M.W. et al. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. **Circulation**, v.115, n.4, Jan 30, p.459-67. 2007.

LOVE, R.R. et al. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. **J Natl Cancer Inst**, v.86, n.20, Oct 19, p.1534-9. 1994.

MACKENZIE, I.S. et al. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. **Qjm**, v.95, n.2, Feb, p.67-74. 2002.

MARKOPOULOS, C. et al. Duration of tamoxifen effect on lipidemic profile of postmenopausal breast cancer patients following deprivation of treatment. **Oncology**, v.70, n.4, p.301-5. 2006.

MARTINS, W.P. et al. Brachial artery pulsatility index change 1 minute after 5-minute forearm compression: comparison with flow-mediated dilatation. **J Ultrasound Med**, v.27, n.5, May, p.693-9. 2008.

Ministério da Saúde.  
[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24421](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421).

MOURIDSEN, H. et al. Cardiovascular adverse events during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer using letrozole or tamoxifen: safety analysis of BIG 1-98 trial. **J Clin Oncol**, v.25, n.36, Dec 20, p.5715-22. 2007.

NAJJAR, S.S. et al. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? **Hypertension**, v.46, n.3, Sep, p.454-62. 2005.

NEUNTEUFL, T. et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. **Am J Cardiol**, v.86, n.2, Jul 15, p.207-10. 2000.

ONG, P.J. et al. Tamoxifen is not detrimental to endothelial function in postmenopausal women with breast cancer. **Am Heart J**, v.142, n.4, Oct, p.E6. 2001.

RAITAKARI, O.T. et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Jama**, v.290, n.17, Nov 5, p.2277-83. 2003.

RICKLES, F.R. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v.35, n.1-2, p.103-10. 2006.

ROHSIG, L.M. et al. von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. **Braz J Med Biol Res**, v.34, n.9, Sep, p.1125-9. 2001.

ROLDAN, V. et al. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. **Thromb Haemost**, v.90, n.6, Dec, p.1007-20. 2003.

SHEEN-CHEN, S.M. et al. Serum levels of soluble E-selectin in women with breast cancer. **Br J Surg**, v.91, n.12, Dec, p.1578-81. 2004.

SILVA, H.C. et al. Soluble VCAM-1 and E-selectin in breast cancer: relationship with staging and with the detection of circulating cancer cells. **Neoplasma**, v.53, n.6, p.538-43. 2006.

SIMON, T. et al. Influence of tamoxifen on carotid intima-media thickness in postmenopausal women. **Circulation**, v.106, n.23, Dec 3, p.2925-9. 2002.

SINGLETARY, S.E. , GREENE, F.L. Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. **Semin Surg Oncol**, v.21, n.1, p.53-9. 2003.

STAMATELOPOULOS, K.S. et al. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. **Am Heart J**, v.147, n.6, Jun, p.1093-9. 2004.

THUERLIMANN, B. et al. Guidelines for the adjuvant treatment of postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: past, present and future recommendations. **Eur J Cancer**, v.43, n.1, Jan, p.46-52. 2007.

TORMEY, D.C. , JORDAN, V.C. Long-term tamoxifen adjuvant therapy in node-positive breast cancer: a metabolic and pilot clinical study. **Breast Cancer Res Treat**, v.4, n.4, p.297-302. 1984.

TROUSSEAU, A. **Clinique Médicale de l'Hotel-Dieu de Paris**. Paris: JB Ballière et Fils, v.3. 1865. 654-712 p. (Phlegmasia alba dolens)

TSIVGOULIS, G. et al. Common carotid arterial stiffness and the risk of ischaemic stroke. **Eur J Neurol**, v.13, n.5, May, p.475-81. 2006.

WASAN, K.M. et al. The influence of letrozole on serum lipid concentrations in postmenopausal women with primary breast cancer who have completed 5 years of adjuvant tamoxifen (NCIC CTG MA.17L). **Ann Oncol**, v.16, n.5, May, p.707-15. 2005.

WHINCUP, P.H. et al. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. **Eur Heart J**, v.23, n.22, Nov, p.1764-70. 2002.

WINER, E.P. et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment working group update: use of aromatase inhibitors in the adjuvant setting. **J Clin Oncol**, v.21, n.13, Jul 1, p.2597-9. 2003.

WINER, E.P. et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. **J Clin Oncol**, v.23, n.3, Jan 20, p.619-29. 2005.

---

## **9. Anexos**

**Anexo A** Artigo publicado: O uso de tamoxifeno e inibidores da aromatase na terapia endócrina para o câncer de mama

---

## O uso de tamoxifeno e inibidores da aromatase na terapia endócrina para o câncer de mama

*The use of tamoxifen and aromatase inhibitors for breast cancer endocrine therapy*

ATUALIZAÇÃO

**Resumo**

A terapia endócrina para tumores de mama com receptores hormonais positivos é amplamente usada tanto de forma paliativa no câncer de mama metastático, quanto na adjuvância, para tumores iniciais. O tamoxifeno (TMX) tem sido usado como droga de escolha com este propósito há cerca de 30 anos com boa eficácia e perfil razoavelmente seguro. O desenvolvimento dos inibidores de aromatase (IAs) de terceira geração promoveu estudos comparativos que têm demonstrado superioridade dos IAs em relação ao TMX na adjuvância, favorecendo seu uso tanto em substituição, quanto de forma seqüencial. Em geral, os IAs são tão bem tolerados quanto o TMX, preocupando ainda questões como aumento de risco cardiovascular, de osteoporose e alterações no perfil lipídico. Nos últimos dois anos, importantes instituições como a *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, o *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* e o *Consenso Internacional de St. Gallen (Consenso de St. Gallen)* passaram, em vista das evidências emergentes, a indicar o uso dos IAs em detrimento do TMX para as mulheres após a menopausa com tumores sensíveis ao tratamento endócrino.

**Abstract**

Endocrine therapy for breast cancer with positive receptors has been widely applied either for advanced metastatic cancer as for initial tumors. For more than 30 years tamoxifen (TMX) has been the first choice for this purpose with an acceptable safety profile. The emerging third generation aromatase inhibitors (IA) promoted comparative trials which have proved the IA to be superior to TMX in the adjuvant setting - what supported its use both in substitution and in a sequential manner. Broadly, the IA are as well tolerated as TMX, still concerning issues as cardiovascular risk and osteoporosis increase and lipid profile changes. During the last couple of years, institutions as the *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, the *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* and the *International St. Gallen Consensus* have changed their recommendations advising the use of IA instead of TMX as a first choice treatment for post-menopause women with sensitive breast cancer.

Carolina Oliveira Nastro<sup>1</sup>  
Wellington de Paula Martins<sup>1</sup>  
Rui Alberto Ferriani<sup>1</sup>  
Francisco José Candido dos Reis<sup>1</sup>

**Palavras-chave**  
*Terapia de Reposição Hormonal*  
*Tamoxifeno*  
*Neoplasias da Mama/terapia*

**Keywords**  
*Hormone Replacement Therapy*  
*Tamoxifen*  
*Breast Neoplasms/therapy*

<sup>1</sup> Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

## Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda maior causa de mortalidade, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres brasileiras, excluindo-se os tumores de pele não-melanoma<sup>1</sup>. O câncer de mama apresenta incidência crescente mundialmente, sendo, no Brasil, o risco estimado em 71 casos novos por 100.000 mulheres, pelo Instituto Nacional do Câncer-INCA.<sup>1</sup> Cerca de dois terços dos tumores diagnosticados na pós-menopausa expressam receptores de estrogênio (RE+) e/ou progesterona (RP+). Os efeitos do estrogênio ocorrem a partir da ligação a proteínas receptoras específicas, localizadas no núcleo celular: os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . O estradiol, o mais potente dos estrogênios endógenos, é sintetizado pelo complexo enzimático aromatase localizado no citocromo p450 em diversos tecidos como: ovários, tecido gorduroso e tecidos normal e tumoral da mama.<sup>2</sup>

Em 1896, foi publicada no *Lancet* a observação de que a ooforectomia poderia trazer benefícios para o tratamento de casos de câncer de mama considerados inoperáveis.<sup>3</sup> Em 1962, foi descrita a existência do receptor de estrogênio e pouco tempo depois a sua presença foi demonstrada em tumores mamários.<sup>4</sup> A descoberta do papel do estrogênio nessa doença promoveu grande avanço em sua terapêutica, com a pesquisa de drogas antiestrogênicas que pudessem agir na prevenção e tratamento do câncer de mama.<sup>4</sup> Motivadas por resultados positivos em estudos com animais, as pesquisas utilizando tamoxifeno iniciaram-se na década de 70, mostrando alta efetividade do tratamento, mesmo por um ano, em tumores com receptores positivos.<sup>5</sup> Pouco tempo depois, iniciaram-se os estudos visando ao bloqueio da enzima aromatase, tendo em vista minimizarem-se os efeitos adversos da terapia com tamoxifeno.<sup>6</sup> Uma droga chamada formestano foi a pioneira, passando-se alguns anos até o desenvolvimento da terceira geração de inibidores da aromatase, utilizada na prática clínica na atualidade.

## Tamoxifeno (TMX) e o tratamento do câncer de mama

Desde a aprovação do uso de TMX para o tratamento do câncer de mama pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, em 1977, esta tem sido a droga de escolha para o tratamento endócrino do câncer de mama em mulheres com tumores que expressam receptores hormonais. O TMX age ligando-se ao receptor de estrogênio e exercendo atividade antagonista em alguns tecidos (como no próprio tumor) e agonista em outros, o que propicia tanto benefícios como também efeitos colaterais

sérios. A indicação de seu uso é baseada nos resultados de alguns estudos como os do NSABP B-14, que mostrou melhora da sobrevida das pacientes que usaram TMX por cinco anos: sobrevida de 76 para 80% em 10 anos,  $p=0,02^6$ . O uso prolongado (mais de cinco anos) é contra-indicado por não trazer benefícios adicionais, enquanto que os efeitos colaterais se mantêm.<sup>7</sup>

## Inibidores de aromatase

Esta classe engloba dois inibidores não-esteroidais, o letrozol e o anastrozol, e um esteroide, o examestano.<sup>8</sup> Grandes estudos controlados e randomizados sugerem a superioridade dos IAs em relação ao TMX, refletida no aumento do tempo de sobrevida livre de doença.<sup>9</sup>

## Tratamento endócrino adjuvante na atualidade

No documento de consenso publicado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) em 2003, o TMX era considerado o tratamento preferencial na adjuvância para o câncer de mama responsivo à terapia endócrina. A indicação do uso dos IAs se restringia aos casos de contra-indicação ao uso do TMX<sup>9</sup>. Desde então, os resultados de grandes estudos randomizados e controlados levaram instituições como a própria ASCO<sup>10</sup>, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)<sup>11</sup> e o Consenso Internacional de St. Gallen (St. Gallen)<sup>12</sup> a recomendarem o uso dos IAs no tratamento de mulheres pós-menopausadas com câncer de mama inicial responsivo à terapia endócrina.

## IA após o tratamento tradicional com TMX

O letrozol é atualmente o único dos IAs indicados para uso posterior à terapia tradicional com cinco anos de TMX. Tal indicação é baseada nos resultados do MA-17, estudo que incluiu mulheres após a menopausa logo após completarem a terapia adjuvante com cinco anos de TMX. Mais de 5.000 mulheres foram distribuídas para receberem letrozol (2,5 mg ao dia) ou placebo e, na análise realizada após 2,4 anos do início do estudo, optou-se pela sua abertura e oferecimento do uso do letrozol para todas as mulheres em seguimento, em razão da significativa redução no número de recidivas entre as usuárias dessa droga (Goss, 2007 #26). O seguimento foi mantido e os resultados após 48 meses

## Introdução

No Brasil, o câncer representa a segunda maior causa de mortalidade, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres brasileiras, excluindo-se os tumores de pele não-melanoma<sup>1</sup>. O câncer de mama apresenta incidência crescente mundialmente, sendo, no Brasil, o risco estimado em 71 casos novos por 100.000 mulheres, pelo Instituto Nacional do Câncer-INCA.<sup>1</sup> Cerca de dois terços dos tumores diagnosticados na pós-menopausa expressam receptores de estrogênio (RE+) e/ou progesterona (RP+). Os efeitos do estrogênio ocorrem a partir da ligação a proteínas receptoras específicas, localizadas no núcleo celular: os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . O estradiol, o mais potente dos estrogênios endógenos, é sintetizado pelo complexo enzimático aromatase localizado no citocromo p450 em diversos tecidos como: ovários, tecido gorduroso e tecidos normal e tumoral da mama.<sup>2</sup>

Em 1896, foi publicada no *Lancet* a observação de que a ooforectomia poderia trazer benefícios para o tratamento de casos de câncer de mama considerados inoperáveis.<sup>3</sup> Em 1962, foi descrita a existência do receptor de estrogênio e pouco tempo depois a sua presença foi demonstrada em tumores mamários.<sup>4</sup> A descoberta do papel do estrogênio nessa doença promoveu grande avanço em sua terapêutica, com a pesquisa de drogas antiestrogênicas que pudessem agir na prevenção e tratamento do câncer de mama.<sup>4</sup> Motivadas por resultados positivos em estudos com animais, as pesquisas utilizando tamoxifeno iniciaram-se na década de 70, mostrando alta efetividade do tratamento, mesmo por um ano, em tumores com receptores positivos.<sup>5</sup> Pouco tempo depois, iniciaram-se os estudos visando ao bloqueio da enzima aromatase, tendo em vista minimizarem-se os efeitos adversos da terapia com tamoxifeno.<sup>6</sup> Uma droga chamada formestano foi a pioneira, passando-se alguns anos até o desenvolvimento da terceira geração de inibidores da aromatase, utilizada na prática clínica na atualidade.

## Tamoxifeno (TMX) e o tratamento do câncer de mama

Desde a aprovação do uso de TMX para o tratamento do câncer de mama pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, em 1977, esta tem sido a droga de escolha para o tratamento endócrino do câncer de mama em mulheres com tumores que expressam receptores hormonais. O TMX age ligando-se ao receptor de estrogênio e exercendo atividade antagonista em alguns tecidos (como no próprio tumor) e agonista em outros, o que propicia tanto benefícios como também efeitos colaterais

sérios. A indicação de seu uso é baseada nos resultados de alguns estudos como os do NSABP B-14, que mostrou melhora da sobrevida das pacientes que usaram TMX por cinco anos: sobrevida de 76 para 80% em 10 anos,  $p=0,02^6$ . O uso prolongado (mais de cinco anos) é contra-indicado por não trazer benefícios adicionais, enquanto que os efeitos colaterais se mantêm.<sup>7</sup>

## Inibidores de aromatase

Esta classe engloba dois inibidores não-esteroidais, o letrozol e o anastrozol, e um esteroide, o examestano.<sup>8</sup> Grandes estudos controlados e randomizados sugerem a superioridade dos IAs em relação ao TMX, refletida no aumento do tempo de sobrevida livre de doença.<sup>9</sup>

## Tratamento endócrino adjuvante na atualidade

No documento de consenso publicado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) em 2003, o TMX era considerado o tratamento preferencial na adjuvância para o câncer de mama responsivo à terapia endócrina. A indicação do uso dos IAs se restringia aos casos de contra-indicação ao uso do TMX<sup>9</sup>. Desde então, os resultados de grandes estudos randomizados e controlados levaram instituições como a própria ASCO<sup>10</sup>, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)<sup>11</sup> e o Consenso Internacional de St. Gallen (St. Gallen)<sup>12</sup> a recomendarem o uso dos IAs no tratamento de mulheres pós-menopausadas com câncer de mama inicial responsivo à terapia endócrina.

## IA após o tratamento tradicional com TMX

O letrozol é atualmente o único dos IAs indicados para uso posterior à terapia tradicional com cinco anos de TMX. Tal indicação é baseada nos resultados do MA-17, estudo que incluiu mulheres após a menopausa logo após completarem a terapia adjuvante com cinco anos de TMX. Mais de 5.000 mulheres foram distribuídas para receberem letrozol (2,5 mg ao dia) ou placebo e, na análise realizada após 2,4 anos do início do estudo, optou-se pela sua abertura e oferecimento do uso do letrozol para todas as mulheres em seguimento, em razão da significativa redução no número de recidivas entre as usuárias dessa droga (Goss, 2007 #26). O seguimento foi mantido e os resultados após 48 meses

mostraram aumento da sobrevida livre de doença para todas as que optaram pelo uso do letrozol e diminuição em 60% na mortalidade para aquelas com linfonodos positivos<sup>13</sup>. Baseando-se nesses resultados, o Consenso de St Gallen<sup>12</sup>, o NCCN<sup>11</sup> e a ASCO<sup>10</sup> recomendam o uso do letrozol por cinco anos após a terapia tradicional com TMX.

### IA em substituição ao TMX

Os IAs letrozol e anastrozol são indicados como drogas de escolha em mulheres com câncer de mama sensível ao tratamento endócrino, sendo o TMX opção quando há contra-indicação ao uso dos IAs ou quando é considerado o tratamento seqüencial com TMX e IA, segundo o consenso de St Gallen<sup>12</sup>, o NCCN<sup>11</sup> e a ASCO<sup>10</sup>. A recomendação do uso de letrozol como tratamento endócrino inicial é baseada nos resultados do BIG 1-98, estudo que comparou o uso de TMX e letrozol (2,5 mg ao dia) na adjuvância, incluindo 8.028 mulheres na pós-menopausa. Após cinco anos de uso, verificou-se redução do número de recorrências em 18%,  $p=0,007$ , no grupo que usou letrozol.<sup>14</sup> Já o estudo ATAC, *Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*,<sup>15</sup> justifica a recomendação de uso inicial de anastrozol (por ter demonstrado redução de 13%,  $p=0,01$ , no número de recorrências com o uso de anastrozol – 1 mg ao dia - por cinco anos quando comparado ao uso de TMX no mesmo período).<sup>15</sup>

### Uso seqüencial de TMX e IA

O tratamento com TMX por dois a três anos seguido pelo uso de IA por mais dois ou três anos (completando cinco anos no total) é também uma opção para o tratamento pós-cirúrgico de mulheres na pós-menopausa, indicado pelo consenso de St Gallen<sup>12</sup>, pelo NCCN<sup>11</sup> e pela ASCO<sup>10</sup>. O IES, *Intergroup Exemestane Study*, informou redução de 24% no número de recorrências ( $p=0,0001$ ) e no grupo de pacientes que usaram examestano (25 mg ao dia) por dois a três anos após TMX (cinco anos no total) comparado com aquelas que usaram somente TMX por todo o período<sup>16</sup>. Em relação ao uso de anastrozol (1 mg ao dia) de forma seqüencial após o TMX por cinco anos no total, esse também se mostrou superior ao uso exclusivo de TMX, com redução de 41%,  $p<0,0001$ , no número de recorrências, em metanálise que incluiu os estudos *Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group – ABCSG 8*, *Arimidex-Nolvadex – ARNO 95* e o *Italian Tamoxifen Anastrozole – ITA*.<sup>17</sup>

### Efeitos indesejáveis da terapia endócrina

Os estudos aqui apresentados comprovam a eficácia do tratamento endócrino para as mulheres menopausadas com diagnóstico de câncer de mama. Todavia, é importante considerar a relação entre risco e benefício de forma global para a formulação da decisão terapêutica, especialmente sobre o tratamento adjuvante, situação em que as pacientes receberão o tratamento por pelo menos cinco anos.

### Risco cardiovascular

O uso de TMX foi relacionado à redução dos níveis séricos de colesterol total e de LDL e aumento da concentração de triglicérides, durante o período de tratamento<sup>18</sup>, sendo que após seis meses da interrupção do uso já pode ser notada alteração desse padrão, com aumento do colesterol total e LDL e diminuição de triglicérides.<sup>19</sup> No entanto, tal melhora no perfil lipídico parece não se traduzir em diminuição do risco cardiovascular. Uma publicação da análise de quatro estudos envolvendo o uso de TMX como tratamento adjuvante do câncer de mama mostrou não haver diferença no número de mortes por doença arterial coronariana, verificando-se aumento em 90% do risco de diagnóstico de tromboembolismo nessas pacientes, quando comparado com uso de placebo.<sup>20</sup> Em relação aos efeitos dos IAs sobre o perfil lipídico, parece não haver essa influência, quando comparados ao placebo. Em publicação de dados do MA-17 sobre esses parâmetros foi demonstrado que com 36 meses de uso do letrozol na adjuvância estendida (após uso de cinco anos de TMX) não foi observada alteração significativa nas dosagens séricas de colesterol total, LDL, HDL, triglicérides quando comparado ao uso de placebo.<sup>21</sup>

### Osteoporose

Nos estudos que compararam diretamente o uso de TMX e IA nota-se significativo aumento do número de fraturas ósseas no grupo de pacientes que usaram IA, aumento de 48% no risco associado ao uso de letrozol<sup>14</sup> e de 49% associado ao uso de anastrozol<sup>15</sup>. Essa diferença pode ser em parte justificada pelo efeito de agonista estrogênico do TMX no tecido ósseo, reduzindo o número de fraturas em 32% quando comparado com o uso de placebo no tratamento adjuvante do câncer de mama, conforme observado no *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study - NASBP P1*<sup>22</sup>. Além disso, os IAs podem

também contribuir para a diferença de risco no sentido em que expõem todos os tecidos aos efeitos da privação estrogênica. O MA-17 mostrou aumento da incidência de osteoporose em 35% no grupo de pacientes que usou letrozol em relação às que usaram placebo após seguimento de 2,4 anos (após uso prévio de TMX por cinco anos). Adicionalmente, reportou-se aumento não significativo no número de fraturas ósseas.<sup>13</sup>

### Outros efeitos colaterais

O uso de TMX é associado ao aumento de mais de três vezes no risco de câncer de endométrio e em 21% no risco de desenvolver catarata<sup>17</sup>, efeitos não observados na utilização de IA em outros estudos.

O tratamento com IA associa-se a mais alta taxa de artralgia e de sintomas relacionados ao hipostrogenismo, como fogachos.<sup>13-15</sup>

### Considerações finais

Os mais respeitados consensos sobre o assunto consideram atualmente os IAs de terceira geração superiores ao TMX para o tratamento adjuvante do câncer de mama sensível ao tratamento endócrino, recomendando seu uso em substituição ou após o uso de TMX. Na adjuvância, as decisões terapêuticas não devem ser baseadas exclusivamente na prevenção da recorrência local ou à distância, mas devem ser avaliadas com rigor informações sobre o benefício desses novos tratamentos sobre a sobrevida global e a saúde de forma geral. A aceitação dos IAs como o tratamento hormonal de escolha para esse grupo de pacientes depende do balanço entre eficácia terapêutica, custo, segurança e tolerabilidade. O relativo curto período de seguimento das pacientes que foram submetidas ao tratamento com IAs não permite ainda estabelecer de forma clara sua segurança em longo prazo, especialmente em relação à densidade óssea e ao risco cardiovascular.

### Leituras suplementares

1. Instituto Nacional do Câncer. INCA. Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil. [Cited 2008 June 03]. Available from: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5).
2. Bruggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev*. 2005; 26(3):331-45.
3. Beatson G. Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mama; Suggestion for New Method of Treatment with Illustrative Cases. *Lancet*. 1896; 2:104-62.
4. Jordan VC, Brodie AM. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*. 2007; 72(1):7-25.
5. Tormey DC, Jordan VC. Long-term tamoxifen adjuvant therapy in node-positive breast cancer: a metabolic and pilot clinical study. *Breast Cancer Res Treat*. 1984; 4(4):297-302.
6. Fisher B, Dignam J, Bryant J, DeCillis A, Wickerham DL, Wolmark N, et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(21):1529-42.
7. Fisher B, Dignam J, Bryant J, Wolmark N. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer: updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(9):684-90.
8. Carpenter R. Choosing early adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone-sensitive breast cancer: aromatase inhibitors versus tamoxifen. *Eur J Surg Oncol*. 2008; 34(7):746-55.
9. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Bryant J, Chlebowski RT, Ingle JN, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment working group update: use of aromatase inhibitors in the adjuvant setting. *J Clin Oncol*. 2003; 21(13):2597-9.
10. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, et al. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol*. 2005; 23(3):619-29.
11. Carlson RW, Brown E, Burstein HJ, Gradishar WJ, Hudis CA, Loprinzi C, et al. NCCN Task Force Report: Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006; 4 Suppl 1:S1-26.
12. Thuerlimann B, Koeberle D, Senn HJ. Guidelines for the adjuvant treatment of postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: past, present and future recommendations. *Eur J Cancer*. 2007; 43(1):46-52.
13. Goss P. Update on the MA.17 extended adjuvant trial. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006; 20 (Suppl 1):S5-S13.
14. Coates AS, Keshaviah A, Thurlimann B, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol*. 2007; 25(5):486-92.
15. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005; 365(9453):60-2.

**Anexo B** Artigo publicado: Câncer de mama e disfunção endotelial

---

## CÂNCER DE MAMA E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

CAROLINA OLIVEIRA NASTRI\*, WELLINGTON DE PAULA MARTINS, FRANCISCO JOSÉ CANDIDO DOS REIS, RUI ALBERTO FERRIANI

Trabalho realizado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

### RESUMO

Entre as mulheres brasileiras a principal causa de mortalidade são as doenças cardiovasculares, seguida em frequência pelo câncer, sendo o de mama o mais comum. É bastante conhecida a associação de câncer com eventos tromboembólicos, mas pouco estabelecida sua relação com os demais eventos cardiovasculares. Para estudar estes eventos desde suas alterações primordiais, como a lesão e disfunção endotelial e a formação da placa aterosclerótica, vários métodos têm sido utilizados. Dentre eles, a dosagem sérica de P e E-selectina e do fator de von Willebrand são relevantes devido à associação tanto com o risco cardiovascular quanto com o processo de progressão e formação de metástase do câncer de mama. Outro método de avaliação da função endotelial é a medida da dilatação da artéria braquial mediada por fluxo, que cada vez mais ganha popularidade devido à sua natureza não-invasiva e a comprovação de sua associação com a disfunção endotelial e risco de eventos cardiovasculares. Buscamos, através desta revisão, condensar o que houve de mais relevante nestes últimos anos sobre a associação de câncer, em especial o de mama, com lesão endotelial e risco cardiovascular.

UNITERMOS: Neoplasias mamárias. Doenças cardiovasculares. Endotélio.

\*Correspondência:  
Rua Manoel Ache, 920 apto  
1904  
Jardim Iraja - Ribeirão  
Preto - SP  
CEP 14020-590  
Tel: (16) 81174090  
conastri@hotmail.com

### INTRODUÇÃO

As doenças do sistema circulatório correspondem à principal causa de morte no Brasil, tendo ocorrido 285.543 mortes por essa causa (total de 1.024.073) durante o ano de 2004, segundo dados mais recentes do Ministério da Saúde<sup>1</sup>. Em segundo lugar aparecem as mortes por câncer, sendo o de mama o mais incidente entre as mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma. O câncer de mama apresenta incidência crescente mundialmente sendo, no Brasil, em 2006, o risco estimado pelo INCA<sup>2</sup> em 52 casos novos por 100.000 mulheres.

A associação de câncer e trombofilia foi descrita pela primeira vez em 1.865, pelo clínico francês Armand Trousseau<sup>3</sup>, porém somente nas três últimas décadas maior atenção foi dada à questão da associação molecular entre a ativação da coagulação e a progressão do câncer<sup>4</sup>.

### Doença cardiovascular e aterosclerose

A maneira mais efetiva de prevenir a trombose arterial e, conseqüentemente, eventos cardiovasculares, é a prevenção da aterosclerose<sup>5,6</sup>. Em 1912, dois patologistas americanos da Universidade de Pittsburgh publicaram um resumo de seus estudos sobre artérias humanas e concluíram: "É bastante inútil discutir questões a respeito do desenvolvimento da esclerose da íntima se somente discutirmos sobre os estágios avançados da doença. Se pretendemos avançar na complexa questão da aterosclerose, deve-se preocupar em entender a lesão desde seus primórdios<sup>7</sup>". Tais autores julgavam haver forte indicação de que a produção de tecido pela íntima dos vasos se devia ao resultado da irritação direta deste tecido pela presença de infecção ou toxinas, ou ainda pela estimulação de produtos da degeneração primária desta camada.

A aterosclerose é um processo que acomete artérias de médio e grande calibre, e se inicia com o aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais como resposta ao fluxo turbulento em um ambiente sérico desfavorável do ponto de vista do perfil lipídico. Não é mais considerada simplesmente uma desordem secundária a anormalidades no metabolismo lipídico, atualmente é bem descrito o papel da inflamação desde os estágios iniciais da formação da placa aterosclerótica: na promoção da mitogênese, proliferação da matriz intracelular, angiogênese e desenvolvimento das células espumosas<sup>8</sup>. A proteína C reativa (pCr) e o fibrinogênio são marcadores associados a patogenia da aterosclerose em modelos animais e seus efeitos incluem diminuição do óxido nítrico (NO) e prostaciclina endoteliais<sup>9</sup>. A evolução da placa aterosclerótica é marcada pelo crescimento gradual, conseqüente à deposição de células espumosas, com a placa fibrosa definitiva sendo elaborada lentamente pela proliferação de células musculares lisas e de matriz intracelular. Entretanto, o infarto miocárdico muitas vezes ocorre em artérias com pouca oclusão prévia, sugerindo um crescimento abrupto destas placas. A oclusão trombótica aguda se dá como conseqüência da súbita ruptura da placa aterosclerótica através de fissura espontânea, quando exposta ao estresse do turbilhamento em locais de estenose ou de ramificação arterial. Tal dano provoca a denudação endotelial estimulando a formação de trombo local<sup>10</sup>, este pode obstruir parcial ou totalmente a parede do vaso, sendo responsável pelo evento clínico.

A lesão da parede do vaso caracteriza-se por perda de continuidade do endotélio e pode ser causada em algumas situações: angioplastia, estresse hemodinâmico, tabagismo, hipercolesterolemia ou por enzimas liberadas por plaquetas e leucócitos<sup>6</sup>. A perda de células

endoteliais expõe o subendotélio às plaquetas e aos fatores da coagulação. A adesão plaquetária é mediada por diversas substâncias, entre elas o fW. O endotélio exposto a endotoxinas, citocinas, trombina e hipóxia acaba promovendo a coagulação e regulando o fluxo sanguíneo através de substâncias vasoconstritoras, como endotelinas e vasodilatadoras, prostaciclina e NO<sup>4</sup>.

### Função endotelial

A disfunção endotelial é observada em estágios iniciais na maioria das doenças cardiovasculares e surge como um fator preditor independente para eventos clínicos na doença coronariana, hipertensão e falência cardíaca. Neste contexto, a avaliação da função endotelial passa de um intermediário na avaliação do benefício de tratamentos cardiovasculares e emerge como um alvo farmacológico direto<sup>11</sup>.

### MARCADORES DE FUNÇÃO ENDOTELIAL

#### Fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand (fW) é uma glicoproteína sintetizada pelo endotélio e é responsável pela mediação entre a adesão plaquetária ao subendotélio durante o processo de hemostasia primária. O aumento dos níveis séricos de fW é associado com maior risco de eventos clínicos da doença cardiovascular, principalmente tromboembolismo, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais<sup>12</sup>. Níveis elevados de fW foram também descritos em alguns tipos de cânceres (cabeça e pescoço, próstata) e bem correlacionados ao câncer de mama<sup>13</sup>. Em um estudo foi comparada a dosagem de fW em 128 pacientes com câncer de mama, em 47 pacientes com doença mamária benigna e em 27 controles. A média e desvio padrão da dosagem de fW no grupo controle foi de  $130,6 \pm 45$  U/dl, nas pacientes com doença benigna  $148,4 \pm 59$  U/dl e nas com câncer  $170,7 \pm 78$  U/dl, sendo significativa a diferença encontrada entre as pacientes com câncer e os outros dois grupos<sup>13</sup>. Durante a fase ativa da angiogênese tumoral, são sintetizados fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2), que contribuem para a proliferação e diferenciação do endotélio vascular, o maior produtor de fW, resultando em aumento dos níveis séricos de fW<sup>14</sup>. O fW também contribui para a adesão entre plaquetas e células tumorais, através das integrinas, sendo este um passo importante na determinação de como a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária podem ser mediadas pela célula tumoral. Outro resultado importante da ligação entre plaquetas e células neoplásicas é a capacidade que esta adquire de migrar, auxiliando no processo de metástase. De fato, são demonstradas taxas de fW sérico mais altas em pacientes com câncer de estágios mais avançados do que em estágios iniciais<sup>15</sup>.

O aumento dos níveis séricos do fW tem sido descrito como fator de risco para desfechos clínicos da doença cardiovascular como tromboembolismo, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais<sup>12</sup>. Em uma metanálise foi confirmada a relação do fW com doença coronariana, sendo verificado que o grupo constituído das pessoas com níveis séricos acima do percentil 67 apresentou 50% mais risco de doença cardiovascular quando comparado ao grupo das pessoas com níveis séricos abaixo do percentil 33<sup>15</sup>.

### Selectinas

A família das selectinas é composta por três membros: L-selectina, P-selectina e E-selectina, sendo esta última a única encontrada apenas no endotélio. Esta especificidade proporciona uma oportunidade para o estudo de aspectos fisiopatológicos do endotélio na doença cardiovascular e inflamatória<sup>11</sup>.

Tanto a E-selectina como a P-selectina são moléculas expressas na superfície do endotélio quando estimulado por algumas citocinas inflamatórias (interleucinas 1 e 10, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ); a P-selectina pode ser também encontrada na superfície de plaquetas ativadas. Quando expressas, as selectinas promovem a adesão do leucócito ao endotélio. A fração solúvel da E-selectina é proveniente da divagem proteolítica da molécula expressa na membrana celular<sup>11</sup>. O papel destas moléculas na história natural do câncer não é completamente esclarecido, mas acredita-se que desempenhe função fundamental no processo de disseminação por via hematogênica do tumor, promovendo a adesão da célula neoplásica ao endotélio<sup>16</sup>.

Níveis séricos aumentados de E-selectina são associados com estágios avançados de câncer de mama e com a presença de células tumorais circulantes<sup>17</sup>. Em outra publicação, foi obtida média da dosagem sérica de E-selectina significativamente maior em pacientes com câncer de mama quando comparado com mulheres saudáveis: 73,7 e 36,3ng/ml, respectivamente, além de significativa correlação positiva com o estadiamento clínico<sup>18</sup>. Além disso, o aumento da concentração sérica de E-selectina foi associado com tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e Diabetes mellitus<sup>18</sup>. Acredita-se que o aumento da concentração sérica observada na hipertensão arterial deva refletir a disfunção endotelial, mas não necessariamente, predizer o desenvolvimento de lesão de órgão alvo<sup>19</sup>, pois, diferentemente do fW, a E-selectina está mais relacionada com a regeneração do endotélio após o dano tissular provocado pela progressão da doença<sup>5</sup>. Apesar da capacidade da dosagem de E-selectina em predizer eventos adversos e suas implicações clínicas serem bastante controversas, pode-se dizer que, em pacientes sofrendo de um evento cardiovascular agudo, a E-selectina frequentemente se encontra aumentada, quando comparado com controles pareados por sexo e idade<sup>18</sup>.

Outra selectina, a P-selectina, também está presente em maior concentração sérica em pacientes com câncer de mama<sup>20</sup>. Quanto ao seu papel na disseminação neoplásica, sabe-se que esta molécula, expressa pelas células endoteliais estimuladas, promove a adesão de células tumorais circulantes mediando a disseminação tumoral por via hematogênica, enquanto a interação dessas células com a P-selectina expressa em plaquetas ativadas, supre o tumor com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas<sup>21</sup>. Além do câncer, esta molécula é encontrada em níveis elevados em situações como diabetes, hipertensão, tabagismo e hipercolesterolemia e parece ser capaz de predizer a ocorrência de um evento cardiovascular adverso<sup>22</sup>.

### Dilatação mediada por fluxo dependente do endotélio (DMF)

O estudo da doença vascular pré-clínica se tornou mais viável através da aplicação de técnicas ultra-sonográficas não-invasivas. A avaliação da dilatação da artéria braquial foi originalmente descrita em 1992 e é realizada por ultra-sonografia após oclusão arterial temporária

através de torniquete aplicado ao membro superior<sup>23, 24</sup>. Retirado o torniquete, é então observada a dilatação do vaso em resposta a tensão de cisalhamento associada ao súbito aumento de fluxo, resposta esta dependente de NO e independente de prostaciclina<sup>24</sup>. O NO é produzido no endotélio via L-arginina por enzimas óxido nítrico sintases, a ativação desta via se dá através de estímulos como hipóxia, acetilcolina, bradicinina e serotonina. O NO promove vasodilatação direta, inibe a liberação de fatores vasoconstritores, proliferação de células musculares lisas, adesão leucocitária e agregação plaquetária<sup>25</sup>.

Uma porcentagem de dilatação menor que o normal é observada tanto em pacientes com doença aterosclerótica como naqueles em risco para tal: mulheres pós-menopausadas, hipertensas, diabéticos, obesos, sedentários, tabagistas ativos e passivos e naqueles com aumento dos níveis séricos de colesterol e homocisteína. O controle destes fatores de risco melhora a função endotelial ao aumentar a DMF, o que expressa um aumento na liberação de NO<sup>26</sup>. Em um estudo que seguiu por cinco anos 74 pacientes com dor torácica mostrou que aqueles com DMF normal, considerada como dilatação maior ou igual a 10%, apresentaram menor número de eventos coronarianos e foram submetidos a angioplastia e/ou revascularização cardíaca menos frequentemente. A análise destes dados mostrou sensibilidade de 86%, especificidade de 51% e valor preditivo negativo de 85%, considerando como positivo o exame que resultou em menos de 10% de dilatação na artéria braquial e o desfecho positivo como infarto agudo do miocárdio, angioplastia ou revascularização do miocárdio<sup>27</sup>.

Esse padrão de achados é semelhante aos identificados para fW e, além disso, ambos são capazes de prever o desenvolvimento de eventos cardiovasculares maiores. É demonstrada, inclusive, correlação inversa entre os dois, ou seja, aqueles indivíduos com os maiores níveis séricos de fW apresentam também DMF alterada, enquanto que aqueles com baixos níveis de fW apresentam DMF normal<sup>8</sup>.

#### Células endoteliais circulantes

O achado de células endoteliais livres na circulação sanguínea é raro em indivíduos saudáveis, e tem sido indicada como um estágio final do injúria endotelial. De fato, sua presença é fortemente correlacionada com doença coronariana aguda; o aumento de seus níveis nas primeiras 48 horas após um evento coronariano é também considerado fator preditivo de morte. Este promissor marcador de dano endotelial apresenta boa correlação com outros marcadores de função endotelial, como fW e DMF, em pacientes com síndrome coronariana aguda. Tais achados sugerem que o dano endotelial agudo, como o manifestado pelo aumento das CEC, pode ser o principal determinante da alteração da vasodilatação mediada por fluxo, provavelmente devido à diminuição da biodisponibilidade de NO. Na doença coronariana estável, há um menor grau de injúria endotelial, representada pela menor quantidade de CEC, entretanto, a mantida disfunção endotelial e inflamação, indicadas pelos altos níveis de fW e IL-6 em relação aos controles, pode ser refletida pela alteração da FMD nesses pacientes<sup>28</sup>.

#### Considerações finais

Pacientes com câncer que desenvolvem trombose venosa apresentam expectativa de vida reduzida: indivíduos que apresentam um evento trombótico têm risco de morte relacionada ao evento quatro a

oito vezes maior se possuírem também diagnóstico de câncer. Estes indivíduos apresentam sobrevida reduzida quando comparados aos pacientes oncológicos cuja doença não curse com tais episódios. Este aumento na mortalidade reflete, provavelmente, não apenas mortes relacionadas ao tromboembolismo, mas também um curso mais agressivo destes tumores<sup>29</sup>.

São atualmente conhecidos diversos marcadores séricos de risco cardiovascular que se apresentam comprovadamente aumentados em mulheres portadoras de câncer de mama, como E e P-selectina e fator de von Willebrand. Na literatura há extensa correlação entre neoplasias malignas e trombose venosa, porém pouca informação sobre os efeitos dos produtos tumorais sobre o endotélio e sua influência quanto ao risco cardiovascular.

**Conflito de interesse:** não há

#### SUMMARY

##### BREAST CANCER AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

*The main cause of death among Brazilian women is cardiovascular disease followed by cancer with breast cancer as the most incident. The relationship between cancer and thrombosis is well known, although its association with other cardiovascular events is poorly understood. In order to study these events from the earliest findings such as endothelial injury and dysfunction and the evolving atherosclerotic plaque, many methods are currently being used. Among these methods, E- and P-selectin and the von Willebrand factor have been associated, either with cardiovascular risk or with breast cancer growth and metastasis. Brachial artery flow-mediated dilatation is a tool available that emerged in the last decade due to its noninvasive nature and its clear association with endothelial dysfunction and cardiovascular risk. The aim of this revision is to bring the newest and most relevant updates about the association of breast cancer, endothelial injury and cardiovascular risk. [Rev Assoc Med Bras 2008; 54(5): 467-70]*

**Key words:** Breast neoplasms. Cardiovascular diseases. Endothelium.

#### REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Frequência de óbitos por doenças do aparelho circulatório [citado 2008 jun 3]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24421](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=24421).
2. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [citado 2008 jun 3]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5).
3. Troussseau A. Clinique Médicale de l'Hotel-Dieu de Paris. Paris: JB Ballière et Fils; 1865.
4. Ricklas FR. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35:103-10.
5. Blann AD. Assessment of endothelial dysfunction: focus on atherothrombotic disease. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:256-61.
6. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:436-41.
7. Klotz O, Manning M. Fatty streaks in intima of arteries. *J Pathol Bacteriol*. 1912;16:211-20.
8. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111:3481-8.

9. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*. 2003;108:512-5.
10. Davies MJ. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation*. 1990;82:1138-46.
11. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006;20:311-20.
12. Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost*. 2006;95:49-55.
13. Rohsig LM, Damin DC, Stefani SD, Castro CG Jr, Roisenberg I, Schwartzmann G. von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34:1125-9.
14. Gil-Bezo I, Catalan V, Paramo J, Quero C, Escrivá de Romani S, Pérez-Ochoa A, et al. Von Willebrand factor as an intermediate between hemostasis and angiogenesis of tumor origin. *Rev Med Univ Navarra*. 2003;47:22-8.
15. Whincup PH, Danesh J, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, et al. von Willebrand factor and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J*. 2002;23:1764-70.
16. Sheen-Chan SM, Eng HL, Huang CC, Chen WJ. Serum levels of soluble E-selectin in women with breast cancer. *Br J Surg*. 2004;91:1578-81.
17. Silva HC, Garcao F, Coutinho EC, CFDEO, Regeteiro FJ. Soluble VCAM-1 and E-selectin in breast cancer: relationship with staging and with the detection of circulating cancer cells. *Neoplasma*. 2006;53:538-43.
18. Roldan V, Marin F, Lip GY, Blann AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors: A review of the literature. *Thromb Haemost*. 2003;90:1007-20.
19. Galen FX. Cell adhesion molecules in hypertension: endothelial markers of vascular injury and predictors of target organ damage? *J Hypertens*. 2002;20:813-6.
20. Blann AD, Gurney D, Wedley M, Bereford D, Stonelake P, Lip GY. Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: a comparison with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12:43-50.
21. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006;54:75-84.
22. Blann AD, Nader SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2003;24:2166-79.
23. Celermajer DS, Sorenson KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OJ, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-5.
24. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-65.
25. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-9.
26. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:4.
27. Naunteuff T, Heher S, Katzenschlager R, Wolff G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;86:207-10.
28. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction [circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation] to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*. 2006;111:302-8.
29. Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation*. 2003;107:117-21.

---

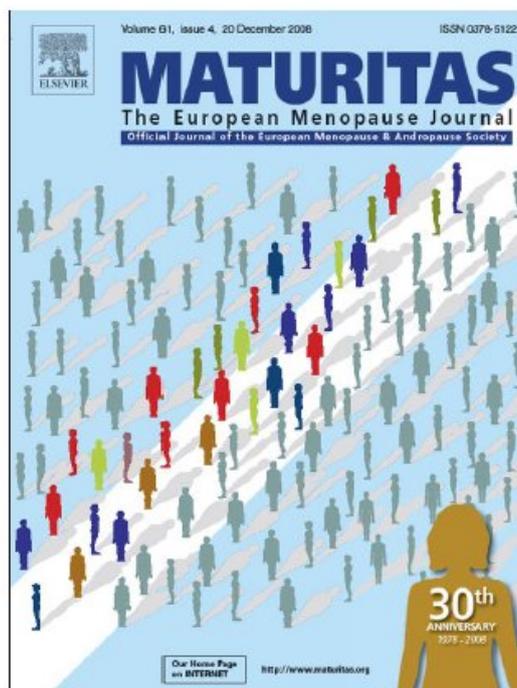
Artigo recebido: 02/10/07  
Aceito para publicação: 19/03/08

---

**Anexo C** Artigo publicado: Sonographic evaluation of endothelial function in letrozole and tamoxifen users

---

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Maturitas

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/maturitas](http://www.elsevier.com/locate/maturitas)

## Sonographic evaluation of endothelial function in letrozole and tamoxifen users

Carolina Oliveira Nastri<sup>a,b,\*</sup>, Wellington Paula Martins<sup>a,b</sup>, Rui Alberto Ferriani<sup>a</sup>,  
Francisco Mauad Filho<sup>a,b</sup>, Francisco Jose Candido dos Reis<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Brazil  
<sup>b</sup>Escola de Ultra-sonografia e Reclamação Médica de Ribeirão Preto – EURP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 August 2008  
Received in revised form  
14 September 2008  
Accepted 17 September 2008

#### Keywords:

Selective estrogen receptor modulators  
Aromatase inhibitors  
Breast cancer  
Vasodilation

### ABSTRACT

**Objectives:** Studies have shown that women previously treated for breast cancer present fewer cardiovascular events, indicating a possible protective effect of tamoxifen treatment. The effects of these aromatase inhibitors on cardiovascular protection remain controversial. The aim of this study was to compare some cardiovascular risk markers among breast cancer survivors following treatment with tamoxifen group (TMXg), letrozole group (LTZg) or no endocrine treatment group (NETg).

**Methods:** A total of 103 breast cancer survivors: 35 using TMXg, 34 using letrozole group (LTZg) and 34 using no endocrine treatment group (NETg) were evaluated. Ultrasonographic evaluation of brachial artery flow-mediated dilation (FMD), carotid intima-media thickness (IMT) and stiffness index ( $\beta$ ); blood total cholesterol, HDL and triglycerides were assessed.

**Results:** All three groups presented similar values of HDL and IMT. TMXg showed the lowest total cholesterol ( $219.29 \pm 36.31$  mg/dL vs.  $250.59 \pm 38.37$  mg/dL vs.  $245.09 \pm 35.35$  mg/dL; TMXg vs. LTZg vs. NETg, respectively;  $p < 0.01$ —ANOVA), the highest triglycerides ( $139.34 \pm 41.82$  mg/dL vs.  $111.35 \pm 28.22$  mg/dL vs.  $122.09 \pm 33.42$  mg/dL;  $p < 0.01$ ), the highest FMD ( $6.32 \pm 2.33\%$  vs.  $4.10 \pm 2.06\%$  vs.  $4.66 \pm 2.52\%$ ;  $p < 0.01$ ) and the lowest stiffness index ( $\beta$ ) ( $5.08 \pm 1.68$  vs.  $6.28 \pm 1.75$  vs.  $5.99 \pm 1.86$ ;  $p = 0.01$ ). LTZg did not differ significantly from NETg on any evaluated parameter.

**Conclusions:** We did not observe any effect of LTZg on the evaluated cardiovascular risk parameters compared to NETg. As such, the observed difference on lipid values, stiffness index ( $\beta$ ) and FMD between women receiving tamoxifen and letrozole might be best attributed to the beneficial effect of tamoxifen than to a detrimental effect of letrozole.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hormone receptor-positive breast cancer treatment includes endocrine therapy with tamoxifen and, more recently, with third generation aromatase inhibitors (AI). In the adjuvant setting, these medications are used for at least 5 years, and their long-term safety is, therefore, of great importance. Published data [1] show that elderly women with a history of treated postmenopausal breast cancer have a 34% lower hazard of hospitalization for acute myocardial infarction relative to patients without a history of breast carcinoma. The authors partially attribute these findings to a possible protective effect of tamoxifen treatment on cardio-

vascular health. Indeed, a recently published meta-analysis [2] shows that patients receiving AI have a 31% higher risk of grades 3 and 4 cardiovascular events than those receiving tamoxifen. Moreover, it was demonstrated that tamoxifen treatment for 6 months improved brachial artery flow-mediated dilation (FMD) and reduced intima-media thickness (IMT) in women treated for breast cancer [3].

Several markers are used to establish risk for cardiovascular disease, including lipid profile and ultrasound assessment of vascular function. The lipid profile of an individual is one such well-established risk marker. Tamoxifen treatment resulted in a favorable effect on cholesterol in postmenopausal women [4], reducing total cholesterol and LDL-C levels. However, it was also accompanied by an unfavorable increase in triglyceride levels. Conversely, the effects of AI on the blood lipids are controversial and unlikely to be significant [4]. Other risk markers include FMD and IMT as determined through ultrasound assessment of vascular function, a recent major advance in cardiology [5]. FMD is a robust and reproducible method to quantify endothelial function [6]. IMT

\* Corresponding author at: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Avenida dos Bandeirantes 3900, 8º andar, Ribeirão Preto, CEP 14049-900, São Paulo, Brazil. Tel.: +55 16 36022231; fax: +55 16 36330946.  
E-mail address: [canastri@hotmail.com](mailto:canastri@hotmail.com) (C.O. Nastri).

**Table 1**  
Subjects' characteristics of the three groups: no endocrine treatment group (NETg), tamoxifen group (TMXg) and letrozole group (LTZg).

	N (N)			p-Value
	NETg	TMXg	LTZg	
Clinical stage I <sup>a</sup>	14(41.2)	16(45.7)	20(58.8)	0.32 <sup>*</sup>
Clinical stage II <sup>a</sup>	16(47.1)	13(37.1)	12(35.3)	0.57 <sup>*</sup>
Clinical stage III <sup>a</sup>	4(11.8)	6(17.1)	2(5.9)	0.35 <sup>*</sup>
Total	34	35	34	
	Mean ± S.D.			p-Value
	NETg	TMXg	LTZg	
Age (years)	60.16 ± 4.38	62.24 ± 5.56	61.47 ± 5.82	0.26 <sup>**</sup>
Diagnosis (years)	4.27 ± 1.07	4.13 ± 1.07	4.30 ± 0.78	0.74 <sup>**</sup>
Treatment's length (years)		2.90 ± 1.04	3.13 ± 0.73	0.29 <sup>**</sup>
Menopause (years)	13.08 ± 3.16	14.53 ± 4.25	14.30 ± 5.01	0.31 <sup>**</sup>
Brachial diameter (mm)	3.24 ± 0.13	3.27 ± 0.11	3.26 ± 0.10	0.46
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.57 ± 1.68	24.95 ± 1.96	25.44 ± 1.84	0.34 <sup>**</sup>
SBP (mmHg)	133.38 ± 12.15	134.29 ± 13.11	135.03 ± 10.43	0.85 <sup>**</sup>
DBP (mmHg)	80.44 ± 9.10	81.77 ± 9.45	82.06 ± 9.81	0.75 <sup>**</sup>
Glucose (mg/dL)	90.62 ± 11.82	91.09 ± 12.54	89.50 ± 10.52	0.85 <sup>**</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	245.09 ± 35.35 <sup>a</sup>	219.29 ± 36.31 <sup>a,b</sup>	250.59 ± 38.37 <sup>b</sup>	<0.01 <sup>**</sup>
HDL (mg/dL)	50.15 ± 7.55	50.49 ± 7.66	49.18 ± 6.40	0.74 <sup>**</sup>
Triglycerides (mg/dL)	122.09 ± 33.42	139.34 ± 41.82 <sup>c</sup>	111.35 ± 28.22 <sup>c</sup>	<0.01 <sup>**</sup>

Data given as mean ± S.D.

The same letters (a–c) in different columns refer to significant difference using Tukey post hoc: <sup>a</sup>*p* < 0.01; <sup>b</sup>*p* < 0.01.

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

<sup>a</sup> In accordance with the 6th edition of the TNM Classification [27].

<sup>\*</sup> p-Value obtained by  $\chi^2$ .

<sup>\*\*</sup> p-Value obtained by one-way ANOVA.

<sup>\*\*</sup> p-Value obtained by unpaired Student's *t*-test.

is a marker of early atherosclerosis and a predictor of cardiovascular events such as stroke and myocardial infarction [7]. Additionally, the carotid arterial stiffness index ( $\beta$ ) allows the study of functional properties of arteries [8].

Here, we evaluated the above cardiovascular risk markers – total cholesterol, HDL, FMD, triglyceride, IMT, stiffness index ( $\beta$ ) – in breast cancer survivors not subjected to any adjuvant endocrine treatment as compared to women using tamoxifen or letrozole (a third generation aromatase inhibitor) as adjuvant endocrine therapy.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

All 56 breast cancer patients attended in the mastology clinic of the *Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto* who were on letrozole therapy were invited to participate in this study. Forty women fulfilled all eligibility criteria and were enrolled (letrozole group, LTZg). Pairing by age, another 40 breast cancer patients on tamoxifen therapy were enrolled in the same clinic (tamoxifen group, TMXg). The choice among endocrine treatments had been previously performed by the attending physician based on history of previous cardiovascular events, endometrial status, personal experience and the patient's financial possibility to buy the prescribed drug. All subjects were taking the drugs for at least 6 months as an adjuvant endocrine treatment to ensure that the effect of tamoxifen on FMD and IMT had taken place [3]. Another 40 women, also paired by age, which had previously finished treatment and were not receiving any further therapy for at least 6 months: all these women had tumors with no estrogen receptor expression and, hence, no endocrine therapy (no endocrine therapy group, NETg) was included in their treatment. Patients were eligible if their breast cancer diagnosis was within 2–7 years post-menopause and they had finished chemotherapy and radiotherapy. Patients were

excluded if they had history of previous stroke or acute myocardial infarction, diabetes and body mass index (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup> or were smokers. In total, 17 subjects were excluded—6 from the NETg, 5 from the TMXg and 6 from LTZg. All women receiving endocrine treatment had tumors positive for hormonal receptor. Of the 34 women in the LTZg, one had previously used tamoxifen for 1 month but had switched to letrozole because of allergic reactions. All other subjects in the LTZg were receiving the drug as a first choice. Subjects' characteristics from the three groups are shown in Table 1. All women gave written informed consent to the study, which was approved by the local institutional review board.

### 2.2. Blood pressure and ultrasonographic evaluation

All examinations were performed in the morning (7–9 a.m.) following a 15-min rest, during which patients lay in a supine position in a temperature controlled room (20–23 °C) at the *Escola de Ultrassonografia de Ribeirão Preto* (EURP). All patients had fasted for a minimum of eight hours overnight. The systolic (SBP) and diastolic blood pressures (DBP) were examined in the left upper arm using a standard mercury sphygmomanometer. The mean of three consecutive measurements was considered. Ultrasound scans were performed following blood pressure measurements using a 3–12 MHz linear probe from a Philips HD11 machine (Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA) with an electrocardiogram attached. All blood pressure measurements and ultrasound scans were performed by the same operator (WPM) who was blinded to the patients' history.

### 2.3. Common carotid artery intima-media thickness (IMT)

IMT measurement was performed as previously described [9,10]. The left common artery, including the carotid bulb image, was scanned, and a 5-s magnified moving scan was recorded. The recorded scans were analyzed shortly following the complete

sonographic examination by the same operator. The best quality end-diastolic frame was subjectively selected (incident with the R wave on a continuously recorded electrocardiogram). From this image, four measurements of the left common carotid artery far wall intima-media thickness were taken, approximately 10–20 mm proximal to the carotid bulb. The mean of these four measurements was considered as the subject's IMT.

#### 2.4. Carotid stiffness index ( $\beta$ )

For this assessment, the left carotid systolic (CSD) and diastolic (CDD) diameters were obtained using the B-mode during electrocardiogram R and T wave, respectively [10,11]. These measurements were made four times, approximately 10–20 mm proximal to the carotid bulb, from the intima of the far wall to the intima of the near wall. The mean of these four measurements was considered as the subject's CSD and CDD. The carotid stiffness index ( $\beta$ ) was then calculated as  $(\beta) = \ln(SBP/DBP) / ((CSD - CDD) / CDD)$ , where  $\ln$  is the natural logarithm [12].

#### 2.5. Brachial artery flow-mediated dilation (FMD)

The right brachial artery was imaged approximately 5–10 cm proximal to the antecubital fossa in the longitudinal plane. A segment with clear near and far intimal interfaces between the lumen and vessel wall was selected, and a 5-s moving scan was recorded. The recorded scan was analyzed shortly following the sonographic examination. The best quality end-diastolic frame was subjectively selected (incident with the R wave on a continuously recorded electrocardiogram). From this image, four measurements were taken of the brachial artery diameter from the intima of the far wall to the intima of the near wall. The mean of these four measurements was considered as the subject's brachial artery basal diameter ( $BD_{pre}$ ). To induce vasodilation, a 5-min inflation of a pneumatic cuff (50 mmHg > SBP or 200 mmHg, whichever was higher) placed around the forearm immediately below the medial epicondyle followed by a rapid deflation using a standard sphygmomanometer was performed. Sixty seconds following cuff deflation, another 5-s moving scan from the brachial artery was recorded. New values for brachial artery diameter ( $BD_{post}$ ) were assessed as before to calculate FMD  $((BD_{post} - BD_{pre}) / BD_{pre})$ . We chose to evaluate the vasodilation 60 s after release of the occlusive cuff because several studies have suggested that the maximal increase in diameter occurs at this time [13,14].

#### 2.6. Blood dosages

All subjects had had 12 h fasting blood cholesterol, HDL, triglycerides and glucose dosages evaluated within a 6-month window prior to ultrasound evaluation.

#### 2.7. Statistics

The sample size was estimated based on FMD, the mean variable of this study. Welsch et al. [15] calculated that in a study with a cross-sectional design 23 subjects would be required to detect an FMD difference of 60% (two-tailed) (e.g., 5% vs. 8%, at 90% power). To achieve an FMD difference of 40% (e.g., 5% vs. 7%, at 90% power), 46 subjects have to be included. In our hospital 56 women were using letrozole as endocrine treatment and a higher number were using tamoxifen or were not submitted to endocrine treatment. So, if we invited all users of letrozole and a similar number of patients for the two other groups, the power to evaluate a clinically significant change on FMD (>2%) would be sufficiently high. Data for

**Table 2**  
Comparison of ultrasonographic measurements using ANOVA: no endocrine treatment group (NETg), tamoxifen group (TMXg) and letrozole group (LTZg).

	IMT (mm)	FMD (%)	Stiffness index ( $\beta$ )
NETg	0.72 ± 0.11	4.66 ± 2.52	5.99 ± 1.86
TMXg	0.71 ± 0.11	6.32 ± 2.33	5.08 ± 1.68
LTZg	0.72 ± 0.11	4.10 ± 2.06	6.28 ± 1.75
p-Value (ANOVA)	0.93	<0.01	0.01
Pairwise comparison (p-values)			
NETg vs. TMXg	0.92	0.01	0.08
NETg vs. LTZg	0.97	0.57	0.78
TMXg vs. LTZg	0.99	<0.01	0.02

Data given as mean ± S.D.

**Table 3**  
Comparison of ultrasonographic measurements corrected by some possible confounding factors (age, body mass index, and time since menopause, systolic and diastolic blood pressure)—using ANCOVA: no endocrine treatment group (NETg), tamoxifen group (TMXg) and letrozole group (LTZg).

	IMT (mm)	FMD (%)	Stiffness index ( $\beta$ )
NETg	0.73 ± 0.01	4.63 ± 0.34	6.04 ± 0.15
TMXg	0.71 ± 0.01	6.33 ± 0.34	5.03 ± 0.15
LTZg	0.71 ± 0.01	4.11 ± 0.34	6.28 ± 0.15
p-Value (ANCOVA)	0.33	<0.01	<0.01
Pairwise comparison (p-values)			
NETg vs. TMXg	0.17	<0.01	<0.01
NETg vs. LTZg	0.24	0.29	0.26
TMXg vs. LTZg	0.84	<0.01	<0.01

Data given as estimated mean ± S.E. using ANCOVA.

each variable were tested using the Kolmogorov–Smirnov normality test. The mean and standard deviation (S.D.) were determined, and one-way ANOVA with Tukey's post hoc multiple comparisons was performed to detect differences among the groups. Unpaired Student's *t*-test was performed to compare the time from treatment's beginning between TMXg and LTZg.

Considering the non-prospective nature of the methodology applied, some traditional risk factors were weighed in order to confirm that accumulation of slight differences in the risk profile of each subgroup were not affecting differences between the vascular markers and that the effect of treatment remained significant. So, some confounding factors as age, BMI, time since menopause, SBP, and DBP were assessed using ANCOVA analysis. All analyses were performed using SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3. Results

All subjects' characteristics of the three groups including the lipid profile are shown in Table 1. No significant difference was found among the three groups for HDL while TMXg had the lowest total cholesterol and the highest triglycerides levels compared to the two other groups.

The mean of the ultrasonographic measurements of the three groups were compared by ANOVA and all results are shown in Table 2. No significant difference was found among the three groups for IMT. TMXg had the highest FMD mean as compared to the two other groups, and significantly lower stiffness index ( $\beta$ ) mean than LTZg. Furthermore, we observed that the ultrasonographic measurements did not differ significantly between LTZg and NETg.

After adjusting the results for some possible confounding factors as age, BMI, time since menopause, SBP, and DBP by using ANCOVA, we obtained new estimated mean and standard error for each sonographic measurement (Table 3). The results thereof obtained were similar to that found using ANOVA.

Furthermore, considering the standard deviation for FMD observed in our subjects (~2.5%, the power to find a difference  $\geq 2\%$  was  $>90\%$  (power = 90% with 33 subjects per groups). Considering the standard deviation for IMT observed in our subjects (~0.11 mm, the power to find a difference  $\geq 0.1$  mm was  $>95\%$  (0.1 mm is the minimum variation used to attribute an increase in cardiovascular risk [7]; power = 95% with 31 subjects per group). Since carotid stiffness index was not extensively studied, we did not find the minimum value with clinical significance.

#### 4. Discussion

Similar to other selective estrogen receptor modulators, tamoxifen shows estrogen-like effects on some plasma cardiovascular risk factors [16,17]. In the present study, we observed the lowest total blood cholesterol dosages in the TMXg in comparison to the two other treatment groups, while no significant difference could be observed between LTZg and NETg. Our findings agree with previous reports wherein the use of tamoxifen was shown to decrease total cholesterol and to have no effect on HDL levels as compared to no endocrine treatment for breast cancer [17]. In the safety analysis of BIG 1-98 trial [18], both tamoxifen and letrozole decreased total blood cholesterol, although the decrease was more precocious and pronounced for women receiving tamoxifen. Furthermore, we observed the highest triglyceride levels in TMXg, although this difference was significant only when compared to LTZg. Tamoxifen has been associated with an increase in triglycerides levels, and it may even be responsible for marked hypertriglyceridemia [19], while the effect of aromatase inhibitors on lipid profile remains controversial [4]. In the present study, no difference was found in any lipid parameters (total cholesterol, HDL and triglycerides) between NETg and LTZg.

IMT is a blood vessel wall structural marker that is useful for predicting cardiovascular events [7,20]. The use of tamoxifen for breast cancer patients has been associated with a decrease in IMT [3,21]. One of these studies [3] compared the IMT before and after 6 months between women undergoing tamoxifen therapy for breast cancer and healthy non-medicated women. The authors observed a slight reduction in the combined IMT (the average from common carotid artery, carotid bulb, and internal carotid artery measurements):  $-0.09 \pm 0.11$  mm vs.  $0.04 \pm 0.11$  mm; mean  $\pm$  S.D.;  $p = 0.018$ ; tamoxifen and control groups, respectively. However, no difference could be detected in the IMT of the common carotid artery between the two groups ( $-0.07 \pm 0.14$  mm vs.  $-0.01 \pm 0.04$  mm;  $p = 0.10$ ; tamoxifen and control groups, respectively). In the present study, we could not find any significant difference in IMT among the groups even when adjusting for the well-known cardiovascular risk factors age, BMI, time since menopause, SBP, and DBP. This may be because the expected change in the intima-media thickness over time is very small, while the observed standard deviation is relatively high. As such, a difference would be more easily detected by evaluating individual changes through time. Another important issue regarding the IMT's measurement is the carotid segment investigated: there exists some heterogeneity on the carotid segment definitions used in the clinical trials [7]. A review about IMT's reproducibility observed that the common carotid artery is most reliable segment for its measurement [22]. In this way, we decided to measure the IMT on the common carotid artery.

Arterial stiffness describes the rigidity of the arterial walls and is associated with the aging process [23]. Arterial stiffness may be estimated using a variety of different techniques, such as pulse pressure, pulse wave velocity and ultrasonographic and magnetic resonance derived indices, although at present the majority of measurements are made for experimental and physiological studies

rather than in clinical practice [12]. Among the ultrasonographic indices, the stiffness index ( $\beta$ ) could be considered one of the most useful to estimate arterial stiffness because it is less dependent on blood pressure [12]. In the present study, we observed the lowest stiffness index ( $\beta$ ) value in the TMXg, although the difference was significant only when compared to the LTZg. Both NETg and LTZg presented similar values, and we attribute these findings to the beneficial effect of tamoxifen on carotid stiffness rather than a detrimental effect of letrozole.

Endothelial dysfunction is observed in the initial stages of cardiovascular disease and is considered an independent predictor of clinical events such as acute myocardial infarction and stroke [24]. Selective estrogen receptor modulators are thought to have beneficial effects on the vascular wall. In female rabbits subjected to ovariectomy and a hyper-cholesterol diet, tamoxifen was shown to reduce aortic atherosclerotic plaques [25]. There are few studies addressing the endothelial effect of tamoxifen in post-menopausal women. One study [26] demonstrated that 4 weeks of tamoxifen therapy for breast cancer did not affect FMD. Additionally, no significant change in FMD on withdrawal from tamoxifen was noticed. Another study [3] evaluated the effect of 6 months of tamoxifen therapy for breast cancer and observed an improvement in FMD compared to healthy women ( $2.22 \pm 3.46\%$  vs.  $0.08 \pm 3.78\%$ ;  $p = 0.012$ ; mean  $\pm$  S.D.; tamoxifen and non-treated control groups, respectively). In our study, TMXg presented the highest FMD mean, a significant difference when compared to both LTZg and NETg. Moreover, no difference was detected in FMD between LTZg and NETg even when adjusting for the studied cardiovascular risk factors. Once again, we attribute these findings to the beneficial effect of tamoxifen on endothelial function.

The present study has the methodological limitations of a cross-sectional study in respect to our lack of knowledge of the baseline values of the studied parameters. This study design also does not permit randomization and some heterogeneity among the groups was expected. Another issue is the relatively small number of subjects in each group, what may arouse concern when considering the lack of significant difference between LTZg and NETg on the studied sonographic parameters.

Hence, the observed difference in lipid values, stiffness index ( $\beta$ ) and FMD between women receiving tamoxifen and letrozole might best be attributed to the beneficial effect of tamoxifen on these parameters rather than to a detrimental effect of letrozole. However, these observations are limited by the methodological approach of the present study and clearer conclusions would be provided only by conducting a randomized controlled trial.

#### Potential conflicts of interest

None.

#### Disclosure

The authors received no external funding or support.

#### References

- [1] Lamont EB, Christakis NA, Lauderdale DS. Favorable cardiac risk among elderly breast carcinoma survivors. *Cancer* 2003;98:2–10.
- [2] Cuppone F, Bria E, Verma S, et al. Do adjuvant aromatase inhibitors increase the cardiovascular risk in postmenopausal women with early breast cancer? Meta-analysis of randomized trials. *Cancer* 2008;112:260–7.
- [3] Stamatelopoulos KS, Lekakis JP, Poulakaki NA, et al. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Am Heart J* 2004;147:1093–9.
- [4] Lewis S. Do endocrine treatments for breast cancer have a negative impact on lipid profiles and cardiovascular risk in postmenopausal women? *Am Heart J* 2007;153:182–8.

- [5] Kapuku GK, Harshfield GA, Davis HC, Treiber FA. Early markers of cardiovascular disease. *Vascu Pharmacol* 2006;45:277–80.
- [6] Donald AE, Charakida M, Cole TJ, et al. Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1846–50.
- [7] Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007;115:459–67.
- [8] Laurent S, Boutouyrie P. Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol* 2007;20(Suppl. 12):S45–50.
- [9] Raitakari OT, Juonala M, Kahonen M, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* 2003;290:2277–83.
- [10] Martins WP, Nastri CO, Ferriani RA, Filho FM. Brachial artery pulsatility index change 1 min after 5-minute forearm compression: comparison with flow-mediated dilatation. *J Ultrasound Med* 2008;27:693–9.
- [11] Tsiyoglous G, Vemmos K, Papamichael C, et al. Common carotid arterial stiffness and the risk of ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 2006;13:475–81.
- [12] Mackenzie IS, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *QJM* 2002;95:67–74.
- [13] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257–65.
- [14] Craiem D, Chironi G, Simon A, Levenson J. New assessment of endothelium-dependent flow-mediated vasodilation to characterize endothelium dysfunction. *Am J Ther* 2008;15:340–4.
- [15] Welsch MA, Allen JD, Geaghan JP. Stability and reproducibility of brachial artery flow-mediated dilatation. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34:960–5.
- [16] Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation* 2001;103:1497–502.
- [17] Love RR, Wiebe DA, Feyzi JM, Newcomb PA, Chappell RJ. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1534–9.
- [18] Mouridsen H, Keshaviah A, Coates AS, et al. Cardiovascular adverse events during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer using letrozole or tamoxifen: safety analysis of BIG 1-98 trial. *J Clin Oncol* 2007;25:5715–22.
- [19] Hozumi Y, Kawano M, Saito T, Miyata M. Effect of tamoxifen on serum lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1633–5.
- [20] Iglesias del Sol A, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JC. Carotid intima-media thickness at different sites: relation to incident myocardial infarction; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2002;23:934–40.
- [21] Simon T, Boutouyrie P, Simon JM, et al. Influence of tamoxifen on carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Circulation* 2002;106:2925–9.
- [22] Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke* 1997;28:665–71.
- [23] Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* 2005;46:454–62.
- [24] Ioannides R, Bellien J, Thuilliez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function—a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol* 2006;20:311–20.
- [25] Kallas Hueb C, Aldrighi JM, Kallas E, Franchini Ramires JA. Repercussions of raloxifen, tamoxifen and estrogen on aortic atherosclerotic lesions of female rabbits submitted to ovariectomy and hypercholesterolemia diet. *Maturitas* 2005;50:30–8.
- [26] Ong PJ, Linardou H, Graham HA, et al. Tamoxifen is not detrimental to endothelial function in postmenopausal women with breast cancer. *Am Heart J* 2001;142:E6.
- [27] Singletary SE, Greene FL. Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. *Semin Surg Oncol* 2003;21:53–9.

**Anexo D** Comentários e respostas aos comentários dos revisores do artigo “Sonographic evaluation of endothelial function in letrozole and tamoxifen users”

---

Response to Reviewer's comments:

**Reviewer #1:**

Major comments:

**R#1** 1.The design of this study is cross-sectional which does not allow firm conclusions especially when different treatment modalities are being compared. There is no knowledge of the baseline state of the end-points before treatment and therefore change cannot be assessed. This should be clearly stated as major limitation.

**Authors:** We agree with such limitations and it is now clearly stated in the "Discussion" section.

**R#1** Further to that, the authors do not provide vital information on the methods of recruitment. Were these patients consecutively recruited? Were the different groups matched for confounding factors or was it a random finding that risk factor profiles did not differ among groups? Was there any kind of randomization in the selection of therapy for each participant even if vascular markers were not measured at baseline?

**Authors:** All 56 breast cancer patients attended in the mastology clinic of the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto were invited to participate in this study. Forty women fulfilled all eligibility criteria and were enrolled. Pairing by age, another 40 breast cancer patients on tamoxifen therapy were enrolled in the same clinic. We attribute the homogeneity observed among the groups to be the result of the inclusion and exclusion criteria used. This information is now better explained in the "Methods" section, thank you.

**R#1** Which was the range of the treatment duration in the 2 groups? Why was the minimum of 6 months of treatment selected as an inclusion criterion? Was this an arbitrary figure or was it based on literature?

**Authors:** The treatment with letrozole ranged from 1.0 to 4.6 years and with tamoxifen ranged from 0.8 to 4.9 years – the mean and standard deviation may be found in Table 1. All subjects were taking the drugs for at least six months as an adjuvant endocrine treatment to ensure that the effect of tamoxifen on FMD and IMT had taken place, as previously demonstrated by Stamatelopoulos et al [1]; it is now better explained in the manuscript, thank you.

**R#1** 2. Again for a cross-sectional study a number of 35 in each group is relatively low. My main concern is in the comparisons between NET and LTZ where a small but significant difference may have been missed due to a low number of patients. Was there any sample size or power calculation for a main end-point of this study such as FMD, IMT or stiffness index?

**Authors:** We do agree that a number of 35 subjects in each group seems to be a relatively small sample size. However, considering studies that evaluated FMD, our sample was relatively large. The great majority of the studies that evaluated FMD observed less than 30 subjects per group (Figure 1) [2]. The reviewer may observe in Figure 1 that the means for FMD observed in our study (4.1% to 6.3%) as well as the standard deviations (2.1% to 2.5%) are usual values.

Regarding the sample size to be used when studying FMD, Moens et al. wrote in a review addressing FMD [3]: “Sorensen et al [4] calculated that in clinical trials a mean improvement in FMD of  $\geq 2\%$  is necessary to detect a treatment benefit and that for any individual a difference of 4 to 8% is necessary to account for natural variability. Welsch

et al [5] studied the clinical trial design and calculated that in a study with a cross-sectional design (*ie*, smokers vs nonsmokers) 23 subjects would be required to detect an FMD difference of 60% (two-tailed) (*eg*, 5% vs 8%, at 90% power). To achieve an FMD difference of 40% (*eg*, 5% vs 7%, at 90% power), 46 subjects have to be included.”

Considering the standard deviation for FMD observed in our subjects = 2.5%, the power to find a difference  $\geq 2\%$  was  $> 90\%$ , (Power = 95% with 41 subjects per group; Power = 90% with 33 subjects per group and Power of 80% with 24 subjects). Considering the standard deviation for IMT observed in our subjects = 0.11mm, the power to find a difference  $\geq 0.1\text{mm}$  (minimum variation used to attribute an increase in cardiovascular risk [6]) was  $> 95\%$  (Power = 95% with 31 subjects per group, 90% with 25 and 80% with 19). Since carotid stiffness index was not extensively study, we did not find the minimum value with clinical significance.

**R#1** 3. In the statistical methods, traditional risk factors should be considered by ANCOVA in a multivariate model, in order to confirm that accumulation of slight differences in the risk profile between the subgroups are not affecting differences between the vascular markers and the effect of treatment remains significant. This is very important particularly in non-prospective studies assessing treatment.

**Authors:** We agree with the reviewers and we performed the ANCOVA analysis adjusting for age, BMI, time since menopause, SBP, and DBP. We did not adjust for serum lipids because the drugs used, mainly tamoxifen, may have altered them. The results obtained were similar to that obtained using ANOVA. We added a table with such results and included them in the “Results” and “Discussion” sections.

**R#1** 4. Also smoking habits of the population are not mentioned anywhere in the manuscript. These should be reported in table 1 and compared among the 3 groups. Smoking should also be included in the multivariate model.

**Authors:** Smokers were excluded from the study, it is now written in a more clear way in the “Methods-Subjects” section.

Minor comments:

**R#1** 1. SD should be added in the abstract results section.

**Authors:** It is now added.

**R#1** 2. Since how long did the participants have finished chemotherapy and radiotherapy?

**Authors:** The patients had finished chemotherapy and radiotherapy at least 6 months before the recruitment. This is stated in the “Method-Subject” section.

**R#1** 3. The method selected to assess stiffness is one measuring only local stiffness and this may differ from currently available gold standard methods such as PWV assessing stiffness in the aorta which is more clinically relevant. Accordingly, this should be made clear in the methods section and the sentence in the discussion "The stiffness..on blood pressure [11]" should be changed to refer only on markers concerning local stiffness.

**Authors:** We agree that the PWV would have been the best option to evaluate the arterial stiffness. However we do not have the possibility to perform such measurements. We decided to evaluate the Stiffness Index because it is a simple method

to perform since we were already evaluating the carotid artery by ultrasound examinations. We rewrote this paragraph.

**R#1** 4. Was the operator, performing hemodynamic and vascular measurements, blinded to the history of the patients?

**Authors:** The operator was blind to the patient's history; it is now stated in the manuscript, thank you.

**R#1** 5. In table 1 the number of participants in each group should be reported. Also please define clinical stages I,II,III.

**Authors:** The total number of participants was added in table 1. It was also added the reference of the 6<sup>th</sup> TNM Classification of breast tumors.

**R#1** 6. In table 2 concerning Tukey Post Hoc multiple comparisons it is not clear to which pairwise comparisons each p value is referring.

**Authors:** We simplified the tables and better explained the comparisons; we hope it will help to improve the understanding of the table.

**Reviewer #2: Manuscript Number: MAT-D-08-00156**

**R#2** Tamoxifen does show a lower total cholesterol and higher triglycerides compared to

LTZ. The authors have titled their paper "sonographic evaluation of endothelial function". The inclusion of the lipid data suggests a change of title perhaps to just "Measuring cardiovascular risk factors, etc."

**Authors:** The serum lipid measurements were obtained only as secondary variables in order to characterize the groups and assess some well-known cardiovascular risk parameters. The objectives of these measurements were to compare the values among the groups and, if any difference was found, to have it considered in the statistical analysis. To make it clearer to the reader we placed the lipid values in table 1 (“Subjects’ characteristics of the three groups”) instead of placing it in table 2 (“Ultrasonographic measurements obtained from women of the three groups”). We hope this change will help the understanding of the manuscript.

Methodologic Concerns:

**R#2 1.** Non-randomization. Although Table 1 shows the similarity between the groups, it is not comparable to a prospective study of women with breast cancer who have baseline cardiovascular risk parameters measured and then are randomized to one of the 3 treatment groups. The absence of pre-treatment lipids and measures of endothelial function is a major short-coming.

**Authors:** We recognize this is a major limitation of our study and this issue is now more extensively expressed in the “Discussion” section.

**R#2 2.** Selection of subjects: Women "excluded" included higher-risk women. Wouldn't it have been advantageous to have included them as they might have helped clarify factors affected by treatment or failure to show beneficial effects.

**Authors:** Considering the study design and the relatively small sample size, we excluded these women because these risk factors, such as obesity and coronary disease, could be additional confounding factors. We exclude these women to make the samples

less heterogeneous. A bigger, prospective study would be necessary to address this important issue.

**R#2** All the women are more than a decade past menopause. Based on the Women's Health Initiative findings, they all fall into the group of women least likely to show an endothelial effect of endocrine treatment.

**R#2** Finally, women with "tabagism" (defined by the Merck Manual as "tobacco poisoning") are excluded. Do they simply mean "smokers" were excluded ? If so, then just say "smokers excluded". If they mean something else then they should indicate if any smokers were in the study as smoking can have profound effects on FMD.

**Authors:** We are sorry about the equivocal term used; it was changed for "smokers".

**R#2** 3. We do not know when the women ingested their medication relative to the timing of the sonographic studies. The medications could have acute FMD effects or, if they have been withheld, there could be withdrawal effects. If the authors know "time from last administration of active drug", that would be useful to include in the data.

**Authors:** We did not record the timing of the last dose of the studied drugs because of its long half-life period (tamoxifen: 5-7 days; letrozole: about 2 days). After 2 to 6 weeks of letrozole administration it reaches a steady-state plasma concentration that is maintained over extended periods. For tamoxifen, a steady-state concentration is achieved in about 4 weeks and steady-state concentration for N-desmethyl tamoxifen – its major metabolite - is achieved in about 8 weeks after initiation of therapy. The subjects' preparation included an 8 hour overnight fast, abstinence of exercise, caffeine-

containing food and medications and withheld of vasoactive medications for four half-lives. We followed the recommendations made by Corretti et al {Corretti, 2002 #39}.

**R#2** 4. Flow-mediated dilation (FMD) issues: The baseline diameters are not shown. Because the percent changes are small compared to other studies, the baseline diameter is important for me to visualize how much of a change is being seen.

**Authors:** The brachial diameter baseline values of the were added in Table 1.

**R#2** The FMD is measured at one minute. Peak velocity is typically seen at 10-15 seconds after cuff release. Were any measurements made at that time period? Since a stimulus response is being measured and we have no pre-treatment comparison data, FMD data at the optimal moment would be a better comparison. The changes found show only a 2% difference in % FMD between TMX and LTZ/NET.

**Authors:** The measurements were made 60s after cuff deflation because it is the moment of maximum vasodilation as stated by Corretti et al in the "Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery" [7]: "Several studies have suggested that the maximal increase in diameter occurs approximately 60 s after release of the occlusive cuff, or 45 to 60 s after peak reactive hyperemic blood flow." Recently, Craiem et al [8] demonstrated through the use of an electronic device capable of making continuous measurements of the brachial diameter that the maximum dilation after reactive hyperemia occurs at 60s (figure 2).

**R#2** 5. Failure to include an endothelium-independent vasodilator stimulus such as nitroglycerin. Drawing conclusions regarding endothelium-dependent mechanisms is of questionable reliability without an adequate control for endothelial-independent vasodilator function.

**Authors:** Since we have excluded patients with coronary disease and previous stroke, the measurement of endothelium-independent vasodilation with nitroglycerin becomes less relevant, since we were aiming to study only the endothelial effect of letrozole and tamoxifen. Above a paragraph extracted from Moens et al {Moens, 2005 #35}.

“An exogenous NO donor (*eg*, a single high dose of nitroglycerin [0.4 mg]) is used to determine the maximum obtainable vasodilator response, and to serve as a measure of endothelium-independent vasodilation, reflecting vascular smooth muscle function. As cardiovascular risk factors increase in number, smooth muscle dysfunction becomes apparent, and thus the nitroglycerin response is progressively impaired independently of endothelial dysfunction. This should be taken into account when studying patients with either coronary or systemic atherosclerosis.”

**R#2** The rationale for this study is the reports of reduced cardiovascular events in breast cancer patients using TMX and the possibility of an increase in women using aromatase inhibitors. Given the increasing use of AI's, it is important to identify women at higher risk for CVD events and adjust treatment accordingly. The lipid differences may or may not explain the difference in CVD events. Effects on arterial structure (IMT) and function (stiffness and FMD) are relevant and needed. A prospective, randomized trial would appear to be called for.

**Authors:** The need of a randomized controlled trial to better evaluate our findings is stated at the end of the manuscript, following the conclusion.

**Reviewer #3:**

**R#3** A key aspect of power calculations is the magnitude of the expected relation. The magnitude of relation used in power calculations should be clarified. Please, include your statistical power to detect various effects, and how you determined the appropriate sample size.

**Authors:** As answered to reviewer 2:

We do agree that a number of 35 subjects in each group seems to be a relatively small sample size. However, considering studies that evaluated FMD, our sample was relatively large. The great majority of the studies that evaluated FMD observed less than 30 subjects per group (Figure 1) [2]. The reviewer may observe in Figure 1 that the means for FMD observed in our study (4.1% to 6.3%) as well as the standard deviations (2.1% to 2.5%) are usual values.

Regarding the sample size to be used when studying FMD, Moens et al. write in a review addressing FMD [3]: “Sorensen et al [4] calculated that in clinical trials a mean improvement in FMD of  $\geq 2\%$  is necessary to detect a treatment benefit and that for any individual a difference of 4 to 8% is necessary to account for natural variability. Welsch et al [5] studied the clinical trial design and calculated that in a study with a cross-sectional design (*ie*, smokers vs nonsmokers) 23 subjects would be required to detect an FMD difference of 60% (two-tailed) (*eg*, 5% vs 8%, respectively, at 90% power). To achieve an FMD difference of 40% (*eg*, 5% vs 7%, respectively, at 90% power), 46 subjects have to be included.”

Considering the standard deviation for FMD observed in our subjects = 2.5%, the power to find a difference  $\geq 2\%$  was  $> 90\%$ , (Power = 95% with 41 subjects per group; Power = 90% with 33 subjects per group and Power of 80% with 24 subjects). Considering the standard deviation for IMT observed in our subjects = 0.11mm, the power to find a difference  $\geq 0.1\text{mm}$  (minimum variation used to attribute an increase in cardiovascular risk [6]) was  $> 95\%$  (Power = 95% with 31 subjects per group, 90% with 25 and 80% with 19). Since carotid stiffness index was not extensively study, we did not find the minimum value with clinical significance.

These considerations are now discussed in the “Methods-Statistics” and in the “Results” sections.

**R#3** Due to the small sample size of the examined population and to the study design, multivariate logistic regression model should be performed as the results do not seem (i.e. age, time since menopause, BMI, etc.).

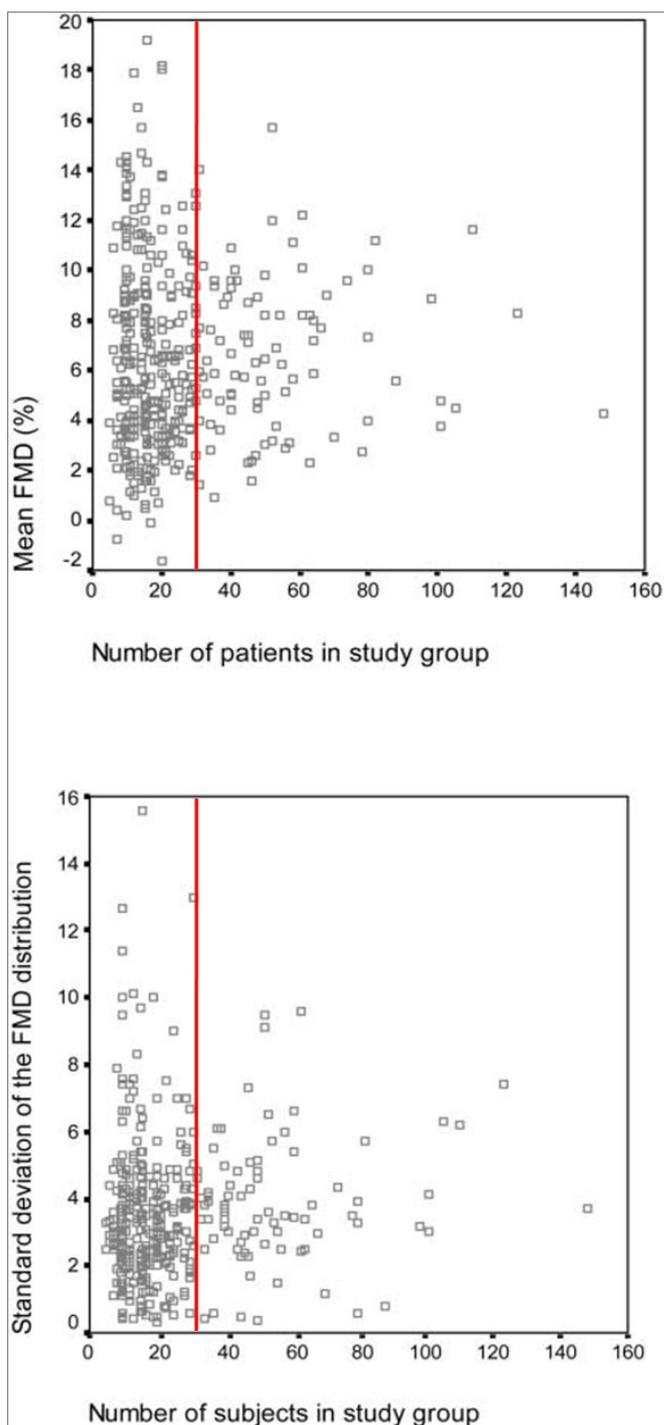
**Authors:** We agree with the reviewers and we performed the ANCOVA analysis adjusting for age, BMI, time since menopause, SBP, and DBP. We did not adjust for serum lipids because the drugs used, meanly tamoxifen, may have altered them. The results obtained were similar to that obtained using ANOVA. We added a table with such results and included them in the “Results” and “Discussion” sections.

**R#3** Study limitations should be carefully discussed. This was a small study and its findings should be interpreted with caution. In addition, the small sample size of the study population resulted in possible confounding and this needs to be discussed as well.

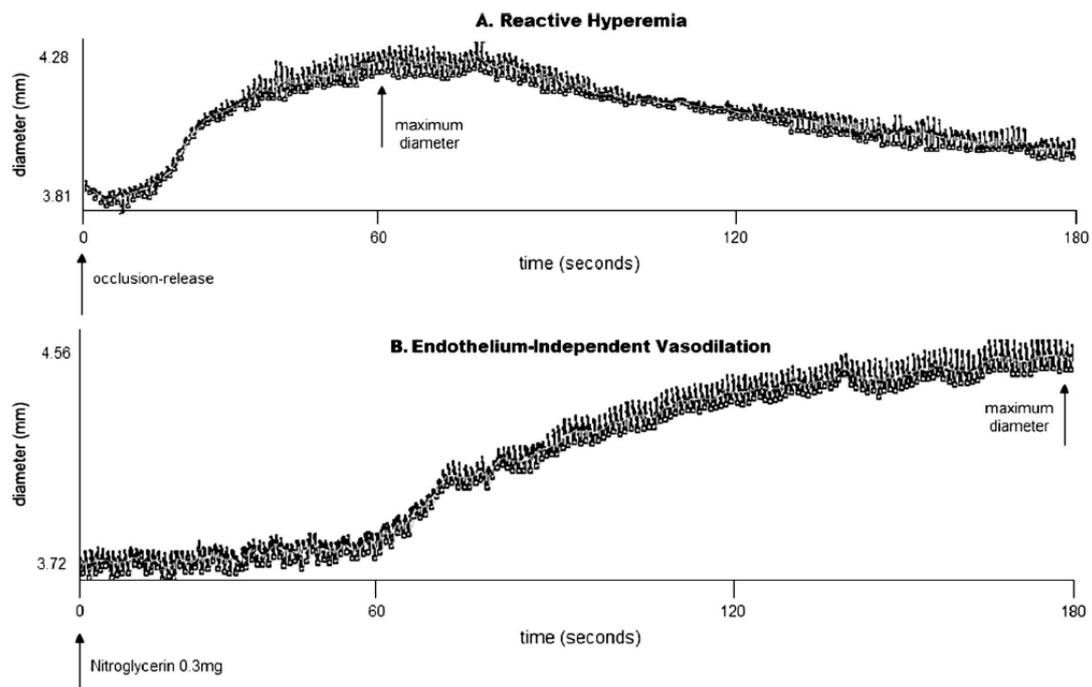
**Authors:** We agree with the reviewer and we emphasized this matter in the end of the Discussion.

## References

- [1] Stamatelopoulos KS, Lekakis JP, Poulakaki NA et al. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Am Heart J* 2004; 147: 1093-9.
- [2] Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJ. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. *Eur Heart J* 2005; 26: 363-8.
- [3] Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 2005; 127: 2254-63.
- [4] Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74: 247-53.
- [5] Welsch MA, Allen JD, Geaghan JP. Stability and reproducibility of brachial artery flow-mediated dilation. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 960-5.
- [6] Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115: 459-67.
- [7] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-65.
- [8] Craiem D, Chironi G, Simon A, Levenson J. New assessment of endothelium-dependent flow-mediated vasodilation to characterize endothelium dysfunction. *Am J Ther* 2008; 15: 340-4.



**Figure 1** The relation of mean FMD (top) and standard deviation of the FMD distribution by number of subjects in the study group ( $n = 405$  study groups) – extracted from Bots et al. [2]. The reviewers may observe in this figure that the vast majority of studies evaluating FMD observed less than 30 subjects per group (red line).



**Figure 2** This figure shows the brachial artery diameter measured continuously by an electronic device – extracted from Craiem et al [8]. The reviewers may observe that the maximum brachial artery diameter measured by reactive hyperemia (A) occurs after 60s of the stimulus.

**Anexo E** Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todas as participantes da pesquisa.

---

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação da função endotelial em pacientes com câncer de mama em uso de tamoxifeno e inibidores de aromatase como terapia adjuvante.

Pesquisador responsável: Carolina Oliveira Nastri - CRM-SP 104808

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

Instituição: \_\_\_\_\_ Reg.: \_\_\_\_\_ Tel contato: \_\_\_\_\_

O objetivo deste estudo é o estudo da função endotelial em mulheres com câncer de mama sem tratamento endócrino e que estão em uso de terapia endócrina com tamoxifeno e inibidores da aromatase. A função endotelial, quando alterada, mostra um risco aumentado para a ocorrência de eventos como infarto do coração e derrame.

Será marcado um dia, pela manhã, no qual a participante deverá comparecer em jejum neste hospital. Neste dia, dois exames de ultra-sonografia serão realizados; um no pescoço e outro no braço com duração total aproximada de 20 minutos. Depois será medida a pressão arterial, o peso e a altura.

Durante o exame de ultra-sonografia do braço é usado um aparelho de medida de pressão arterial que será inflado por 5 minutos. Durante esse período pode ocorrer sensação de formigamento no braço, igual ao observado quando se dorme sobre o mesmo. A coleta de sangue será feita em veia do braço da maneira comum, com os mesmos desconfortos de qualquer exame de sangue.

Esta pesquisa não trará benefícios diretos para o participante, mas ajudará a entender melhor alguns aspectos do câncer de mama podendo, no futuro, contribuir para o tratamento de outras pessoas.

É direito do participante:

- Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Carolina Oliveira Nastri, que pode ser encontrado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, telefone 3602 1000.
- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- Direito de anonimato: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.
- Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da função endotelial em pacientes com câncer de mama em uso de tamoxifeno e inibidores de aromatase como terapia adjuvante”.

Eu discuti com a Dra. Carolina Oliveira Nastri sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

---

Participante

---

---

Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

---

Carolina O. Nastri – Pesquisadora Responsável

#### **FORMAS DE RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:**

Não haverá recompensa financeira para os voluntários controles e pacientes que participarem do estudo.

Quanto à indenização, esclarecemos que se trata de um projeto sem financiamento externo e que será desenvolvido com recursos próprios da Instituição. Assim sendo, não há uma previsão de seguro para cobertura de indenização. Neste sentido, este projeto não se diferencia dos outros que não contam com financiamento externo, e que ainda assim, são regularmente desenvolvidos sob responsabilidade do pesquisador e da Instituição correspondente.

Entretanto, em nenhum momento desconsidera-se o direito da paciente obter indenização por eventual dano que julgar pertinente.

**Anexo F** Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

---



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 01 de agosto de 2007

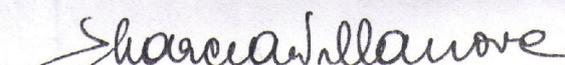
Ofício nº 2598/2007  
CEP/MGV

**Prezada Senhora,**

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA EM USO DE TAMOXIFENO E INIBIDORES DE AROMATASE COMO TERAPIA ADJUVANTE”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 251ª Reunião Ordinária realizada em 30/07/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5452/2007.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

  
**DR<sup>a</sup> MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**CAROLINA OLIVEIRA NASTRI**  
**PROF. DR. FRANCISCO CÂNDIDO DOS REIS (Orientador)**  
Depto. de Ginecologia e Obstetrícia

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)