



ANÁLISE IN VITRO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA SUBMETIDAS À ALTAS DOSES DE VITAMINA D

IN VITRO ANALYSIS OF MELANOMA CELL PROLIFERATION SUBJECTED TO HIGH DOSES OF VITAMIN D

Bruno Henrique Moraes¹, Gabriela Ruva Fagundes², Paulo Roberto Costa de Almeida², Mário Cezar Saffi Junior³, Felipe de Lara Janz^{4*}, Giovani Marino Fávero⁴

RESUMO: Objetivo: Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da vitamina D na proliferação e apoptose de células de melanoma. **Metodologia:** Para isso, a linhagem B16F10 foi tratada com diferentes concentrações de vitamina D por 13 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio MTT. A análise de variância Student One-Way (ANOVA), com o teste post-hoc de Tukey, foi utilizada para avaliar as variações significativas entre os conjuntos de dados. **Resultados:** A concentração 10 vezes maior que a fisiológica mostrou o efeito citotóxico mais pronunciado, seguida pelas concentrações de 20 e 1 vez. A sobrecarga de vitamina D levou à diminuição da viabilidade das células B16F10. **Conclusões:** As diferentes concentrações de vitamina D utilizadas neste estudo (200 ng/mL e 400 ng/mL) levaram a uma diminuição na viabilidade da linhagem celular de melanoma murino, já o efeito citotóxico foi observado através da redução da absorbância apresentada pelo método MTT.

PALAVRAS-CHAVE: Melanoma. Vitamina D. Raios Ultravioleta.

ABSTRACT: Aim: This study aimed to investigate the effects of vitamin D on the proliferation and apoptosis of melanoma cells. **Methodology:** For this purpose, the B16F10 cell line was treated with different concentrations of vitamin D for 13 hours. Then, cell viability was analyzed by the MTT assay. Student One-Way Analysis of Variance (ANOVA), with Tukey's post-hoc test, was used to evaluate significant variations between the data sets. **Results:** The concentration 10 times higher than the physiological one showed the most pronounced cytotoxic effect, followed by concentrations of 20 and 1 time. Vitamin D overload led to a decrease in the viability of B16F10 cells. **Conclusions:** The different concentrations of vitamin D used in this study (200 ng/mL and 400 ng/mL) led to a decrease in the viability of the murine melanoma cell line, while the cytotoxic effect was observed through the reduction in absorbance presented by the MTT method.

KEYWORDS: Melanoma. Vitamin D. Ultraviolet Rays.

¹ Farmacêutico, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa (PR), Brasil, ² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa (PR), Brasil, ³ Universidade Cesumar (UniCesumar), Maringa (PR), Brasil, ⁴ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa (PR), Brasil.

*Autor correspondente: Felipe de Lara Janz – Email: fljanz@uepg.br.

Recebido: 23 jul. 2024

Aceito: 16 set. 2024

Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Licença Creative Commons.



INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer de pele é influenciado por fatores genéticos e ambientais. Certos componentes hereditários, incluindo mutações genéticas, tipo de pele, pigmentação do cabelo e dos olhos, e deficiências nos mecanismos de reparo do DNA, podem predispor os indivíduos ao câncer de pele¹. Ambientalmente, a radiação ultravioleta (RUV) é um fator de risco significativo. A exposição crônica ou cumulativa à RUV perturba a melanogênese, induzindo um estado excitatório nos melanócitos, que podem se tornar neoplásicos^{2,3}. A RUV compromete os mecanismos de reparo do DNA, causa imunossupressão e gera espécies reativas de oxigênio (ERO), todos fatores que contribuem para a fotocarcinogênese⁴.

Apesar dos efeitos nocivos, a exposição à RUV também tem resultados benéficos, como a síntese de vitamina D. Este hormônio isoprenoide lipossolúvel passa por uma reação fotoquímica na pele mediada pela RUV, produzindo vitamina D3 (colecalfiferol). A vitamina D3 é biologicamente inativa até ser convertida enzimaticamente no fígado e nos rins em 1,25-diidroxicolecalciferol, um hormônio que regula o metabolismo do cálcio nos rins, intestinos e ossos^{5,6}. Importante destacar que a vitamina D demonstrou propriedades anticancerígenas devido à sua capacidade de inibir processos proliferativos neoplásicos^{7,8,9}.

A deficiência de vitamina D tem sido associada a um risco aumentado de desenvolvimento de várias doenças inflamatórias e crônicas, incluindo asma, doenças infecciosas e certos tipos de câncer. Estudos mostraram que níveis mais altos de vitamina D estão correlacionados com uma menor incidência de alguns tipos de câncer, sugerindo seu papel como fator profilático e seu potencial para oferecer um bom prognóstico⁵. Estudos *in vitro* indicaram que a vitamina D exerce efeitos antiproliferativos sobre células neoplásicas, induzindo genes pró-apoptóticos e antiproliferativos em cânceres como próstata, mama, cólon e leucemia³².

Quanto aos ensaios clínicos, os resultados sugeriram que melhorar o status da vitamina D por meio de maior exposição ao sol e suplementação pode reduzir o risco de câncer de próstata¹⁰. Em outro estudo, altos níveis de vitamina D melhoraram significativamente os resultados clínicos em mulheres brasileiras na pós-menopausa com câncer de mama¹¹. Estudos epidemiológicos realizados sobre o câncer colorretal forneceram forte suporte para a associação inversa entre o nível sérico de 25(OH)D e o risco de câncer de cólon tanto em homens quanto em mulheres¹².

Estudos clínicos também observaram que pacientes com melanoma frequentemente apresentam níveis séricos reduzidos de vitamina D3. Isso levou a sugestões de que a suplementação de vitamina D em altas doses após a remoção do tumor primário pode ser benéfica tanto para a prevenção quanto para o tratamento do melanoma^{13,14}. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina D pode modular o estresse oxidativo em células A375¹⁵ e inibir o crescimento de células de mieloma de maneira dependente de PTEN e do receptor de vitamina D (VDR)¹⁶.

Embora os benefícios potenciais da vitamina D na prevenção do câncer sejam promissores, as evidências ainda não são conclusivas. Os pesquisadores ainda estão investigando os níveis ideais de vitamina D para a prevenção do câncer e se a suplementação pode melhorar os resultados para pacientes com câncer. Doses altas de vitamina D, por exemplo, estão sendo estudadas em ensaios clínicos para determinar seus efeitos na desaceleração da progressão do câncer ou no aumento da eficácia dos tratamentos anticancerígenos³.

No contexto da promoção da saúde, aumentar a conscientização sobre a importância da vitamina D e incentivar a exposição segura ao sol, assim como o uso de suplementos, quando necessário,

é fundamental. No entanto, os indivíduos devem consultar profissionais de saúde antes de tomar doses altas de vitamina D, pois a ingestão excessiva pode levar a complicações de saúde⁴.

Com base nessas informações, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com vitamina D na proliferação de células de melanoma. Para isso, a linhagem celular B16F10 foi tratada com diferentes concentrações de vitamina D (1000 UI), e o ensaio MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo) foi utilizado para avaliar os efeitos citotóxicos.

MÉTODOS

CULTURA CELULAR

Células de melanoma murino, B16F10, foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e uma mistura antibiótica de penicilina/estreptomicina a 1% em uma concentração de 100 µg/mL. Um ambiente controlado em incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C foi mantido durante todo o processo de cultivo celular.

ENSAIO DE MTT

Para examinar os efeitos citotóxicos da vitamina D em células B16F10, o método MTT foi escolhido. As culturas celulares foram cultivadas em placas de 96 poços com 5x10⁴ células/poço e incubadas por 24 horas em 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, as células foram tratadas com vitamina D (1000 UI; obtida de farmácia de manipulação) em concentrações de 20, 200 e 400 ng/mL por 13 horas. Subsequentemente, 10 µL de reagente MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e incubados por mais 4 horas em incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As placas foram observadas ao microscópio para demonstrar a formação de cristais de formazan. Após a aspiração do meio de cultura contendo MTT, foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico. As absorbâncias foram medidas a 590 nm usando um espectrofotômetro Reader Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software PRISM 4. A análise de variância Student One-Way (ANOVA), com o teste post-hoc de Tukey (Diferença Honestamente Significativa), foi utilizada para avaliar as variações significativas entre os conjuntos de dados. Neste estudo, $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

O ensaio de viabilidade celular realizado, utilizando o método MTT, revelou que todas as concentrações testadas de vitamina D induziram citotoxicidade significativa em relação ao grupo controle, que foi ajustado para 100% de viabilidade. Notavelmente, a concentração de vitamina D em 10 vezes o nível fisiológico provocou o efeito citotóxico mais pronunciado. Isso foi seguido pelas concentrações em 20 e 1 vez o nível fisiológico (Figura 1).

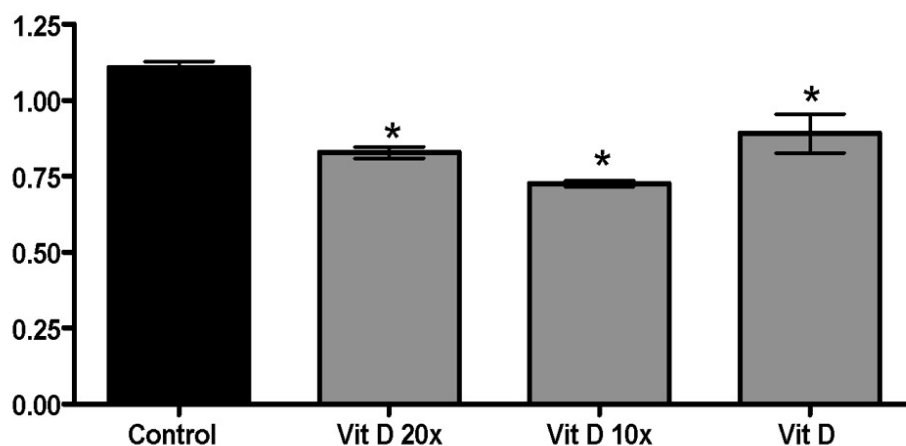


Figura 1. Análise da proliferação de células B16F10 tratadas com altas doses de vitamina D pelo ensaio MTT. As absorbâncias foram medidas a 590 nm utilizando um espectrofotômetro. A análise de variância Student One-Way (ANOVA), com teste post-hoc de Tukey, foi utilizada para avaliar as variações significativas. * $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo.

Fonte: os autores.

DISCUSSÃO

Atualmente, há um esforço constante para encontrar tratamentos eficazes e medidas profiláticas para a progressão do câncer. O desafio de proporcionar conforto e segurança aos pacientes por meio de tratamentos não invasivos e de fácil acesso continua sendo uma questão global^{17,18}. Nas últimas décadas, diversos autores sugeriram o uso potencial de sobrecarga de vitamina D para tratamento, estimulação terapêutica e contenção da progressão neoplásica^{19,20,21,22}.

Em um artigo de revisão de Brożyna e colaboradores (2020)⁸, foi demonstrado que altos níveis séricos de vitamina D estão relacionados a uma menor incidência de metástases. A vitamina D e seus derivados podem inibir a proliferação celular, um fenômeno observado em nosso estudo. Verificamos que o aumento da concentração do tratamento resultou em uma diminuição da concentração da linhagem celular. Esse fenômeno pode ser explicado por vários fatores. Como citado por Brożyna⁸, pode ser atribuído ao aumento da expressão de inibidores do ciclo celular, como p21 e p27, proteínas sinalizadoras como IGFBP3 e TGF- β , e a regulação negativa da via de sinalização hedgehog. A promoção da apoptose também foi associada à vitamina D e seus derivados pela regulação negativa das proteínas AKT e ERK e pela modulação de proteínas da família BCL2, incluindo BAX, BAK e BAD^{23,24,25,26}.

No presente estudo, foi observado um efeito inibidor na linhagem celular B16F10. Um estudo semelhante realizado por Wang e colaboradores (2020)²⁷, utilizando células de câncer de mama DT20, mostrou que a taxa de crescimento foi desacelerada com o aumento das concentrações de 1,25(OH)₂VitD3, apresentando efeito tóxico em doses acima de 10⁻⁷ M. Uma explicação para o crescimento celular prejudicado é a dificuldade na divisão e sobrevivência da linhagem celular em concentrações elevadas de tratamento, o que leva diretamente à produção de substâncias envolvidas na adesão e diferenciação celular. Esse processo pode influenciar o crescimento celular por meio do surgimento de novas proteínas^{28,29,30}.

Brożyna et al. (2020)⁸ também explicaram esse efeito devido à ação antitumoral da forma ativa da vitamina D, 1,25(OH)₂VitD3, por meio de seu efeito direto na proliferação celular, apoptose e

diferenciação, interferindo diretamente no ciclo celular e no crescimento da linhagem celular. Sutedja e colaboradores (2020)³¹ apontaram que tanto 1,25(OH)₂D₃ quanto 20(OH)D₃ podem inibir a proliferação de células cancerosas induzindo apoptose por meio do controle de ERO e da inibição de citocinas pró-apoptóticas e da expressão de genes pró-metastáticos.

A redução da viabilidade das células cancerosas também foi observada em um estudo de Hussein (2017)³², que avaliou a inibição de carcinoma de cabeça e pescoço (linhagem celular JHU-29) e encontrou uma diminuição dependente da dose na viabilidade celular com 1,25(OH)₂D₃. Li et al. (2021)³³ relataram o efeito inibitório de 1,25(OH)₂D₃ em várias linhagens celulares de câncer gástrico (MLN45, KATO III e MKN28). Enquanto o tratamento não teve efeito na linhagem celular MKN28, as outras duas linhagens mostraram inibição da viabilidade dependente da dose e diminuição na formação de colônias. Isso pode ser explicado pela ativação do receptor de vitamina D, que também aumenta de maneira dependente da dose.

Em concentrações de 400 ng/mL, houve um aumento na viabilidade da linhagem celular B16F10 em comparação com 200 ng/mL, embora ainda abaixo da concentração fisiológica de indivíduos adultos. Essa ação pode ser explicada pela adaptação celular ao aumento da concentração de vitamina D. Um estudo semelhante usando a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 por Diesing e colaboradores (2006)³⁴ demonstrou que a estimulação com sobrecargas de vitamina D₃ e 25-hidroxivitamina D₃ resultou em aumento da expressão de enzimas metabolizadoras de vitamina D. Isso indica que a linhagem celular pode regular a expressão, particularmente da 24-hidroxilase, proporcionando um efeito protetor contra os efeitos indutores de apoptose do calcitriol.

O uso de vitamina D para tratamento neoplásico é uma área promissora. Além de sua capacidade de inibir a proliferação celular e o ciclo celular, pode ser combinada com a quimioterapia para aumentar a eficácia terapêutica³⁵. Estudos já relacionaram sua capacidade de sensibilizar células malignas à radiação ionizante e à radiação de feixe de prótons, bem como a várias classes de quimioterápicos. Por exemplo, Maj e colaboradores (2018)³⁶ descobriram que adicionar tratamento com vitamina D ao Imatinibe e à cisplatina reduziu a inativação do análogo da vitamina D em tumores, aumentando sua disponibilidade. Da mesma forma, Alizadeh-Navaei e colaboradores (2019)³⁷ observaram que o tratamento combinado de vitamina D com 5-FU e cisplatina teve um alto efeito citotóxico nas linhagens celulares de câncer gástrico (AGS).

CONCLUSÃO

As diferentes concentrações de vitamina D utilizadas neste estudo (200 ng/mL e 400 ng/mL) levaram a uma diminuição na viabilidade da linhagem celular de melanoma murino. O efeito citotóxico foi observado através da redução da absorbância apresentada pelo método MTT. As potenciais aplicações desse tratamento são diversas, abrangendo desde o uso individual até tratamentos sinérgicos, bem como efeitos profiláticos e estabilização de neoplasias, resultando em um bom prognóstico para o paciente. No entanto, é importante destacar que nosso estudo possui limitações, pois foi realizado apenas *in vitro*, sendo necessários estudos adicionais em modelos animais. Outro fator limitante é o uso de doses elevadas de vitamina D, que podem promover efeitos citotóxicos em animais e humanos.

REFERÊNCIAS

1. Farré X, Blay N, Cortés B, Carreras A, Iraola-Guzmán S, de Cid R. Skin Phototype and Disease: A Comprehensive Genetic Approach to Pigmentary Traits Pleiotropy Using PRS in the GCAT Cohort. *Genes*. 2023; 14(1): 149. <https://doi.org/10.3390/genes14010149>.
2. Holm-Schou AS, Philipsen PA, Idorn LW, Thieden E, Wulf HC. Lifetime UVR Dose and Skin Cancer Risk, Determined by Their Common Relation to Solar Lentigines. *Anticancer Research*. 2020; 40(1): 557–564: <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13985>.
3. Jones OT, Ranmuthu CKI, Hall PN, Funston G, Walter FM. Recognising Skin Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*. 2020; 37(1):603–616. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01130-1>.
4. Parker ER. The influence of climate change on skin cancer incidence – A review of the evidence. *International Journal of Women's Dermatology*. 2021; 7(1):17. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.07.003>.
5. Ombra MN, Paliogiannis P, Doneddu V, Sini MC, Colombino M, Rozzo C, Stanganelli I, Tanda F, Cossu A, Palmieri G. Vitamin D status and risk for malignant cutaneous melanoma: recent advances. *European Journal of Cancer Prevention*. 2017; 26(6):532. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000334>.
6. Tuckey RC, Cheng CYS, Slominski AT. The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2019; 186(1):4. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.09.003>.
7. Trump DL, Deeb KK, Johnson CS. Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*. 2010; 16(1):1–9. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181c51ee6>.
8. Brożyna AA, Hoffman RM, Slominski AT. Relevance of Vitamin D in Melanoma Development, Progression and Therapy. *Anticancer research*. 2020; 40(1): 473. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13976>.
9. Ciężyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet Radiation and Chronic Inflammation—Molecules and Mechanisms Involved in Skin Carcinogenesis: A Narrative Review. *Life*. 2021; 11(4): 326. <https://doi.org/10.3390/life11040326>. 2.
10. M. Deschasaux, J.C. Souberbielle, P. LatinoMartel, A. Sutton, N. Charnaux, N. Druetne-Pecollo, et al. A prospective study of plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and prostate cancer risk. *British Journal of Nutrition*. 2016; 115(2): 305-314. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004353>.
11. de Sousa Almeida-Filho B, De Luca Vespoli H, Pessoa EC, Machado M, Nahas-Neto J, Nahas EAP. Vitamin D deficiency is associated with poor breast cancer prognostic features in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 174(1): 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.009>.

12. Lee JE, Li H, Chan AT, Hollis BW, Lee IM, Stampfer MJ, Wu K, Giovannucci E, Ma J. Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: the Physicians' Health Study and a meta-analysis of prospective studies. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4(5): 735-743. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0289>.
13. Slominski AT, Brożyna AA, Skobowiat C, Zmijewski MA, Kim TK, Janjetovic Z, Oak AS, Jozwicki W, Jetten AM, Mason RS, Elmets C, Li W, Hoffman RM, Tuckey RC. On the role of classical and novel forms of vitamin d in melanoma progression and management. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2018; 177:159-170. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.06.013>.
14. Muralidhar S, Filia A, Nsengimana J, Poźniak J, O'Shea SJ, Diaz JM, Harland M, Randerson-Moor JA, Reichrath J, Laye JP, van der Weyden L, Adams DJ, Bishop DT, Newton-Bishop J. Vitamin D-VDR Signaling Inhibits Wnt/ β -Catenin-Mediated Melanoma Progression and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Res*. 2019; 79(23):5986-5998. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
15. Muralidhar S, Filia A, Nsengimana J, Poźniak J, O'Shea SJ, Diaz JM, et al. Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. *Int J Oncol*. 2019; 54(4):1481-1495. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4725>.
16. Piotrowska A, Wierzbicka J, Rybarczyk A, Tuckey RC, Slominski AT, Żmijewski MA. Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. *Int J Oncol*. 2019;54(4):1481-1495. doi:10.3892/ijo.2019.4725
17. Warren MF, Livingston KA. Implications of Vitamin D Research in Chickens can Advance Human Nutrition and Perspectives for the Future. *Curr Dev Nutr*. 2021 Feb 25;5(5): nzab018. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzab018>.
18. Wiśniewska A, Szypowska A. The role of vitamin D in selected autoimmune diseases. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2021; 72(2):111-121. <https://doi.org/10.32394/rpzh.2021.0156>.
19. O'Shea SJ, Davies JR, Newton-Bishop JA. Vitamin D, vitamin A, the primary melanoma transcriptome and survival. *Br J Dermatol*. 2016; 175(2):30-34. <https://doi.org/10.1111/bjd.14919>.
20. Karatayli E, Stokes CS, Lammert F. Vitamin D in Preclinical Models of Fatty Liver Disease. *Anticancer Res*. 2020; 40(1):527-534. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13981>.
21. Kim H, Giovannucci E. Vitamin D Status and Cancer Incidence, Survival, and Mortality. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1268:39-52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_3.
22. Olabiyi A, Passos DF, Silva JG, Schetinger M, Leal D. Role of purinergic system and vitamin D in the anti-cancer immune response. *Life Sciences*. 2021; 287:120110. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120110>.
23. Colston KW, Perks CM, Xie SP, Holly JM. Growth inhibition of both MCF-7 and Hs578T human breast cancer cell lines by vitamin D analogues is associated with increased expression of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Mol Endocrinol*. 1998 20(1):157-62. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200157>.

24. Zhou X, Yang Y, Ma P, Wang N, Yang D, Tu Q, Sun B, Xiang T, Zhao X, Hou Z, Fang X. TRIM44 is indispensable for glioma cell proliferation and cell cycle progression through AKT/p21/p27 signaling pathway. *J Neurooncol.* 2019; 145(2):211-222. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03301-0>.
25. Liu X, Zhang Y, Zheng P, Cui N. Msi1 inhibits cervical cancer cell apoptosis by downregulating BAK through AKT signaling. *J Cancer.* 2021;12(8):2422-2429. <https://doi.org/10.7150/jca.52950>.
26. Deng, J., Gutiérrez, L.G., Stoll, G. et al. Paradoxical implication of BAX/BAK in the persistence of tetraploid cells. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 1039. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04321-3>
27. Wang L, Zhou S, Guo B. Vitamin D Suppresses Ovarian Cancer Growth and Invasion by Targeting Long Non-Coding RNA CCAT2. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7):2334. <https://doi.org/10.3390/ijms21072334>.
28. Posa F, Di Benedetto A, Cavalcanti-Adam EA, Colaianni G, Porro C, Trotta T, Brunetti G, Lo Muzio L, Grano M, Mori G. Vitamin D Promotes MSC Osteogenic Differentiation Stimulating Cell Adhesion and α V β 3 Expression. *Stem Cells Int.* 2018; 28:6958713. <https://doi.org/10.1155/2018/6958713>.
29. Xu S, Song J, Zhang ZH, Fu L, Gao L, Xie DD, Yu DX, Xu DX, Sun GP. The Vitamin D status is associated with serum C-reactive protein and adhesion molecules in patients with renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2019; 9(1):16719. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53395-9>.
30. Kelder C, Hogervorst JMA, Wismeijer D, Kleverlaan CJ, de Vries TJ, Bakker AD. Burst, Short, and Sustained Vitamin D3 Applications Differentially Affect Osteogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(9):3202. <https://doi.org/10.3390/ijms21093202>.
31. Sutedja EK, Arianto TR, Lesmana R, Suwarsa O, Setiabudiawan B. The Chemoprotective Role of Vitamin D in Skin Cancer: A Systematic Review. *Cancer Manag Res.* 2022; 14:3551-3565. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S389591>.
32. Hussein H. Effects of Vitamin D on Growth Inhibition of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. (In vitro study). *Al-Azhar Dental Journal for Girls.* 2017; 4, (4):381–384. <https://doi.org/10.21608/adjg.2017.5285>.
33. Li Q, Li Y, Jiang H, Xiao Z, Wu X, Zhang H, et al. Vitamin D suppressed gastric cancer cell growth through downregulating CD44 expression in vitro and in vivo. *Nutrition.* 2021; 91-92:111413. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111413>.
34. Diesing, D. et al. Vitamin D – Metabolism in the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Anticancer research*, 2006. <https://doi.org/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16886688/>.
35. Negri M, Gentile A, de Angelis C, Montò T, Patalano R, Colao A, Pivonello R, Pivonello C. Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients.* 2020 Jun 17;12(6):1798. <https://doi.org/10.3390/nu12061798>.

36. Maj E, Filip-Psurska B, Milczarek M, Psurski M, Kutner A, Wietrzyk J. Vitamin D derivatives potentiate the anticancer and anti-angiogenic activity of tyrosine kinase inhibitors in combination with cytostatic drugs in an A549 non-small cell lung cancer model. *Int J Oncol*. 2018; 52(2):337-366. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4228>.
37. Alizadeh-Navaei R, Saeedi M, Janbabaei G, Asgarian-Omran H, Kelidari H, Ahmadi-Ahangar M, et al. Role of vitamin D in the effectiveness of chemotherapeutic drugs on gastric cancer cell lines. *World Cancer Research Journal*. 2019; 6: e1259. https://doi.org/10.32113/wcrj_20194_1259.