



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Vitamina D3: Potencial modulador sobre a Mutagenicidade e a Carcinogenicidade induzida por Doxorrubicina em *Drosophila melanogaster* e sinergismo com fármacos em sistema *in vitro*

**Aluna:** Mirley Alves Vasconcelos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti / IBTEC-UFU

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Capelari Orsolin / UNIPAM

UBERLÂNDIA – MG

2020



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Vitamina D3: Potencial modulador sobre a Mutagenicidade e a Carcinogenicidade induzida por Doxorrubicina em *Drosophila melanogaster* e sinergismo com fármacos em sistema *in vitro*

**Aluna:** Mirley Alves Vasconcelos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Capelari Orsolin

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Genética e Bioquímica (Área: Genética)

UBERLÂNDIA – MG

2020



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Vitamina D3: Potencial modulador sobre a Mutagenicidade e a Carcinogenicidade induzida por Doxorrubicina em *Drosophila melanogaster* e sinergismo com fármacos em sistema *in vitro*

**Aluna:** Mirley Alves Vasconcelos

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

**Examinadores:**

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende / ICENP-UFU

Prof. Dr. Lucas Tadeu Andrade / UNICERP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lee Chen Chen / ICB-UFG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaise Gonçalves Araújo / IBTEC-UFU

**Data da Defesa:** 18/12/2020

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

V331 2020	<p>Vasconcelos, Mirley Alves, 1979- Vitamina D3: Potencial modulador sobre a Mutagenicidade e a Carcinogenicidade induzida por Doxorrubicina em <i>Drosophila melanogaster</i> e sinergismo com fármacos em sistema <i>in vitro</i> [recurso eletrônico] / Mirley Alves Vasconcelos. - 2020.</p> <p>Orientadora: Ana Maria Bonetti. Coorientadora: Priscila Capelari Orsolin. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.760">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.760</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Genética. I. Bonetti, Ana Maria ,1949-, (Orient.). II. Orsolin, Priscila Capelari,1986-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

**Palavras-chave:** Análise *in silico*, Chou-Talalay, Colecalciferol, Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), Teste de Tumor Epitelial (ETT)





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - 05/2020 - PPGGB.				
Data:	Dezoito de dezembro de dois mil e vinte.	Hora de início:	13:30h	Hora de encerramento:	17:45
Matrícula do Discente:	11623GBI001				
Nome do Discente:	Mirley Alves Vasconcelos				
Título do Trabalho:	Vitamina D3: Potencial modulador sobre a Mutagenicidade e a Carcinogenicidade induzida por Doxorrubicina em <i>Drosophila melanogaster</i> e sinergismo com diferentes fármacos em sistema <i>in vitro</i> .				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação, em Eucariotos, da Toxicidade, Mutagenicidade e Carcinogenicidade de compostos químicos: agente ativo e produtos formulados.				

Aos dezoito dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 13:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Profª. Drª. Lee Chen Chen, Prof. Dr. Lucas Tadeu Andrade, Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende, Profª. Drª. Thaise Gonçalves de Araújo e Profª. Drª. Ana Maria Bonetti, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Profª. Drª. Ana Maria Bonetti, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Ana Maria Bonetti, Presidente, em 18/12/2020, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Thaise Gonçalves de Araújo, Membro de Comissão, em 18/12/2020, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Alexandre Azenha Alves de Rezende, Professor(a) do Magistério Superior, em 18/12/2020, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Lee Chen Chen, Usuário Externo, em 18/12/2020, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Lucas Tadeu Andrade, Usuário Externo, em 18/12/2020, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2400484 e o código CRC FF674019.

*“A humildade é a chave que abre todas as portas.”*  
*(São Francisco de Assis)*

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta conquista à minha filha, **Yasmin Alves Vasconcelos**, e ao meu marido, **Hélio Alves Pereira**.*

*Dedico também ao meu saudoso ex-orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**. Gratidão a um verdadeiro Mestre.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus** e a **Nossa Senhora Aparecida**, por sempre me abençoarem, por terem me ajudado a levantar várias vezes ao longo destes quatro anos e seis meses, por terem colocado em meu caminho oportunidades e pessoas consideradas fundamentais para esta grande conquista.

Aos meus pais, **José Tomaz de Vasconcelos e Roméria das Dores Oliveira Vasconcelos**, pela educação simples, valiosa e necessária para a formação do meu caráter e da pessoa que sou hoje.

À minha filha, **Yasmin Alves Vasconcelos**, pelo carinho, doçura, sensibilidade e companheirismo. “Samin” espero ser um bom exemplo para você, assim como meus pais são para mim. Você é meu diamante rosa.

Ao meu marido, **Hélio Alves Pereira**, pelo consolo, incentivo e companheirismo incondicional. Obrigada pela grande ajuda nos momentos da minha ausência, principalmente, no que se refere aos cuidados com a nossa filha. A você, o meu amor eterno.

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti**, por ter aceitado orientar uma aluna que a senhora mal conhecia, pela confiança depositada, pela sensibilidade, por todas as contribuições que enriqueceram esta pesquisa e pelos ensinamentos ao longo de todo este tempo.

À minha coorientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Capelari Orsolin**, pela parceria desde a época do mestrado; por ter permanecido junto a mim em todos os momentos, inclusive naqueles mais difíceis; pelas valiosas contribuições que enriqueceram tanto esta pesquisa. Saiba que a “inversão de papéis” me proporcionou um grande aprendizado.

Ao meu coorientador “não oficial”, **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pela generosidade em compartilhar seus valiosos conhecimentos, pela disponibilidade

em dar suporte a esta pesquisa e às demais pesquisas do LABCIM (Laboratório de Citogenética e Mutagênese) e pelas sábias palavras que me nortearam nos momentos de dúvida. Por ter sido acolhida a mais de quatro anos, me considero parte de uma herança que o senhor recebeu do seu discípulo.

A todos os meus amigos do LABCIM; de modo especial à **Profª. Drª. Rosiane Gomes da Silva Oliveira**, a Rosi, por ter me encorajado em momentos que pensei que tudo iria desabar sobre a minha cabeça, pela amizade além dos portões da Instituição.

À doutoranda **Paula Marynella Alves Pereira de Lima**, pela contribuição imensurável a esta pesquisa, pela disposição em sempre ajudar ao próximo, por compartilhar suas experiências e seus conhecimentos, pelo otimismo e simplicidade. Você, Paulinha, é uma das melhores pessoas que eu já conheci, sem a sua contribuição eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Aos doutorandos, **Maria Paula Carvalho Naves** e **Victor Constante Oliveira**, pelas valiosas contribuições a esta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Nilson Nicolau-Júnior**, pela fundamental contribuição com a parte da bioinformática, que fortaleceram ainda mais os resultados.

À **Profª. Drª. Thaise Gonçalves Araújo**, pelo acesso ao Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e por ter norteado parte dos caminhos desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende**, **Prof. Dr. Lucas Tadeu Andrade**, **Profª. Drª. Lee Chen Chen** e **Profª. Drª. Thaise Gonçalves Araújo**, por terem aceitado tão gentilmente o convite e pelas sugestões a este trabalho.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**, pela relevante contribuição científica ao longo deste curso.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, **Janaina de Souza Mota**, pela gentileza, paciência, competência, bom-humor e pelo grande empenho em ajudar sempre.

Ao **Dr. Ulrich Graf** (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland) pelo fornecimento das linhagens mutantes *flare-3*, *multiple wing hairs* e *Oregon R* de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Bloomington *Drosophila* Stock Center**, da Universidade de Indiana nos Estados Unidos (USA), pelo fornecimento da linhagem mutante *wts* de *Drosophila melanogaster*.

## **APOIO FINANCEIRO**

Esta pesquisa foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios: Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM – Campus Patos de Minas), Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU - Campus Patos de Minas) e Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia (UFU - Campus Uberlândia).

Recebemos apoio financeiro dos seguintes Órgãos e Instituições:

- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior- CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG;
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU.



## LISTA DE ABREVIATURAS

53BP1	Proteína 1 de ligação a p53
Akt	Proteína quinase B
ALDH1	Proteína aldeído desidrogenases 1
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ATM	Gene de reparo
AZD2461	Inibidor de PARP de nova geração
BAX	Pró-apoptótica
BCL2	Proteína anti-apoptótica
B.O.D.	Bio-Oxygen Demand
BH	Mosca heterozigota balanceada
BL1	Basal 1
BL2	Basal 2
BPH-1	Linhagem celular proveniente de próstata de humano
<i>BRCA1</i>	Gene Breast cancer 1
<i>BRCA2</i>	Gene Breast cancer 2
C57BL	Células de camundongo
CD44 <sup>+</sup>	Glicoproteína transmembranar
CI	Índice de combinação
CSC	Célula-tronco cancerosa
DCIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
<i>CYP12B2</i>	Gene que codifica o citocromo P450, família 12, subfamília B, polipeptídeo 2
<i>CYP2R1</i>	Gene que codifica o citocromo P450, família 2, subfamília R, polipeptídeo 1
<i>CYP24A1</i>	Gene que codifica o citocromo P450, família 24, subfamília A, polipeptídeo 1
<i>CYP27B1</i>	Gene que codifica o citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1
DM	Dinâmica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DRI	Índice de redução de dose
DSB	Quebra da fita dupla do DNA
DXR	Doxorrubicina
EcR	Receptor de ecdisona
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de estrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio

ETT	Teste de Tumor Epitelial
<i>fa</i>	Fração de inibição
FDA	Food and Drug Administration
<i>flr</i>	Pelo <i>flare</i>
<i>flr<sup>3</sup></i>	Alelo <i>flare-3</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>
gBRCAm	Linhagem germinativa mutante
HB	Cruzamento de alta bioativação
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
HRD	Recombinação homóloga deficiente
HRR	Reparo por recombinação homóloga
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
IDC	Carcinoma ductal invasivo
IM	Imunomodulador
LAR	Receptor de andrógeno luminal
<i>LATS1</i>	Gene supressor de tumor
LCIS	Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
M	Mesenquimal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MCF 10A	Linhagem celular de mama não neoplásica
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama triplo negativa
MG63	Linhagem de osteossarcoma
MH	Mosca trans-heterozigota marcada
MSL	Tronco-like mesenquimal
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Reagente 3- [4,5-dimetiltiazole-2-il] 2,5-difeniltetrazólio
<i>mwh</i>	Pelo <i>multiple wing hair</i>
<i>mwh/mwh</i>	Linhagem <i>multiple wing hairs</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NHEJ	Junção final não homóloga alternativa
NPT	Número de partículas, pressão e temperatura constantes
NVT	Número de partículas, volume e temperatura constantes
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORR	Linhagem <i>Oregon R</i> , <i>flr3</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>
P38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio p38
PAR	Poli Adenosina Difosfato Ribose
PARP	Poli Adenosina Difosfato Ribose Polimerase
PARPi	Inibidor de PARP
P-gp	Glicoproteína P
PgR	Receptor de progesterona
PKC $\alpha$	Proteína quinase C alfa
<i>RAD50</i>	Gene de reparo de quebra de fita dupla

RAD51	Proteína de reparo de recombinação homóloga
RMSD	Desvio médio quadrático da raiz da proteína
RXR	Receptor X retinóide
SARS-CoV-2	Novo coronavírus
SMART	Teste de Mutação e Recombinação Somática
SSB	Quebra da fita simples do DNA
ST	Cruzamento padrão
SUM149PT	Linhagem de câncer de mama
TIP3P	Potenciais intermoleculares transferíveis 3P
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TM3/ <i>Bd<sup>S</sup></i>	Cromossomo balanceador
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
U2OS	Linhagem de osteossarcoma
USP	Ultraspiracle
UV-B	Radiação ultra-violeta B
VD3	Vitamina D3
VDR	Receptor de vitamina D3
RXR	Receptor X retinóide
WTS	Gene supressor de tumor

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de <i>Drosophila melanogaster</i> na progênie heterozigota marcada (MH) e heterozigota balanceada (BH) resultante do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico de larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo).....	<b>41</b>
<b>Tabela 2</b>	Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de <i>Drosophila melanogaster</i> na progênie heterozigota marcada (MH) e heterozigota balanceada (BH) resultante do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo).....	<b>44</b>
<b>Tabela 3</b>	Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em <i>Drosophila melanogaster</i> após tratamento crônico das larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo).....	<b>48</b>
<b>Tabela 4</b>	Valores calculados da IC <sub>50</sub> para os compostos Vitamina D3 (VD3 - μM), AZD2461 (AZD - μM) e Doxorubicina (DXR - μM). Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas e a viabilidade avaliada pelo método MTT em linhagem celular de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231) e linhagem celular de mama não neoplásica (MCF 10A).....	<b>59</b>
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros de dose-efeito e resumo dos resultados com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - μM), AZD2461 (AZD - μM) e Doxorubicina (DXR - μM) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB -231). Tratamentos únicos foram realizados por 24 e 48 horas.....	<b>60</b>
<b>Tabela 6</b>	Resumo dos resultados do método Chou-Talalay com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - μM) e AZD2461 (AZD - μM) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), após 48 horas de tratamento com combinações binárias.....	<b>66</b>
<b>Tabela 7</b>	Resumo dos resultados do método Chou-Talalay com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - μM) e Doxorubicina (DXR - μM) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), após 48 horas de tratamento com combinações binárias.....	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Metabolismo sistêmico da Vitamina D3.....	<b>03</b>
<b>Figura 2</b>	Regulação transcricional mediada pelo complexo [1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ]-VDR.....	<b>05</b>
<b>Figura 3</b>	Fases da Carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.....	<b>08</b>
<b>Figura 4</b>	Reparo da quebra de fita simples de DNA (SSB) e proteção da forquilha de replicação por PARP1. (A) PARP1 atua como um sensor de SSBs, promovendo recrutamento de estruturas e proteínas para reparo e preenchimento da fita de DNA. (B) PARP1 restaura a forquilha de replicação danificada por meio da reversão desta forquilha ou pela recombinação homóloga (HR).....	<b>13</b>
<b>Figura 5</b>	Letalidade sintética entre inibidores de PARP (PARPi) e recombinação homóloga deficiente. Os PARPi promovem estabilidade do complexo PARP-DNA resultando em impedimento da replicação e do reparo da fita simples do DNA, além de induzir quebra da fita dupla do DNA (DSB). As DSBs são reparadas por recombinação homóloga, mas em casos de deficiência desse reparo, por mutações no <i>BRCA1/2</i> , haverá um colapso na forquilha de replicação.....	<b>14</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura química do AZD2461 (A) e do AZD2281 (B).....	<b>16</b>
<b>Figura 7</b>	<i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Fêmea e (B) macho, com pente sexual em destaque.....	<b>17</b>
<b>Figura 8</b>	Larva de <i>Drosophila melanogaster</i> com discos imaginais. Boca (mh), discos imaginais dos olhos (ed); discos imaginais das asas (wd); discos imaginais das pernas (ld); discos imaginais das antenas (ad); cérebro (b); gônadas (gd); nervo (Bn) e talo ótico (os).....	<b>19</b>
<b>Figura 9</b>	Principais vias convergentes para o crescimento descontrolado de células epiteliais de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 10</b>	Olhos de <i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Olho sem manchas mutantes. (B) Olho com grande mancha mutante.....	<b>21</b>
<b>Figura 11</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Pelos selvagens; (B) Pelos resultantes de alteração genética.....	<b>21</b>
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Pelos multiple wing hair ( <i>mwh</i> ). (B) Pelos flare ( <i>flr</i> ).....	<b>22</b>

<b>Figura 13</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Mancha simples pequena, com pelos <i>multiple wing hair</i> ( <i>mwh</i> ). (B) Mancha simples grande, com pelos <i>mwh</i> . (C) Mancha gêmea, com pelos <i>mwh</i> e <i>flare</i> ( <i>flr</i> ).....	<b>23</b>
<b>Figura 14</b>	Esquema simplificado da interação da Doxorubicina (DXR) com tumores em células cardíacas.....	<b>24</b>
<b>Figura 15</b>	Expressão de tumor epitelial (setas) em <i>Drosophila melanogaster</i> . Na cabeça (A), no olho (B), no corpo (C), na asa (D), na perna (E) e nos halteres (F).....	<b>25</b>
<b>Figura 16</b>	Fórmula estrutural da Vitamina D3 (A), AZD2461 (B) e Doxorubicina (C).....	<b>28</b>
<b>Figura 17</b>	Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> . (A) Asas de descendente trans-heterozigoto marcado (MH: <i>mwh</i> +/ <i>flr</i> <sup>3</sup> ). (B) Asas de descendente heterozigoto balanceado (BH: <i>mwh</i> +/ <i>TM3</i> , <i>Bd</i> <sup>S</sup> ).....	<b>30</b>
<b>Figura 18</b>	Taxa de sobrevivência (%) de indivíduos resultantes dos cruzamentos ST e HB após exposição a diferentes concentrações de (A) VD3 (Vitamina D3 - mM) isolada; (B) VD3 em combinação com DXR (Doxorubicina - 0,4 mM). CS: Controle Solvente (Tween 80 a 1% + etanol a 3%); CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (DXR - 0,4 mM) .....	<b>39</b>
<b>Figura 19</b>	Taxas de sobrevivência (%) de indivíduos resultantes do ETT após exposição a diferentes concentrações de (A) VD3 (vitamina D3 - mM) isoladamente; (B) VD3 em combinação com DXR (doxorubicina - 0,4 mM). CS: Controle Solvente (1% de Tween + 3% de etanol); CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (DXR - 0,4 mM) .....	<b>47</b>
<b>Figura 20</b>	Modelagem e <i>docking</i> molecular entre: (A) calcitriol (vitamina D ativa) e seu receptor VDR e em (B) calcitriol e o receptor de ecdisona (EcR).....	<b>52</b>
<b>Figura 21</b>	Representação 2D de interações ligante-proteína: (A) Calcitriol e receptor VDR; (B) Calcitriol e o receptor de ecdisona (EcR). Interações hidrofóbicas ( <b>lilás</b> ); ligações de hidrogênio ( <b>verde</b> ) e interações desfavoráveis ( <b>vermelho</b> ).....	<b>52</b>
<b>Figura 22</b>	Simulação da dinâmica molecular entre calcitriol e proteínas. (A) Estabilidade proteica, VDR e EcR; (B) ligações de hidrogênio entre calcitriol e proteínas; (C) Energia entre ligante e proteínas.....	<b>53</b>
<b>Figura 23</b>	Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com VD3, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>54</b>

<b>Figura 24</b>	Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com AZD2461, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto químico foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>56</b>
<b>Figura 25</b>	Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com DXR, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto químico foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>58</b>
<b>Figura 26</b>	Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação <b>VD3 + AZD2461</b> em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>61</b>
<b>Figura 27</b>	Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação <b>VD3 + DXR</b> em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>63</b>
<b>Figura 28</b>	Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação <b>AZD2461 + DXR</b> em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas.....	<b>64</b>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>03</b>
1.1 VITAMINA D3 (VD3)	03
1.1.1 Estrutura e metabolismo sistêmico da VD3	03
1.1.2 Efeitos sistêmicos da VD3	04
1.2 O CÂNCER	07
1.2.1 O câncer de mama	09
1.3 INIBIDORES DE PARP	12
1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> : ORGANISMO MODELO NO ESTUDO DO CÂNCER	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1 AGENTES QUÍMICOS	28
3.2 ESTOQUES DE <i>Drosophila melanogaster</i>	29
3.3 TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART) EM ASAS DE <i>Drosophila melanogaster</i>	29
3.3.1 Cruzamentos e tratamentos	29
3.3.2 Análise das asas	31
3.3.3 Análise estatística	31
3.4 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT) EM <i>Drosophila melanogaster</i>	32
3.4.1 Cruzamentos e tratamentos	32
3.4.2 Análise das moscas	33
3.4.3 Análise estatística	33
3.5 ANÁLISE <i>in silico</i>	33
3.5.1 Modelagem e <i>docking</i> molecular	33
3.5.2 Simulação da dinâmica molecular (DM)	34
3.6 ANÁLISE <i>in vitro</i>	34
3.6.1 Linhagens celulares	34
3.6.2 Viabilidade celular após tratamentos com os compostos isolados	35
3.6.2.1 Análise estatística	36
3.6.3 Determinação dos parâmetros de dose-efeito para cada composto isolado	36
3.6.4 Cálculo do Índice de Combinação (CI) pelo método Chou-Talalay	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
4.1 TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART) EM ASAS	39



4.2 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT) .....	47
4.3 ANÁLISE <i>in silico</i> .....	51
4.4 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR .....	54
4.5 PARÂMETROS DE DOSE-EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS EM LINHAGEM TNBC .....	59
4.6 ANÁLISE DE INTERAÇÕES FARMACODINÂMICAS .....	61
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>ANEXO 1</b> .....	97

## RESUMO

A deficiência de Vitamina D3 (VD3) favorece danos ao DNA, enquanto a suplementação, dependendo da dose, pode induzir atividade pró-oxidante, tumores e prevenir infecções virais. Os objetivos desse estudo foram investigar o potencial mutagênico e carcinogênico da VD3 isolada ou em combinação com Doxorrubicina (DXR) por meio do Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas e do Teste de Tumor Epitelial (ETT), ambos em *Drosophila melanogaster*. Além disso, avaliar se ocorre sinergismo entre VD3 e o inibidor de PARP AZD2461 e entre VD3 e DXR, em linhagem celular humana de câncer de mama MDA-MB-231. Os resultados revelaram que, em *Drosophila melanogaster*, a VD3 isolada não aumentou a frequência de manchas mutantes, mas reduziu a frequência das manchas quando coadministrada com DXR. Além disso, a VD3 não alterou o efeito recombinogênico da DXR em ambos os cruzamentos (ST e HB). A VD3 isolada não aumentou a frequência total dos tumores epitelial em *D. melanogaster*, mas reduziu significativamente a frequência total do tumor quando coadministrada com DXR. A modelagem e a dinâmica moleculares entre calcitriol e receptor de ecdisona (EcR) mostraram interação estável, indicando a possibilidade de transdução de sinal entre VD3 e EcR. O método de Chou-Talalay revelou, entre as combinações binárias VD3 + AZD2461 e VD3 + DXR, interações aditivas e sinérgicas com doses reduzidas desses compostos e efeito moderado/alto contra a linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama humano. Em conclusão, sob as condições experimentais dessa investigação e no material biológico testado, a VD3 mostrou efeitos moduladores sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade induzida por DXR em células somáticas de *D. melanogaster* e revelou interações satisfatórias com o EcR. Além disso as combinações da VD3 com AZD2461 ou com DXR, potencialmente sinérgicas, podem representar uma estratégia promissora no tratamento do câncer de mama triplo-negativo.

**Palavras-chave:** Análise *in silico*, Chou-Talalay, Colecalciferol, Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), Teste de Tumor Epitelial (ETT)

## ABSTRACT

Vitamin D3 (VD3) deficiency favors DNA damage, while supplementation, depending on the dose, can induce pro-oxidant activity, tumors and prevent viral infections. The objectives of this study were to investigate the mutagenic and carcinogenic potential of VD3 alone or in combination with Doxorubicin (DXR) through the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in wings and the Epithelial Tumor Test (ETT), both in *Drosophila melanogaster*. In addition, to assess whether synergism occurs between VD3 and the PARP AZD2461 inhibitor and between VD3 and DXR, in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. The results revealed that, in *Drosophila melanogaster*, VD3 alone did not increase the frequency of mutant spots, but reduced the frequency of mutant spots when co-administered with DXR. In addition, VD3 did not alter the recombinogenic effect of DXR in both crosses (ST and HB). VD3 alone did not increase the total frequency of tumor in *D. melanogaster*, but significantly reduced the total frequency of tumor when co-administered with DXR. The molecular modeling and dynamics between calcitriol and Ecdysone Receptor (EcR) showed a stable interaction, indicating the possibility of signal transduction between VD3 and EcR. The Chou-Talalay method revealed, between the binary combinations VD3 + AZD2461 and VD3 + DXR, additive and synergistic interactions with reduced doses of the compounds and moderate/high effect against the cell line MDA-MB-231 strain of human breast cancer. In conclusion, in the experimental conditions of this investigation and in the biological material tested, VD3 showed modulating effects on the mutagenicity and carcinogenicity induced by DXR in somatic cells of *D. melanogaster* and exhibited satisfactory interactions with the EcR. In addition, combinations of VD3 with AZD2461 or DXR, potentially synergistic, may represent a promising strategy in the treatment of triple-negative breast cancer.

**Keywords:** *In silico* analysis, Chou-Talalay, Cholecalciferol, Somatic Recombination and Mutation Test (SMART), Epithelial Tumor Test (ETT)

# 1 INTRODUÇÃO

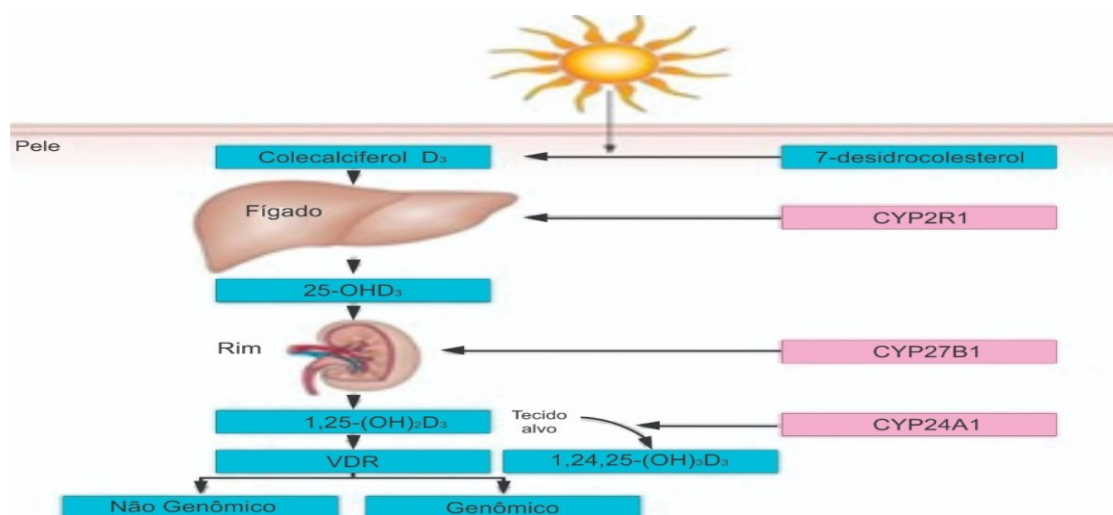
## 1.1 VITAMINA D3 (VD3)

### 1.1.1 Estrutura e metabolismo sistêmico da VD3

O colecalciferol, também conhecido como vitamina D3 (VD3), é um hormônio esteroide derivado do colesterol (secosteroide), semelhante às moléculas lipídicas que compõem a membrana celular (MOKHTARI; HEKMATDOOST; NOURIAN, 2017). A VD3 é, tradicionalmente, reconhecida como uma substância importante para a manutenção da homeostase sérica do cálcio e a mineralização óssea (ABDELGHANY *et al.*, 2016). O cálcio exerce um efeito recíproco na produção do pré-hormônio calcidiol [25(OH)D<sub>3</sub>] no fígado e calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] no rim, que corresponde à forma biologicamente ativa da VD3 (JEON e SHIN, 2018; ALMAIMANI *et al.*, 2019; EL-BOSHY *et al.*, 2019). Woo e Eide (2010) relatam a necessidade de uma exposição de cinco a trinta minutos ao sol do meio-dia, pelo menos duas vezes por semana, para uma síntese adequada de VD3.

A radiação UV-B converte 7-desidrocolesterol na pele em pré-vitamina VD3. No fígado, esse pré-hormônio é convertido em calcidiol pela ação da calcidiol-25-hidroxilase e, nos rins, o calcidiol é convertido em calcitriol pelo calcidiol -1-hidroxilase (Figura 1); enzimas da família do citocromo e são codificadas pelos genes *CYP2R1* e *CYP27B1*, respectivamente (JEON e SHIN, 2018).

**Figura 1.** Metabolismo sistêmico da Vitamina D3



Fonte: Adaptação de Fathi *et al.* (2019).

### 1.1.2 Efeitos sistêmicos da VD3

Em humanos, a VD3 está relacionada ao desenvolvimento de terapias contra doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (SAUL *et al.*, 2019), além de reduzir o risco de infecções virais (GOMBART; PIERRE; MAGGINI, 2020). Estudos científicos recentes sugerem que a suplementação adequada de VD3 pode aumentar a resistência ao novo coronavírus (SARS-CoV-2), o agente causador da COVID-19 (Doença do Coronavírus 2019) na atual pandemia (WANG *et al.*, 2020). A suplementação de VD3 pode ser uma medida útil para reduzir o risco de infecções do trato respiratório e atuar como uma opção terapêutica adicional para o tratamento contra esse novo vírus (GRANT *et al.*, 2020; ZHANG e LIU, 2020).

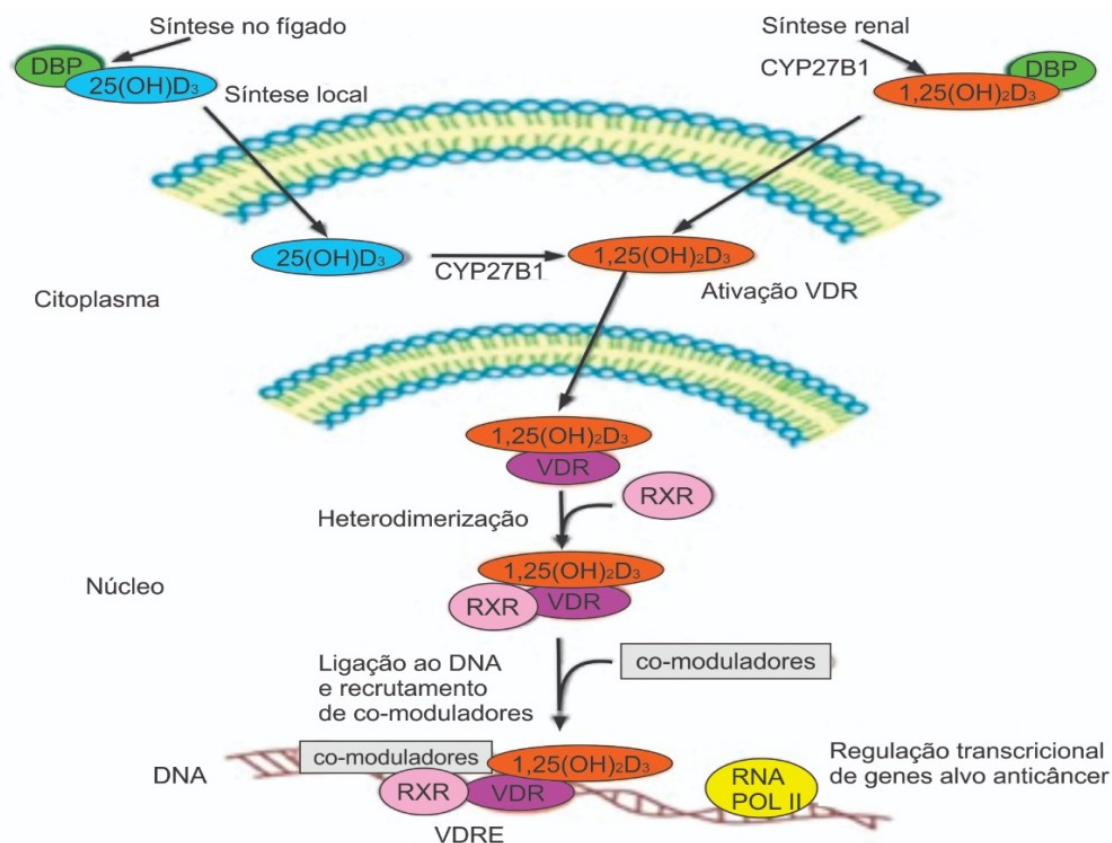
Estudos anteriores, que apoiam o papel da VD3 na redução do risco da COVID-19, indicam que o surto ocorreu no inverno, quando as concentrações de 25(OH)D<sub>3</sub> são baixas e, mais importante, verificaram que VD3 contribui para amenizar a síndrome do desconforto respiratório agudo. De fato, os níveis de VD3 mostraram-se severamente baixos na população de mais idade, especialmente na Espanha, Itália e Suíça, sendo os idosos o grupo mais vulnerável à COVID-19. Recomenda-se que as pessoas em risco, sob orientação médica, considerem uma ingestão de 10.000 U de VD3 por algumas semanas, para aumentar os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> (GRANT *et al.*, 2020; ILIE, STEFANESCU, SMITH, 2020).

Os benefícios gerados pela VD3 resultam de mecanismos de sinalização entre esta vitamina e um receptor nuclear VDR (receptor de Vitamina D) altamente específico (GRZESIAK *et al.*, 2019). Após a ligação ao calcitriol, o VDR é heterodimerizado pelo receptor X retinóide (RXR) e moduladores para a transcrição de genes-alvo, como o *CYP24A1* (BUNCH *et al.*, 2019). Assim, o complexo [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]-VDR está vinculado ao controle da expressão gênica, podendo mediar patologias como o câncer de mama humano (HUSS *et al.*, 2019), conforme Figura 2.

Estudos revelam que a expressão do VDR está relacionada a eventos antitumorais em diferentes tecidos (GHARBARAN *et al.*, 2019; SHAKER e SENOUSY, 2019; DESANTIS *et al.*, 2020). Vários são os mecanismos anticâncer, os quais dependem da sinalização da VD3: (i) indução de apoptose, (ii) efeitos anti-proliferativos, (iii) efeitos anti-inflamatórios, (iv) estimulação da diferenciação, (v) inibição da angiogênese e (vi) inibição de invasão e metástase (FATHI *et al.*, 2019).

Outras pesquisas, no entanto, relataram que a suplementação excessiva de VD3 pode apresentar efeitos potencialmente prejudiciais ao organismo (OWENS *et al.*, 2017), incluindo alterações nas vias reguladoras do ciclo celular (SAKAKI *et al.*, 2014; IRVING *et al.*, 2015) e a pró-oxidação (KOREN *et al.*, 2001; HALHALI *et al.*, 2010).

**Figura 2.** Regulação transcricional mediada pelo complexo [1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]-VDR



**Fonte:** Adaptação de Fathi *et al.* (2019).

Estudos descrevem o efeito protetor que a VD3 exerce sobre a molécula de DNA. Pawlowska, Wysokinski e Blasiak (2016) relataram a atuação da forma ativa da VD3 na remoção de lesões do DNA induzidas pela radiação ultravioleta em células pré-cancerosas. Este reparo é conhecido como excisão de nucleotídeos, no qual ocorre redução do processo de nitrosilação das enzimas de reparo do DNA e aumento dos níveis de P53. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Felton *et al.* (2016) que associaram a exposição ao sol de pessoas com pele clara, à ocorrência de danos reduzidos ao DNA; decorrente da ação protetora da VD3 nessas pessoas.

Ting *et al.* (2012) mostraram na linhagem BPH-1, proveniente de próstata de humano, o efeito anticarcinogênico exercido pela sinalização da VD3, com a indução dos genes de reparo *ATM* e *RAD50* após quebra da fita dupla pela ação das espécies reativas de oxigênio (EROS). Machado *et al.* (2016) mostram que, em situações de deficiência da VD3, há ocorrência significativa de micronúcleos em células da medula óssea e do sangue periférico de ratos hipertensos e aumento de danos no DNA, além da indução de EROS.

Além da ação da VD3 em mecanismos de reparo do DNA, estudos demonstraram que esta vitamina exerce proteção ao DNA atuando na regulação do estresse oxidativo. Mokhtari, Hekmatdoost e Nourian (2017) relatam a atuação da VD3 na supressão do complexo enzimático NADPH oxidase, que age na formação de EROS. Além disso, a VD3 induz a expressão de moléculas envolvidas na defesa antioxidante, como a glutatona e a glutatona peroxidase (KANIKARLA-MARIE e JAIN, 2016).

A VD3, no entanto, em diferentes situações, pode assumir comportamento pró-oxidante. Koren *et al.* (2001) relatam que essa vitamina aumenta o impacto de agentes oxidantes, como os superóxidos gerados pelo metabolismo da adriamicina e, também, de EROS produzidas pela respiração aeróbica. Esse impacto ocorre por meio da oxidação da glutatona e da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, além da redução da enzima superóxido dismutase, induzida pela VD3.

Outros estudos relatam a atuação da VD3 na indução de vias apoptóticas, como mostraram Li *et al.* (2005) que associaram esta vitamina à inibição do crescimento e à indução da apoptose em linhagem de câncer de mama MCF-7, perante a ativação da via p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitogênio p38). Em consonância, Santos *et al.* (2018) relacionaram a VD3 à redução da viabilidade celular e à indução da apoptose em linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, diante da inibição de enzimas e genes glicolíticos, além da regulação negativa das vias mTOR (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e AMPK (Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina).

Perante isto, a VD3 pode contribuir para a redução do tumor por meio de diferentes vias, seja efetuando o reparo do DNA, regulando o estresse oxidativo ou

até mesmo induzindo vias apoptóticas e, assim, controlando a progressão do câncer.

## 1.2 O CÂNCER

O câncer é uma neoplasia maligna que a tempos vem alarmando a população diante do elevado número de casos que resultam em óbito. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo que a maior porcentagem está relacionada aos países de baixa e média renda. Os dados disponibilizados pela OMS, por meio da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, apontaram que em 2018, em todo mundo 9,6 milhões de pessoas morreram vítimas do câncer, sendo que os maiores índices foram de: pulmão (1,76 milhão), colorretal (862.000), estômago (783.000), fígado (782.000) e mama (627.000) (WHO, 2020).

Atualmente, o câncer é intitulado como a “doença do genoma”, uma vez que se trata de uma patologia decorrente da instalação de clones de células que possuem alterações no seu material genético (GARRAWAY e LANDER, 2013). Stratton, Campbell e Futreal (2009) relataram diferentes eventos que podem ocorrer no genoma e, portanto, serem responsáveis pela origem das células cancerígenas: (i) substituição de nucleotídeos; (ii) inserções ou deleções de segmentos de DNA; (iii) rearranjos cromossômicos; (iv) alteração no número de cópias de genes; (v) aquisição, por fontes exógenas, de novas sequências de DNA (TALBOT e CRAWFORD, 2004); (vi) mutações somáticas em genomas mitocondriais (CHATTERJEE; MAMBO; SIDRANSKY, 2006), e (vii) mudanças epigenéticas que alteram a estrutura da cromatina e a expressão dos genes, sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA.

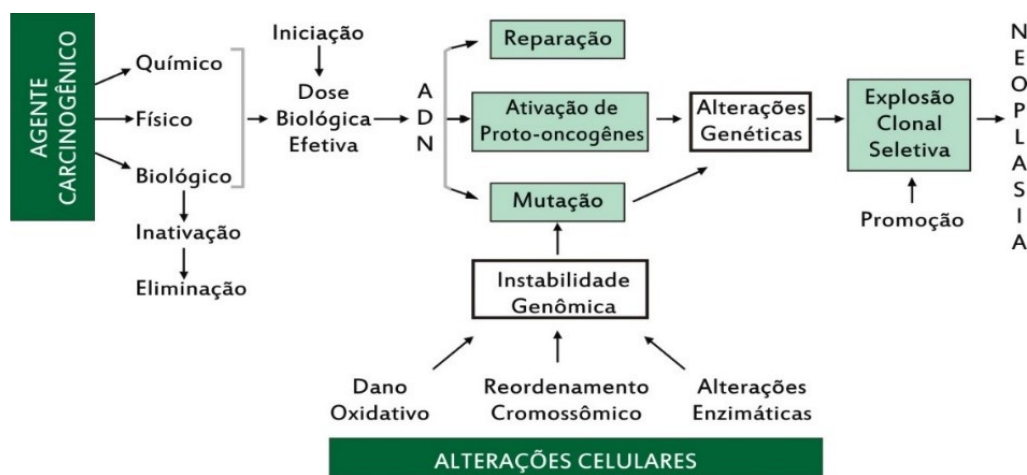
O ciclo celular de uma célula não neoplásica ocorre pela regulação de diferentes genes, (1) os proto-oncogenes que codificam proteínas, denominadas fatores de crescimento, responsáveis por induzirem células em repouso a se dividirem e, em alguns casos, a se diferenciarem; (2) os genes supressores de tumor, que codificam proteínas que, normalmente, regulam negativamente a divisão celular e (3) genes de reparo de danos ao DNA, que impedem o acúmulo de mutações ao longo dos tempos (NELSON e COX, 2019). Em adição, os genes



apoptóticos e antiapoptóticos também contribuem para a regulação do ciclo celular (BRASILEIRO FILHO, 2018).

A exposição celular a agentes carcinogênicos pode resultar em alterações nos genes supracitados, levando-os a deixarem de desempenhar suas funções regulares no ciclo celular; situação favorável para a carcinogênese (GRIFFITHS *et al.*, 2016). O processo de formação do câncer se resume em três fases: (i) iniciação, quando o agente carcinogênico induz alterações genéticas permanentes nas células; (ii) promoção, a célula inicial anormal é estimulada a proliferar, amplificando o clone transformado e (iii) progressão, com proliferação do clone transformado, crescimento tumoral, origem de células com potencial metastatizante e desenvolvimento da neoplasia maligna em sítios distantes da sua origem, como mostra a Figura 3 (BRASILEIRO FILHO, 2018).

**Figura 3.** Fases da Carcinogênese: iniciação, promoção e progressão



Fonte: INCA, 2002.

A proliferação celular descontrolada representa a essência da doença neoplásica; pois, medeia condições para a tumorigênese. Estudos apontam que os tumores apresentam extensa heterogeneidade celular e molecular; sendo compostos por 0,1 a 0,8% de células-tronco cancerosas (CSCs), também conhecidas como células iniciadoras de tumor (GARRAWAY e LANDER, 2013; KONRAD *et al.*, 2017).

Os mecanismos responsáveis pela origem das CSCs são diversos: (i) fusão celular, (ii) mutações em células-tronco normais, (iii) desdiferenciação celular e (iv) reprogramação metabólica (ATASHZAR *et al.*, 2020).

Estudos relatam que as CSCs estão presentes em quase todos os tipos de cânceres e são consideradas ameaçadoras; pois são autorrenováveis e possuem rápida diferenciação (CHEN *et al.*, 2012; NIMMAKAYALA, BATRA, PONNUSAMY, 2019). Essas características das CSCs, tendem a contribuir para a formação, progressão, invasão e metástase do tumor; bem como a quimiorresistência, radiorresistência e, conseqüentemente, a recorrência do câncer (ALMANAA, GEUSZ, JAMASBI, 2013; CIOFFI *et al.*, 2015; ABBASZADEGAN *et al.*, 2017).

Em recente estudo, foi mencionado que as CSCs apresentam fenótipos instáveis, associados ao microambiente em que essas células se encontram e, assim, a identificação de biomarcadores, que se manifestam em conformidade com a categoria e a fase do tumor tem sido uma potente ferramenta para diagnóstico e tratamento do câncer associado ao fenótipo de CSC (ATASHZAR *et al.*, 2020).

Estudos apontaram a glicoproteína transmembranar CD44<sup>+</sup> como um biomarcador, dentre outros, para identificação e diagnóstico de CSC em alguns tipos de câncer, dentre eles o câncer de mama (LI *et al.*, 2007; PRINCE *et al.*, 2007; ATASHZAR *et al.*, 2020). O mesmo ocorre com as proteínas da família aldeído desidrogenase, ALDH1, que também são consideradas biomarcadores de CSC de câncer de mama (TSANG *et al.*, 2012).

### 1.2.1 O câncer de mama

Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020) apontaram 66.280 novos casos de câncer de mama feminina no Brasil em 2020, correspondendo a 29,7% do total de casos de câncer em mulheres, desconsiderando pele não melanoma. Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2020) o Brasil apresenta a segunda faixa mais reduzida de mortalidade de pacientes com câncer de mama em todo o mundo, com 13 casos por 100 mil habitantes. Dados similares ocorrem em países desenvolvidos como os Estados Unidos e o Canadá. No entanto, o Brasil figura como a segunda maior faixa de incidência deste tipo de câncer, se comparado aos outros países; correspondendo a 62,9 casos por 100 mil habitantes.

Mesmo com dados tão alarmantes quanto a incidência do câncer de mama, é possível afirmar que se trata de uma neoplasia potencialmente curável, desde que seja considerado um câncer precoce (HARBECK *et al.*, 2019). Para estes mesmos autores, o câncer de mama passa a ser considerado uma doença apenas tratável a partir do momento que este se encontra em um quadro avançado ou metastático e neste contexto, a terapia terá o objetivo de melhorar a expectativa de vida ajustada à qualidade.

As metástases não detectáveis, além de dificultarem o tratamento, podem ser responsáveis por doenças osteolíticas, acarretando dor óssea acompanhada de fratura patológica, uma vez que as células do câncer de mama encontram, na matriz óssea, facilidades para crescimento e sobrevivência (LI *et al.*, 2020).

O diagnóstico e o tratamento, em tempo oportuno, contribuem para a redução da mortalidade gerada por este tipo de câncer (BRASIL, 2020). Duffy *et al.* (2015) afirmam que os biomarcadores para identificação são potentes ferramentas para o diagnóstico e para o prognóstico, assim como asseguram Mani *et al.* (2019) ao apontarem a proteína RAD51 como um possível biomarcador para um tipo específico de câncer de mama, o triplo negativo.

A direção para o tratamento se baseia, dentre outros aspectos, na estratificação histológica. Segundo a OMS, as lesões precursoras de câncer de mama classificam-se em Carcinoma Lobular *in situ* (LCIS) e Carcinoma Ductal *in situ* (DCIS) (SINN e KREIPE, 2013).

O LCIS ou neoplasia lobular é considerado o menos comum dos cânceres de mama *in situ*, trata-se de uma condição benigna em que as células se localizam no interior dos lóbulos da mama, podendo ser: (i) LCIS clássico, menos agressivo e (ii) LCIS pleomórfico, mais agressivo e ligado a um maior risco de câncer invasivo (SINN e KREIPE, 2013; GIULIANO *et al.*, 2017; MASANNAT *et al.*, 2018).

Já o DCIS é considerado um precursor do câncer invasivo, embora nem todos progridam e pode ser detectado durante a mamografia de rotina, onde ocorre o surgimento e o confinamento de células tumorais no ducto de leite (COLLINS *et al.*, 2005; ALLRED, 2010). Estudo mostra que 20 a 53% de casos de DCIS podem evoluir para um carcinoma ductal invasivo (IDC) onde as células podem ser encontradas em outras regiões da mama (SANDERS *et al.*, 2015). Para pacientes com DCIS é proposto um tratamento padrão, que consiste em cirurgia seguida de

radioterapia, uma vez que não é possível prever quais pacientes irão progredir para IDC (SHAH *et al.*, 2016).

Atualmente existem cinco subgrupos clinicamente relevantes de câncer de mama, sendo determinados indiretamente por análise imuno-histoquímica para o receptor de estrogênio (ER), o receptor de progesterona (PgR) e o receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2). Os subgrupos identificados são: (i) luminal A, com alta expressão de ER e PgR, negativo para HER2; (ii) luminal B (HER2 -), com baixa expressão de ER e/ou PgR, negativo para HER2; (iii) luminal B (HER2+), baixa expressão de ER e/ou PgR, positivo para HER2; (iv) não luminal (HER2+), negativo para ER e PgR, positivo para HER2 e (v) triplo negativo (TNBC), negativo para ER, PgR e HER2 (HARBECK *et al.*, 2019).

Segundo Ren *et al.* (2019) a taxa de mortalidade pelo câncer de mama é variável em relação aos subtipos, sendo o HER2+ o responsável pelo maior número de mortes, seguido dos subtipos TNBC, luminal A e luminal B. O TNBC é responsável por 10 a 15% de casos, com até 50% dos casos em mulheres de origem africana (WANG; JIANG; ZACKSENHAUS, 2020).

Baseado no perfil de expressão gênica e na heterogeneidade molecular, o TNBC é classificado em seis subtipos, (i) Basal-like 1 (BL1) elevada expressão de genes de proliferação (RNA polimerase, MYC, NRAS) e de resposta a danos no DNA; (ii) Basal-like 2 (BL2) enriquecido na sinalização do fator de crescimento e nos marcadores mioepiteliais; (iii) Imunomodulador (IM) com expressão de genes envolvidos na sinalização de citocinas, processamento e apresentação de antígenos; (iv) Mesenquimal (M) com expressão gênica nas vias de transição epitelial-mesenquimal e fator de crescimento; (v) Tronco-like mesenquimal (MSL) e (vi) Receptor de andrógeno luminal (LAR) com expressão gênica luminal impulsionada pelo receptor de andrógeno (LEHMANN *et al.*, 2016; GARRIDO-CASTRO, LIN, POLYAK, 2019).

Wang, Jiang e Zacksenhaus (2020) apontam que, a partir do diagnóstico, a sobrevida é variável para cada subtipo de TNBC. A realidade está associada à resposta ao tratamento, que consiste em quimioterapias citotóxicas, imunoterapia e terapias alvo com inibidores de PARP (PARPi), por exemplo (BIANCHINI *et al.*, 2016; ZUCCHETTI *et al.*, 2019).

### 1.3 INIBIDORES DE PARP

Durkacz *et al.* (1980) foram os pioneiros a descreverem os efeitos das enzimas denominadas PARP (Poli Adenosina Difosfato Ribose Polimerase). A atuação destas enzimas está vinculada ao mecanismo alternativo de reparo do DNA, além de remodelagem, replicação e recombinação da cromatina (KRAUS, 2008; KEUNG *et al.*, 2020).

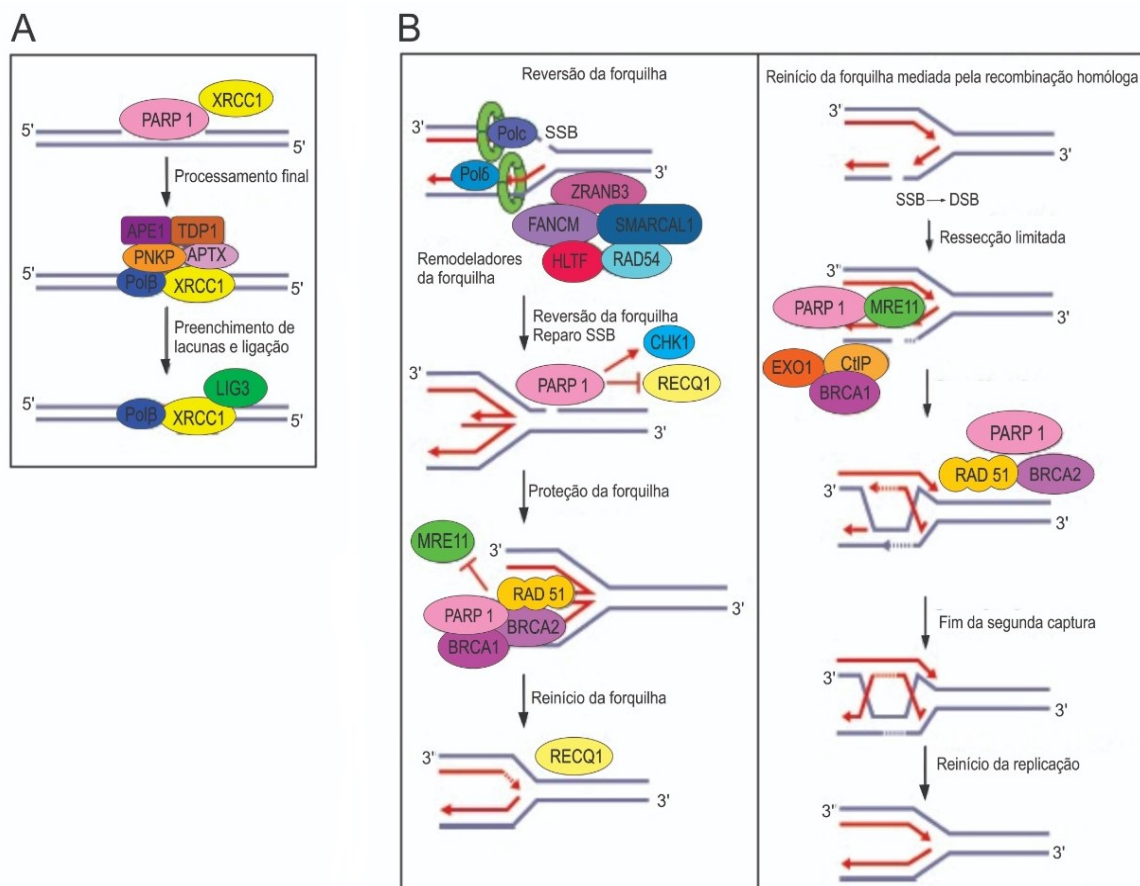
De acordo com Mateo *et al.* (2019) PARP1, principal alvo do PARPi, é responsável pelo reparo de quebra de fita simples do DNA (SSB); sendo considerada, portanto, um sensor de dano ao DNA e um transdutor de sinal. PARP1 reconhece os danos do DNA, sintetiza o polímero poli (ADP-ribose) (PAR) a partir do NAD<sup>+</sup> (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo), liberando nicotinamida como produto da reação e catalisando uma ligação covalente entre este polímero e proteínas alvo, como as histonas e com a própria PARP1, próximo à quebra (ALEMASOVA e LAVRIK, 2019). Toda esta atividade denomina-se PARilação, que medeia o reparo do DNA pela modificação da estrutura da cromatina e pelo recrutamento de efetores de reparo (LIVRAGHI e GARBER, 2015).

Segundo Ray Chaudhuri e Nussenzweig (2017) PARP1 são enzimas atuantes em diferentes vias de reparo do DNA, sendo efetivas no reparo de excisão de nucleotídeos, junção final não homóloga alternativa (NHEJ), recombinação homóloga (HRR) e, segundo Hanzlikova e Caldecott (2019), atuam na preservação da forquilha durante o estresse de replicação, como mostra Figura 4. As enzimas PARP2 e PARP3 contribuem para a estabilidade do reparo da forquilha de replicação (SLADE, 2020).

Os Inibidores de PARP (PARPi) fazem parte de terapias direcionadas que, ao inibirem o reparo da SSB, prolongam a sobrevida livre de progressão e melhoram a qualidade de vida para os portadores do câncer de mama (LITTON *et al.*, 2018). A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso dos PARPi para o tratamento do câncer de mama TNBC metastático e ER-/HER2+, ambos devido a mutação nos genes supressores de tumor *BRCA1* (17q21 – Breast Cancer 1) e *BRCA2* (13q13 – Breast Cancer 2) (FDA, 2020; KEUNG *et al.*, 2020). Nesta perspectiva, o teste *BRCA* da linhagem germinativa (gBRCAm) passou a ser

considerado para o diagnóstico complementar em pacientes com câncer de mama avançado (FORBES *et al.*, 2019).

**Figura 4.** Reparo da quebra de fita simples de DNA (SSB) e proteção da forquilha de replicação por PARP1. (A) PARP1 atua como um sensor de SSBs, promovendo recrutamento de estruturas e proteínas para reparo e preenchimento da fita do DNA. (B) PARP1 restaura a forquilha de replicação danificada por meio da reversão desta forquilha ou pela recombinação homóloga (HR)



**Fonte:** Adaptação de Slade (2020).

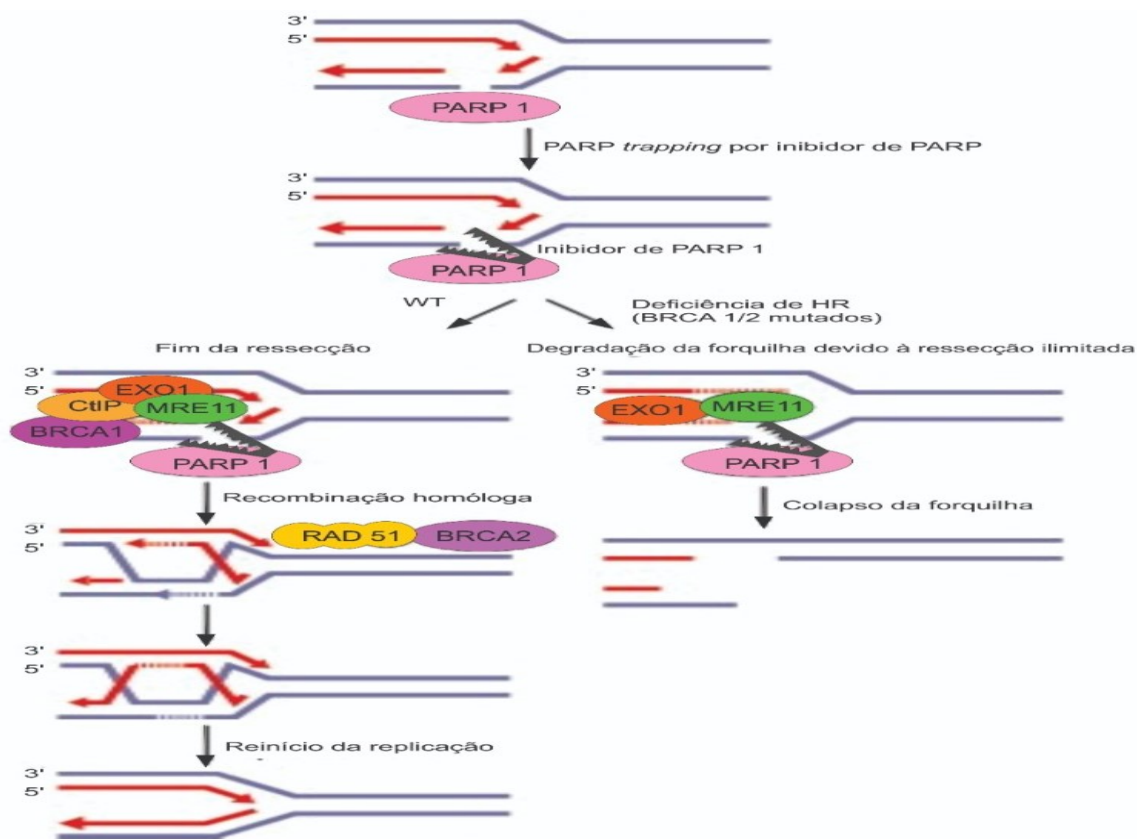
O Olaparibe corresponde a um PARPi bastante eficiente e seguro para pacientes com mutação no *BRCA1/2*, independente do status do receptor hormonal (TUTT *et al.*, 2010). De acordo com Lim e Tan (2017) o Olaparibe foi o primeiro PARPi a ser aprovado pela FDA e pela Agência Europeia de Medicamentos para o tratamento de pacientes com câncer de ovário portadores de mutação no *BRCA1/2*. Alguns estudos comprovam a eficiência desse PARPi no tratamento de outros tipos de cânceres associados a mutações na linha germinativa e linhagens somáticas no

*BRCA1/2*, como é o caso dos cânceres de próstata, mama, gástrico e pancreático (BANG *et al.*, 2015; MATEO *et al.*, 2015; YARCHOAN *et al.*, 2017).

Mateo *et al.* (2019) relatam que os PARPi são drogas sensibilizadoras de radioterapia e quimioterapia, agindo como fator de transcrição, além de reguladores na remodelagem da estrutura da cromatina. Considerando que as lesões causadas por estes inibidores não são reparadas, devido a mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, é previsível a ocorrência de citotoxicidade.

Segundo Slade (2020) os PARPi atuam no contexto da letalidade sintética, pois os seus mecanismos de ação intensificam a instabilidade genômica pré-existente (SSB), gerada pela deficiência das vias de HRR; condição direcionada para a morte celular (Figura 5).

**Figura 5.** Letalidade sintética entre inibidores de PARP (PARPi) e recombinação homóloga deficiente. Os PARPi promovem estabilidade do complexo PARP-DNA resultando em impedimento da replicação e do reparo da fita simples do DNA, além de induzir quebra da fita dupla do DNA (DSB). As DSBs são reparadas por recombinação homóloga, mas em casos de deficiência desse reparo, por mutações no *BRCA1/2*, haverá um colapso na forquilha de replicação



Fonte: Adaptação de Slade (2020).

Entretanto, estudos mostram a letalidade sintética ocorre em células de câncer sem mutação no *BRCA1/2* e, nesse caso, em situações de deficiência na recombinação homóloga (HRD) ou defeito no reparo dessa recombinação, que mimetizam perda de *BRCA1/2*, expressando o fenótipo *BRCAness*. Dessa forma, a sensibilidade ao PARPi é independente do status do *BRCA* (MCCABE *et al.*, 2006; INBAR-ROZENSAL *et al.*, 2009; KEUNG *et al.*, 2020).

Murai (2017) relata que o PARPi tem como efeitos gerais: (1) a inibição catalítica do PARP1, com o impedimento da PARilação e a autoPARilação e (2) a estabilização do complexo tóxico PARP-DNA ou “PARP trapping”, que acarreta no bloqueio da replicação e ativação dos *checkpoints* mitóticos com ciclo celular parado na fase S, sendo esta estabilização o efeito mais relevante do PARPi.

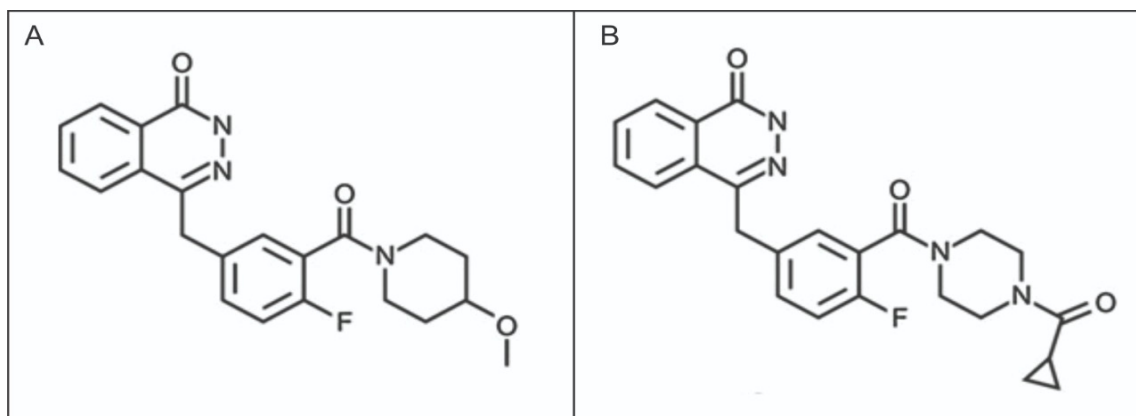
O tratamento das células com PARPi leva ao aprisionamento de PARP na SSB não reparada, resultando em um aduto proteína-DNA, que impede a progressão da forquilha de replicação, resultando em uma quebra na fita dupla do DNA (DSB) que, em células não mutantes, são reparadas pela via HRR (OPLUSTIL O’CONNOR *et al.*, 2016). A deficiência de HRR é resultante de mutações, no *BRCA1/2* por exemplo e de vias alternativas de reparo propensas a erros, o que acarreta instabilidade genômica, aberrações cromossômicas e morte das células cancerígenas (CECCALDI *et al.*, 2015; MATEOS-GOMEZ *et al.*, 2015).

Vários estudos têm validado a utilização do PARPi para a terapia de diversos cânceres, no entanto, é relevante mencionar o evento de resistência ao PARPi verificado em algumas terapias. Vários são os mecanismos que desencadeiam resistência, tais como: (i) as mutações pontuais no domínio de ligação ao DNA da PARP1 (PETTITT *et al.*, 2018), (ii) o aumento da PARilação de PARP1 (GOGOLA *et al.*, 2018), (iii) mutações secundárias que restauram a funcionalidade do *BRCA1/2* (LIVRAGHI e GARBER, 2015), (iv) perda da proteína 1 de ligação ao *P53* (53BP1) (LIVRAGHI e GARBER, 2015), (v) aumento do transportador de efluxo da glicoproteína P (P-gp) (JASPERS *et al.*, 2013).

Em resposta aos mecanismos de resistência, PARPi de nova geração foram sintetizados, como é o caso do AZD2461 (4-[4-Fluoro-3-[(4-metoxipiperidin-1-il) carbonil] benzil] que é derivado da mesma série química que o Olaparibe (AZD 2281), a série éteres de piperidina (KEUNG; WU; VADGAMA, 2019), conforme Figura 6.



**Figura 6.** Estrutura química do AZD2461 (A) e do AZD2281 (B)



**Fonte:** Oplustil O'Connor *et al.* (2016).

O AZD2461 apresenta respostas tão eficazes quanto o Olaparibe; o que pode ser percebido na potência de inibição de PARP1 e PARP2 no reparo de SSB. No entanto, o AZD2461 é menos propenso ao mecanismo de efluxo mediado por P-gp e melhor tolerado em combinação com quimioterapia, que danifica DNA (OPLUSTIL O'CONNOR *et al.*, 2016).

Nesse cenário de resistência ao PARPi, Lim e Tan (2017) relatam a necessidade de novas combinações terapêuticas, diante da compreensão do mecanismo de ação e resistência. O PARPi, atuando como agente único depende de SSBs geradas endogenamente e deficiência de HRR para alcançar a morte da célula cancerígena. O PARPi, em combinação com quimioterápicos, encontrará um número maior de SSBs (endogenamente e induzidas pelo quimioterápico) e morte celular decorrente da deficiência ou proficiência de HRR, uma vez que o limiar de dano tolerado é excedido (OPLUSTIL O'CONNOR *et al.*, 2016).

Lim e Tan (2017) relatam que a combinação entre PARPi e a quimioterapia citotóxica leva a um efeito sinérgico na inibição da recombinação homóloga exercida pelo PARPi. Magan, Isaacs e Stowell (2012) avaliaram a combinação do Olaparibe com Doxorubicina (DXR) em células HeLa, verificando um aumento de 50% de morte celular se comparado ao tratamento com DXR isolada. Já Del Conte *et al.* (2014) detectaram um efeito sinérgico entre o uso contínuo de Olaparibe e DXR lipossômica peguilada, em pacientes em fase II com câncer de ovário.

Eetezadi *et al.* (2018) relataram que a potente combinação entre Olaparibe e DXR, em monocamadas 2D, relaciona-se com as proporções molares entre PARPi e o quimioterápico. Park *et al.* (2018) observaram eficiente associação entre

o Olaparibe e a DXR em células de osterossarcoma que expressavam PARP1, BRCA1/2 e  $\gamma$ H2AX.

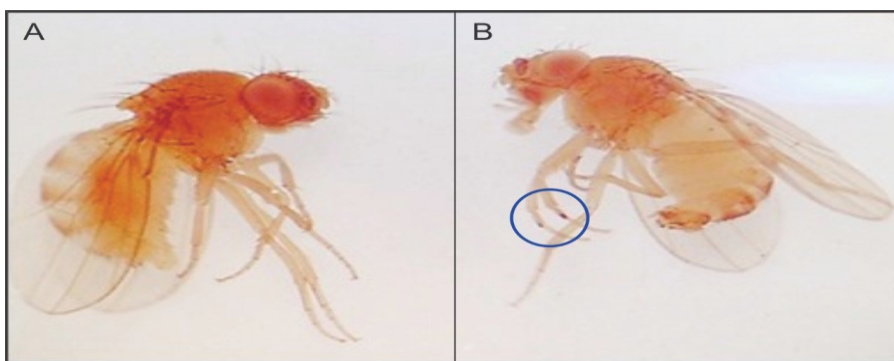
Dentro do contexto da letalidade sintética, estudo recente acrescenta a importância das combinações terapêuticas entre PARPi e radiação, bem como imunoterapias e outros agentes direcionados (MATEO *et al.*, 2019). Em consonância, Mani *et al.* (2019) revelaram comportamento sinérgico do prexasertib, um inibidor do *checkpoint* kinase 1, em combinação com Olaparibe em linhagens celulares TNBC. LaFargue *et al.* (2019) divulgaram o resultado de um estudo de fase 2 da combinação do antiangiogênico cediranibe e Olaparibe em câncer de ovário, onde verificaram aumento significativo na sobrevida, livre de progressão, das pacientes.

Perante a demanda de estudos envolvendo combinações terapêuticas entre PARPi de nova geração e outros fármacos ou substâncias, é de grande relevância o desenvolvimento de pesquisas, *in vitro* e *in vivo*. Nesse cenário, a mosca *Drosophila melanogaster* torna-se um reconhecido organismo modelo para o desenvolvimento de pesquisas *in vivo* em Genética (NEPOMUCENO, 2015).

#### 1.4 *Drosophila melanogaster*: ORGANISMO MODELO NO ESTUDO DO CÂNCER

O câncer é decorrente da ação de fatores endógenos e exógenos que resultam na instabilidade genômica (GERLACH e HERRANZ, 2020). Para compreender as diferentes conexões entre instabilidade genômica e câncer é relevante o desenvolvimento de ensaios com diferentes organismos modelos, sendo um deles a *Drosophila melanogaster* (Figura 7).

**Figura 7.** *Drosophila melanogaster*. (A) Fêmea e (B) macho, com pente sexual em destaque



**Fonte:** Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas.

A popular mosca-da-fruta, como é conhecida a *D. melanogaster*, vem sendo utilizada como organismo modelo genético desde o início do século XX, como mostram os estudos desenvolvidos pelo entomologista Charles W. Woodworth (STURTEVANT, 1959). Posteriormente, com o isolamento de linhagens mutantes de *Drosophila* de olhos brancos, Thomas Hunt Morgan estabeleceu a ligação entre genes, cromossomos e fenótipo (MORGAN, 1910).

No entanto, a concretização do conceito de herança genética ocorreu pelos trabalhos dos colaboradores de Morgan; como Mary Bertha Stark, que forneceu suporte experimental para teoria do câncer como herança dos cromossomos e consolidou o uso de *D. melanogaster* em pesquisas de câncer (STARK, 1918).

A decodificação do genoma dessa mosca e a conclusão do Projeto Genoma Humano permitiram identificar, na *Drosophila*, a conservação evolutiva da maioria das vias celulares implicadas no desenvolvimento e na tumorigênese, em relação ao ser humano (ADAMS *et al.*, 2000; LANDER *et al.*, 2001; VILLEGAS 2019). A *D. melanogaster* apresenta cerca de 75% de similaridade genética com o ser humano e semelhanças neurológicas, fisiológicas, biológicas e bioquímicas com mamíferos (ABOLAJI *et al.*, 2013; KOON e CHAN, 2017). Nessa similaridade encontra-se incluída a maioria dos genes responsáveis por doenças no ser humano, inclusive o câncer (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016).

A realização de pesquisas com *D. melanogaster* permite compreender o funcionamento dos genes em situações normais ou alteradas, como aquelas ocasionadas pelos agentes exógenos responsáveis por instabilidade genômica.

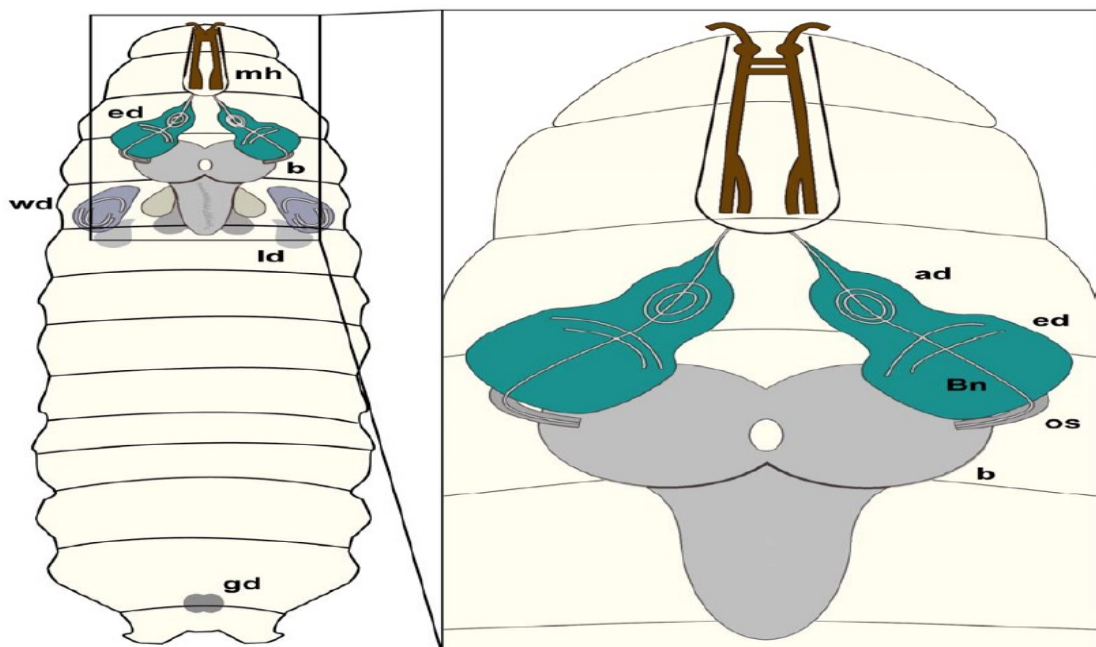
Gerlach e Herranz (2020) relatam que existem inúmeras vantagens na utilização da *Drosophila* em pesquisas voltadas para a tumorigênese, como (i) acesso a extensas coleções mutantes e linhagens transgênicas, (ii) sequência do genoma e dados do transcriptoma disponíveis ao público, (iii) ciclo de vida curto, (iv) grande número de descendentes por geração, (v) rápido desenvolvimento de tumores, (vi) progressão de tumores primários para malignidade em curto espaço de tempo, (vii) produção de amostras de tumor em larga escala para rápida validação de hipóteses e (viii) desenvolvimento de tumores em situação imuno-proficiente.

Alguns estudos envolvendo *D. melanogaster*, revelam conexões entre instabilidade genômica e câncer, como instabilidade cromossômica em células-

tronco (RADTKE e CLEVERS, 2005; MICCHELLI e PERRIMON, 2006), falha na citocinese e poliploidia (GERLACH *et al.*, 2018), células acentrossomais (POULTON; CUNINGHAM; PEIFER, 2014) e instabilidade cromossômica nos discos imaginais (HERRANZ; EICHENLAUB; COHEN, 2016).

Os discos imaginais (Figura 8) são estruturas em forma de saco, compostas por uma monocamada de células epiteliais presentes nas larvas e responsáveis pela origem de tecidos, órgãos e estruturas anatômicas que constituirão a mosca adulta, como os apêndices de cada segmento (JEIBMANN e PAULUS, 2009). As células dos discos imaginais se dividem simetricamente e se proliferam ativamente no desenvolvimento larval, podendo formar tumores epiteliais nas moscas adultas (HERRANZ; EICHENLAUB; COHEN, 2016).

**Figura 8.** Larva de *Drosophila melanogaster* com discos imaginais. Boca (mh), discos imaginais dos olhos (ed); discos imaginais das asas (wd); discos imaginais das pernas (ld); discos imaginais das antenas (ad); cérebro (b); gônadas (gd); nervo (Bn) e talo ótico (os)

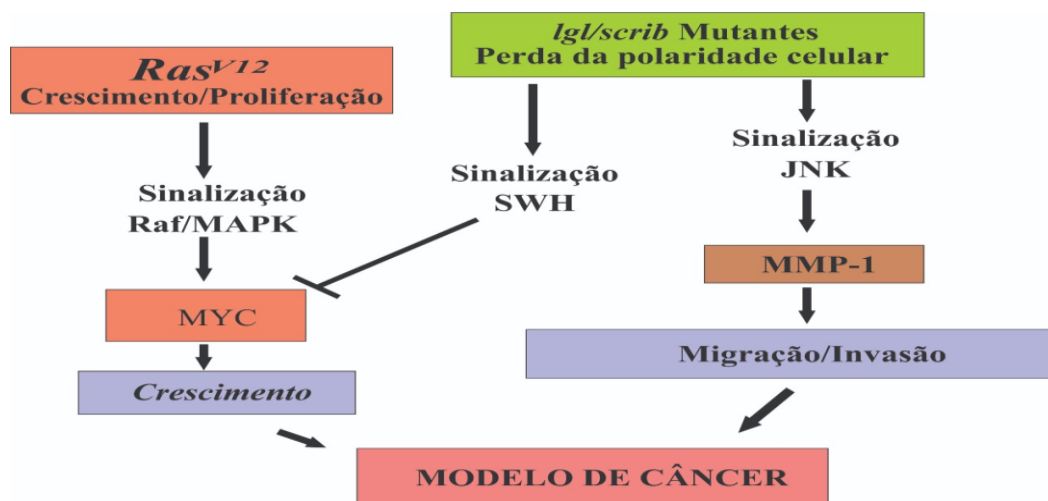


**Fonte:** Jeibmann e Paulus (2009).

Estudos revelam que os discos imaginais da *D. melanogaster* possuem, quando comparados aos mamíferos, semelhanças nas características bioquímicas e morfológicas dos epitélios, além da preservação das principais vias de crescimento (ST. JOHNSTON, 2002; WODARZ e NÄTHKE, 2007) que permitem a estes discos imaginais modelar diferentes aspectos na formação de tumor, uma vez

que 90% dos cânceres são de origem epitelial, conforme Figura 9 (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

**Figura 9.** Principais vias convergentes para o crescimento descontrolado de células epiteliais de *Drosophila melanogaster*



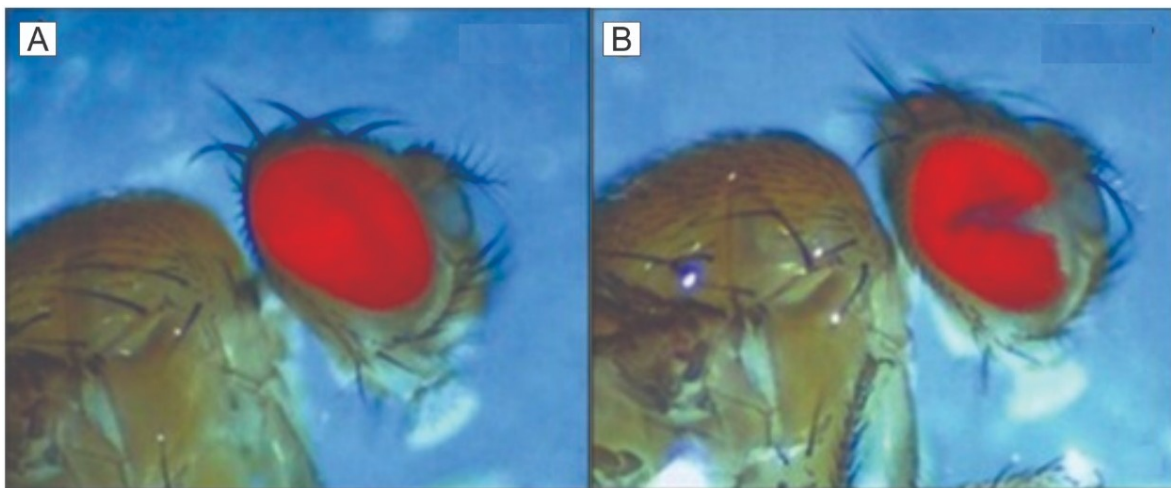
Fonte: Adaptação de Mirzoyan *et al.* (2019).

Nas pesquisas voltadas para o entendimento do câncer encontram-se diferentes testes genotóxicológicos, que avaliam alterações no material genético ocasionados por agentes xenobióticos. Destaca-se o Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART em *D. melanogaster*, que permite detectar, de forma rápida e com baixo custos, uma gama de alterações genéticas (STAMENKOVIĆ-RADAK e ANDJELKOVIĆ 2016; MISHRA *et al.*, 2017).

O SMART, que fornece valores com alta sensibilidade, especificidade e precisão, é realizado por meio de dois ensaios distintos, o teste dos olhos e o teste das asas. O teste dos olhos foi descrito primeiramente por Würgler e Vogel, no qual podem ser analisadas seis alterações fenotípicas distintas, a curto prazo, diante da inexistência de ações de preservação do referido material biológico (WÜRGLE e VOGEL, 1986; VOGEL, NIVARD, ZIJLSTRA, 1991). O teste das asas, a princípio descrito por Graf e Würgler, permite a análise de duas alterações fenotípicas distintas, a longo prazo, devido a preservação das asas em lâminas (GRAF *et al.*, 1984).

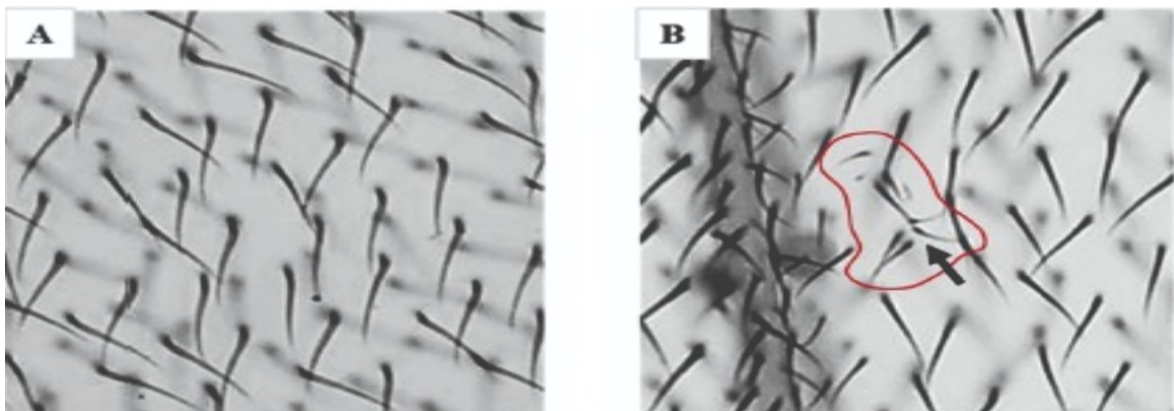
A metodologia para os ensaios classifica os tratamentos em agudo ou crônico, cotratamento ou pós-tratamento; sendo que é nesta etapa que os discos imaginais, presentes nas larvas das moscas, são expostos aos agentes mutagênicos/recombinogênicos (MARCOS; SIERRA; GAIVÃO, 2014). Tais agentes podem causar alterações genéticas, sendo determinantes das manifestações fenotípicas nos olhos (Figura 10) ou nas asas (Figura 11) das moscas adultas (GAIVÃO; FERREIRA; SIERRA, 2020).

**Figura 10.** Olhos de *Drosophila melanogaster*. (A) Olho sem manchas mutantes. (B) Olho com grande mancha mutante



**Fonte:** Gaivão, Ferreira e Sierra (2020).

**Figura 11.** Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de *Drosophila melanogaster*. (A) Pelos selvagens; (B) Pelos resultantes de alteração genética



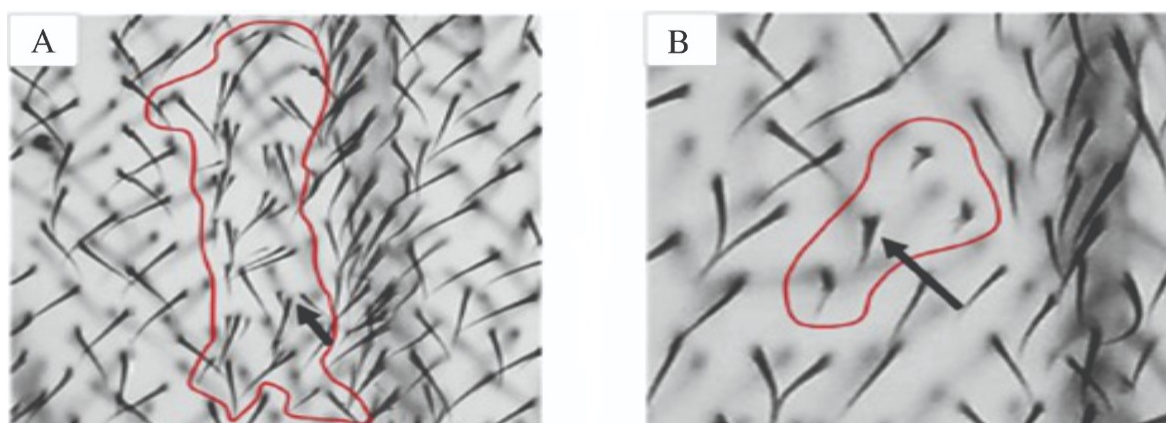
**Fonte:** Oliveira et al. (2020).



Por meio do SMART é possível quantificar os danos no DNA, utilizando a por meio da análise das manifestações fenotípicas nas moscas adultas, que são resultantes da mutagenicidade e/ou recombinogenicidade vinculadas à perda da heterozigosidade para marcadores genéticos específicos das linhagens utilizadas no ensaio em questão (MARCOS, SIERRA, GAIVÃO, 2014; VLASTOS *et al.*, 2015).

No teste das asas, a perda da heterozigosidade, seja por eventos mutagênicos ou por recombinação gênica, pode gerar células homozigotas para os marcadores *mwh* e *flr* resultando em indivíduos adultos com os seguintes fenótipos em relação aos pelos nas asas: (i) *multiple wing hair (mwh)* com vários pelos em crescimento próximo e de vários comprimentos (Figura 12A) e (ii) *flare (flr)* com único pelo encurtado e amorfo (Figura 12B) (GRAF *et al.*, 1984; GRAF *et al.*, 1989; GRAF e VAN SCHAİK, 1992).

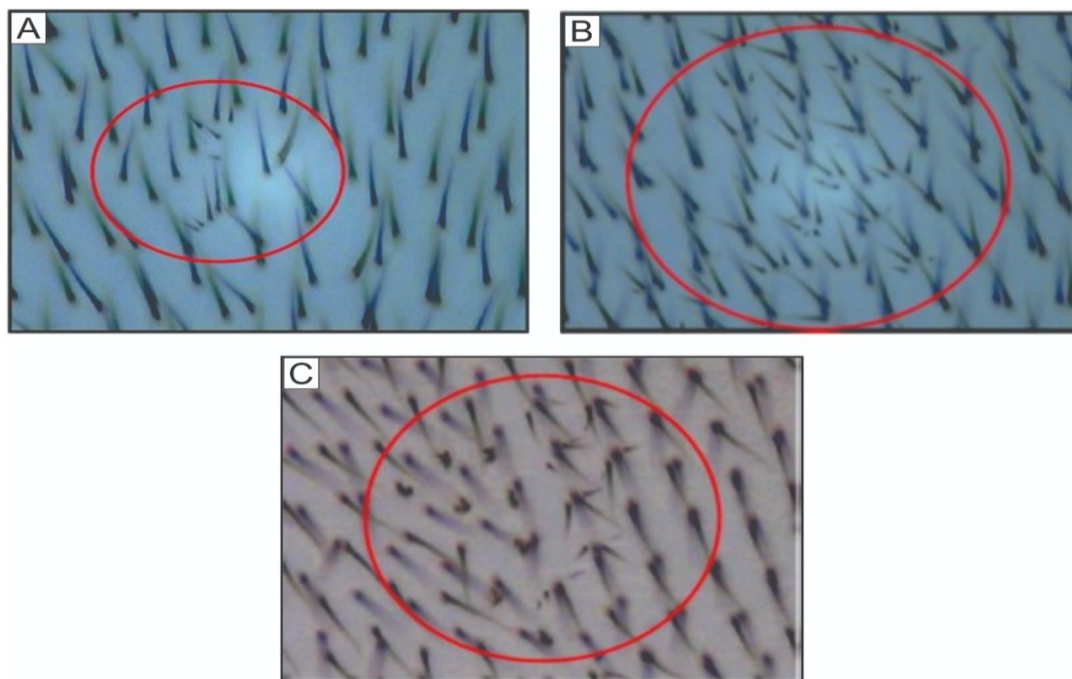
**Figura 12.** Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de *Drosophila melanogaster*. (A) Pelos multiple wing hair (*mwh*). (B) Pelos flare (*flr*)



**Fonte:** Oliveira *et al.* (2020).

O local, nas asas da progênie, onde ocorrem os fenótipos, é denominado de mancha, que são classificadas como: (i) simples pequena, possui uma ou duas células expressando apenas um tipo de pelo (*mwh* ou *flr*); (ii) simples grande, possui três ou mais células, com pelos *mwh* ou *flr* e (iv) gêmea, quando expressa os dois tipos de pelos (*mwh* e *flr*), conforme Figura 13 (FREI *et al.*, 1992; GRAF, HEO, RAMIREZ, 1992; SPANÓ e GRAF, 1998).

**Figura 13.** Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, da superfície das asas de *Drosophila melanogaster*. (A) Mancha simples pequena, com pelos *multiple wing hair (mwh)*. (B) Mancha simples grande, com pelos *mwh*. (C) Mancha gêmea, com pelos *mwh* e *flare (flr)*



**Fonte:** Laboratório de Citogenética e Mutagenese - Centro Universitário de Patos de Minas.

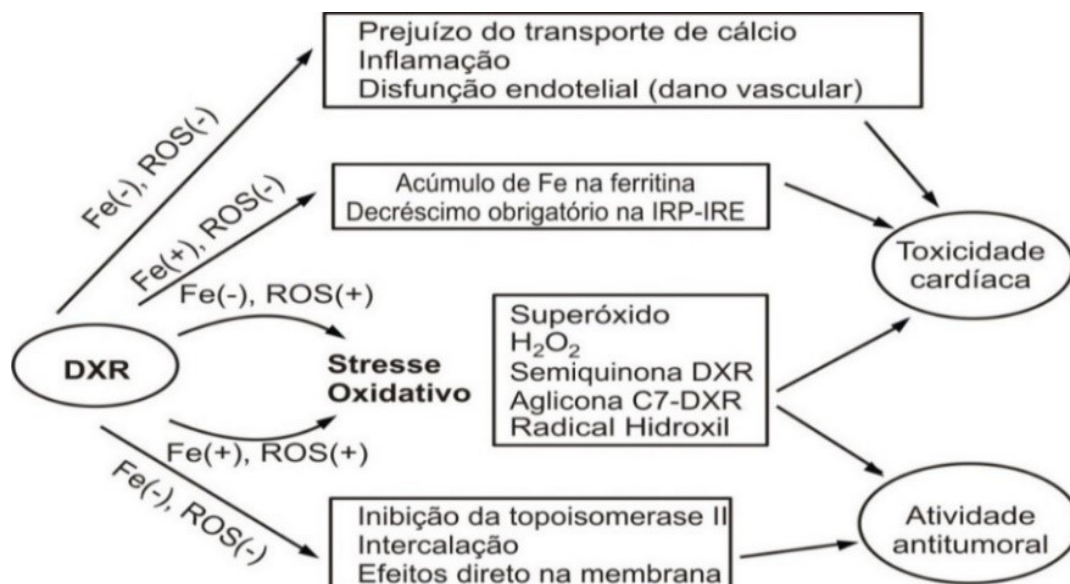
O SMART pode ser utilizado na avaliação de substâncias antimutagênicas e antirecombinogênicas, as quais atuam impedindo ou neutralizando os danos ao DNA (GAIVÃO; FERREIRA; SIERRA, 2020). Nesse caso, as substâncias em associação com agentes químicos genotóxicos como o Cloridrato de Doxorrubicina (DXR), por exemplo, são administradas às larvas da *D. melanogaster* com posterior análise do fenótipo nos adultos (SILVA-OLIVEIRA, ORSOLIN, NEPOMUCENO, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2020).

O Cloridrato de Doxorrubicina (DXR), que apresenta propriedades quimioterápicas e recombinogênicas, por diferentes mecanismos, promove o aparecimento de danos no DNA, como a biotransformação reduzida do anel quinona produzindo um radical semiquinona, que tem efeito tóxico direto ou participa de reações redox (RAMJI *et al.*, 2003). A DXR promove ainda a produção de EROS, responsável por citotoxicidade secundária (GEWIRTZ, 1999). Desta forma, a DXR apresenta efeitos capazes de induzir danos ao DNA e gerar toxicidade em diferentes tecidos, conforme mostra a Figura 14. Seu mecanismo de ação primário, no entanto, está relacionado à ligação e inibição da enzima



topoisomerase II, impedindo a re-ligação das fitas de DNA seccionadas por esta mesma enzima, gerando, assim, uma lesão permanente no DNA (MINOTTI *et al.*, 2004; KAISEROVÁ *et al.*, 2006).

**Figura 14.** Esquema simplificado da interação da Doxorubicina (DXR) com tumores em células cardíacas

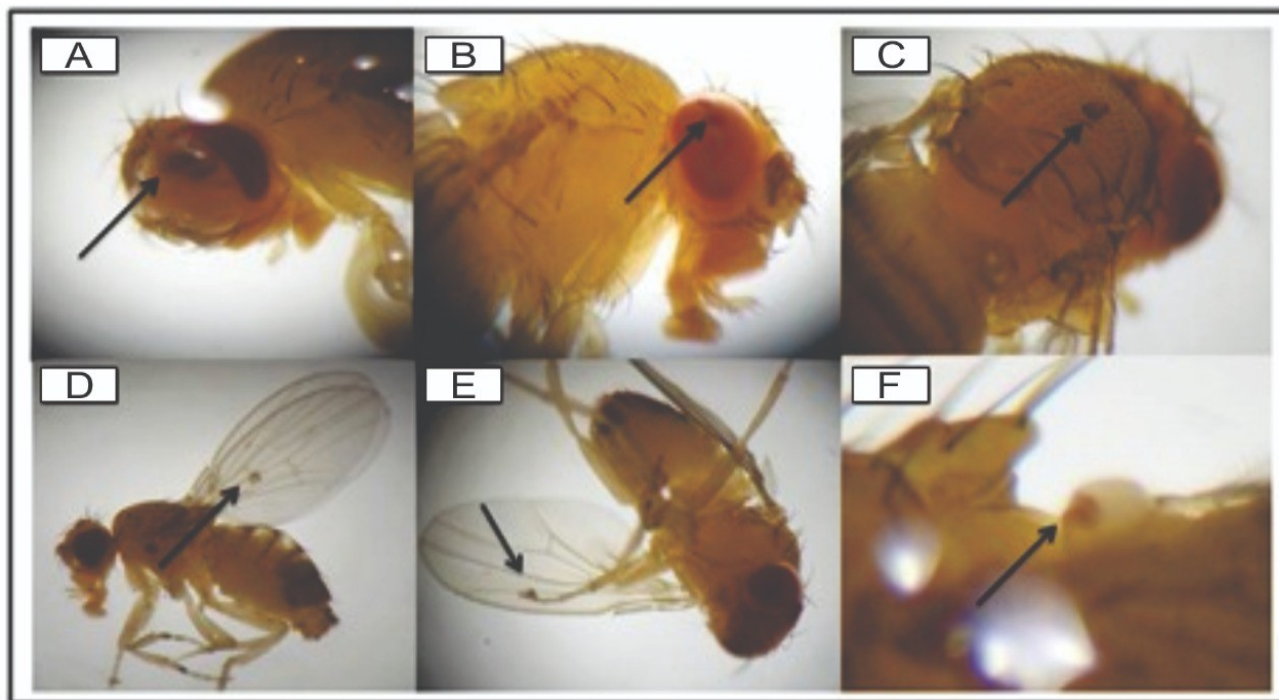


Fonte: Adaptação de Kaiserová *et al.* (2006).

Tendo em vista que a mutagenicidade e/ou recombinogenicidade podem estar associadas à carcinogenicidade (BISHOP e SCHIESTL, 2002;2003), a DXR vem sendo utilizada em vários estudos como controle positivo, tanto no SMART como no Teste de Tumor Epitelial (ETT) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Para avaliação de produtos químicos com propriedades carcinogênicas é realizado, em *D. melanogaster*, o Teste de Tumor Epitelial - ETT (NEPOMUCENO, 2015). Esse teste utiliza uma linhagem de *D. melanogaster* contendo o marcador WTS (warts) codificado pelo gene *WTS*, que, quando expresso no tipo selvagem, atua como um gene supressor de tumor (XU *et al.*, 1995). A deleção do gene *WTS* no tipo selvagem e a consequente expressão do alelo mutante leva à formação de clones celulares, altamente invasivos. nos discos imaginais das larvas, resultando no desenvolvimento de tumores epiteliais no corpo e apêndices das moscas adultas, conforme Figura 15 (NISHIYAMA *et al.*, 1999).

**Figura 15.** Expressão de tumor epitelial (setas) em *Drosophila melanogaster*. Na cabeça (A), no olho (B), no corpo (C), na asa (D), na perna (E) e nos halteres (F)



**Fonte:** Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Uberlândia.

O gene supressor de tumor *WTS*, localizado no cromossomo 3, é letal em homozigose por desencadear defeitos durante o desenvolvimento embrionário das moscas, exigindo, para evitar homozigose, o cromossomo balanceador (TM3, *Sb*<sup>1</sup>), caracterizado pela mutação *stubble* (XU *et al.*, 1995; NEPOMUCENO, 2015).

Nos seres humanos, um ortólogo ao gene *WTS* é o gene supressor de tumor *LATS1*, que age na regulação negativa do ciclo celular por meio da (i) inibição do crescimento celular, (ii) bloqueio da mitose na última fase da intérfase (G<sub>2</sub>/M) e (iii) indução da apoptose (XIA *et al.*, 2002).

Neste contexto de estudo sobre câncer, acrescentamos às pesquisas *in vivo* com *D. melanogaster*, ensaios *in vitro*, com a linhagem celular de câncer de mama humano MDA-MB-231. Essa linhagem é proveniente de um adenocarcinoma de mama (TNBC – subtipo mesenquimal) de um derrame pleural metastático e obtida de uma mulher caucasiana de 51 anos. Essa investigação busca contribuir para novas terapias contra o agressivo câncer da mama triplo negativo (KEUNG *et al.*, 2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimutagênico, antirrecombinogênico e anticarcinogênico da vitamina D3 (VD3), por meio de análise *in vivo* e *in silico*; *in vitro*, analisar as combinações binárias entre VD3 e fármacos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar, por meio do SMART em asas de *Drosophila melanogaster*, ação mutagênica e/ou recombinogênica direta (por meio do cruzamento padrão ST) ou ação indireta (por meio do cruzamento de alta bioativação HB) em tratamentos crônicos isolados com VD3;
- Analisar o percentual dos efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos da VD3;
- Avaliar, por meio do SMART em asas de *D. melanogaster*, os possíveis efeitos antimutagênicos e/ou antirrecombinogênicos direto (por meio de cruzamento padrão ST) ou indireto (por meio de cruzamento de alta bioativação HB) da VD3 em cotratamentos associados com Doxorrubicina (DXR);
- Analisar o percentual dos efeitos antimutagênicos e/ou antirrecombinogênicos da VD3;
- Investigar, por meio do ETT em *D. melanogaster*, os efeitos carcinogênicos da VD3 em tratamento crônico isolado com a vitamina;
- Verificar, por meio do ETT em *D. melanogaster*, a ação anticarcinogênica da VD3 em cotratamento associado com DXR;

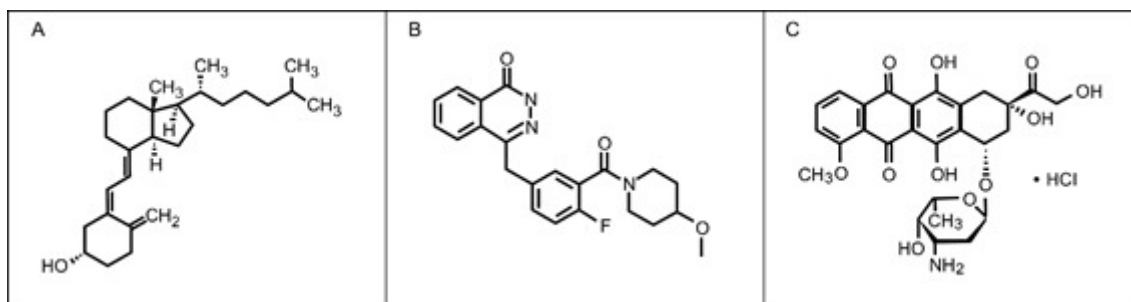
- Analisar a relação dose-resposta entre as concentrações de VD3 e os resultados obtidos no SMART e no ETT;
- Analisar, por meio do *docking* e simulação da dinâmica molecular, a interação estável entre VD3 e receptores de vitamina D (VDR) e Ecdisona (EcR);
- Identificar, por meio de ensaio MTT, a viabilidade celular em linhagem de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231) e linhagem de mama não neoplásica (MCF 10A), após 24 e 48 horas de tratamentos únicos;
- Identificar as concentrações de VD3, AZD2461 ou DXR capazes de inibir 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) em linhagem de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231) e linhagem de mama não neoplásica (MCF 10A), após 24 e 48 horas de tratamentos únicos;
- Identificar e analisar, por meio do teste Chou-Talalay, as interações farmacodinâmicas das combinações binárias, com proporções de razão não constante, entre VD3, AZD2461 e DXR, após períodos de 24 e 48 horas de incubação, em linhagem celular de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231);
- Selecionar as combinações binárias sinérgicas com efeito moderado/alto e redução favorável de dose, em linhagem celular de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AGENTES QUÍMICOS

A vitamina D3 (VD3) (CAS 67-97-0; lote PURI006876) foi obtida na Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis (GO), Brasil (Figura 16A). O AZD2461 (4- [4-Fluoro-3 - [(4-metoxipiperidin-1-il) carbonil] benzil]; CAS 763113-22-0; lote 75828) foi obtido na Sigma-Aldrich®, Brasil Ltda e descrito na patente internacional WO2009/093032, especificamente, composto número 2b e 47 (Figura 16B). A Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) (CAS 25316-40-9; lote 19H0693), conhecida comercialmente como Adriblastina® RD, foi fabricada e embalada pela Activis Itália Sp - Nerviano (Milão, Itália) e importada pela Pfizer Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil (Figura 16C). O Glicerol (CAS 56-81-5) foi obtido na Sigma-Aldrich®, Brasil Ltda.

**Figura 16.** Fórmula estrutural da Vitamina D3 (A), AZD2461 (B) e Doxorrubicina (C)



Para a cultura celular, mistura de nutrientes com Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12), meio Leibovitz's (L15), soro fetal bovino (FBS), fator de crescimento epidérmico (EGF), solução de insulina e gentamicina que foram adquiridos de Gibco®. O brometo de 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium (MTT) – CAS 57360-69-7, dimetilsulfóxido (DMSO) – CAS 67-68-5 e hidrocortisona foram adquiridos de Sigma-Aldrich®.

### 3.2 ESTOQUES DE *Drosophila melanogaster*

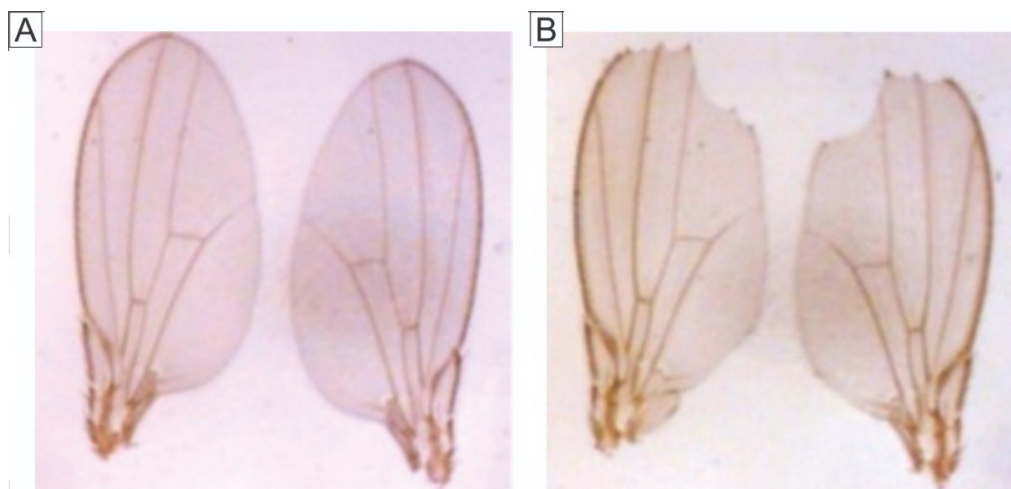
Três linhagens de *D. melanogaster* foram utilizadas para investigar a mutagenicidade e recombinogenicidade de VD3 quando administradas isoladamente ou sua antimutagenicidade e antirecombinogenicidade quando administradas simultaneamente com DXR: [1] *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*; *y*; *mwh jv*, 3 (3-0.3)); [2] *flare-3* (*flr<sup>3</sup>/ln(3LR)*TM3, *ri p<sup>o</sup> sep I* (3)89Aa *bx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>S</sup>*); e [3] ORR; *flare-3* (ORR/ORR; *flr<sup>3</sup>/ln(3LR)* TM3, *ri p<sup>o</sup> sep I* (3)89Aa *bx<sup>34e</sup>* e *Bd<sup>S</sup>*). Duas linhagens de *Drosophila* foram utilizadas no estudo da carcinogenicidade de VD3 administrada isoladamente ou sua anticarcinogenicidade quando administrada simultaneamente com DXR: [1] *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*; *y*; *mwh jv*, 3 (3-0.3)) e [2] “*wts*” (*wts*/TM3; ST [1] *in* [1] *kni* [*ri-1*] *wts* [3-17]/TM3, *Sb<sup>1</sup>*). Essas linhagens foram mantidas em frascos de vidro com um meio de manutenção (ágar-ágar, banana, fermento, metilparabeno, água e penicilina/ estreptomicina) em uma câmara de BOD (Bio-Oxygen Demand) (Modelo: SL224, SOLAB – Equipamentos para Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 25±1°C e submetidas a ciclos de fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro.

### 3.3 TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART) EM ASAS DE *Drosophila melanogaster*

#### 3.3.1 Cruzamentos e tratamentos

Dois cruzamentos foram realizados para obter a progênie larval experimental: (1) cruzamento padrão (ST), machos *mwh/mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *flare-3* (GRAF *et al.*, 1984; 1989); (2) cruzamento de alta bioativação (HB), machos *mwh/mwh* foram cruzados com ORR, fêmeas virgens *flare-3* (GRAF e VAN SCHAIK, 1992). Esses cruzamentos produziram dois tipos de progênie (Figura 17): moscas trans-heterozigotas marcadas (MH) (*mwh+/+flr<sup>3</sup>*), com asas fenotipicamente selvagens e moscas heterozigotas balanceadas (BH) (*mwh+/+TM3*, *Bd<sup>S</sup>*), com asas fenotipicamente serrilhadas as quais são fenotipicamente distintas devido ao marcador TM3, *Bd<sup>S</sup>*.

**Figura 17.** Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, das asas de *Drosophila melanogaster*. (A) Asas de descendente trans-heterozigoto marcado (MH: *mwh*+/*flr*<sup>3</sup>). (B) Asas de descendente heterozigoto balanceado (BH: *mwh*+/*TM3*, *Bd*<sup>S</sup>)



**Fonte:** Laboratório de Citogenética e Mutagenese - Centro Universitário de Patos de Minas.

A oviposição ocorreu por 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (ágar a 4% em água) e uma camada de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose. Após 72±4 h, as larvas de terceiro estágio foram coletadas e lavadas com água ultrapura usando uma peneira de malha fina. Foi realizado um estudo para testar a toxicidade da VD3 no SMART. Para calcular a taxa de sobrevivência, após a exposição as larvas foram contadas antes da distribuição em tubos de vidro contendo meio de cultura alternativo, preparado com purê de batata instantâneo Yoki® Alimentos S.A. (SPANÓ *et al.*, 2001) e diferentes concentrações de VD3 isoladamente (12,5; 25,0; 50,0 ou 100,0 mM) dissolvida em uma mistura de 1% de Tween 80 (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, Brasil) e etanol a 3% (Neon Comercial Ltda., São Paulo, Brasil) ou em associação com DXR (0,4 mM). O Tween 80, também conhecido como polissorbato 80, é um agente solubilizante usado com característica hidrofílica, que permite a formação de ligações de hidrogênio com a molécula de água. Além disso, a presença de uma extensa cadeia de carbono (C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>) permite solubilidade em compostos não polares.

As moscas foram contadas e armazenadas em etanol a 70%. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparação estatística das taxas de sobrevivência para as amostras independentes (DE REZENDE *et al.*, 2013).

Para o SMART, as concentrações de VD3 foram baseadas no ensaio de sobrevivência em *D. melanogaster*. Os tratamentos foram realizados e um experimento com duas repetições, considerando quatro concentrações de VD3 isoladamente (12,5; 25; 50 ou 100 mM) e três concentrações de VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) em associação com DXR (0,4 mM) (para cotratamentos). Três controles foram incluídos: (1) controle negativo (água ultrapura); (2) controle de solvente (1% de Tween + 3% de etanol) e (3) controle positivo (Doxorrubicina, DXR 0,4 mM). A DXR foi diluída em água.

### 3.3.2 Análise das asas

Moscas adultas emergentes dos diferentes tratamentos foram coletadas e fixadas em etanol a 70%. As asas das moscas foram removidas, embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral e 5,0 mL de água destilada) e dispostas em lâmina. As lâminas foram secas durante 1 hora em uma placa quente (40°C). Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e secas à temperatura ambiente.

As asas foram examinadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, 400 X) para registrar o número, os tipos de manchas (simples ou gêmeas), seu tamanho e posição ao longo da asa. Foram analisadas aproximadamente 24.400 células por asa.

### 3.3.3 Análise estatística

As asas de 40 moscas de cada série tratada foram pontuadas, incluindo os controles. Os dados foram avaliados de acordo com o procedimento de decisão de Frei e Würigler (1988, 1995), resultando em quatro diagnósticos diferentes: negativo, positivo, fraco positivo ou inconclusivo. A frequência de cada tipo de mancha (simples pequena, simples grande ou gêmea) e a frequência total de manchas por mosca para cada tratamento foram comparadas em pares, isto é, controle solvente versus VD3 isolada e controle positivo (DXR) isolada versus DXR mais VD3, seguindo as recomendações de Kastenbaum e Bowman (1970), consideradas significativas com  $p \leq 0,05$ . Todos os resultados inconclusivos e fraco positivos foram analisados com o Teste *U* não paramétrico de Mann, Whitney e



Wilcoxon ( $\alpha = \beta = 0,05$ ; unilateral) para excluir falsos positivos (FREI e WÜRGLER, 1995).

Os efeitos moduladores da VD3 na mutagenicidade e recombinogenicidade da DXR foram quantificados por meio da comparação dos dois genótipos (*mwh/flr3* e *mwh/TM3*) e aplicando as fórmulas: Recombinação (R) =  $1 - [(\text{controle corrigido} / \text{controle negativo em moscas BH}) / (\text{controle corrigido} / \text{controle negativo em moscas MH})] \times 100$  e Mutação (M) =  $100 - R$  (FREI e WÜRGLER, 1996).

Com base nas frequências de manchas corrigidas pelo controle por  $10^5$  células, a porcentagem de inibição de VD3 foi calculada como:  $[\text{DXR isolada} - (\text{DXR} + \text{VD3}) / \text{DXR isolada}] \times 100$  (ABRAHAM, 1994).

### 3.4 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT) EM *Drosophila melanogaster*

#### 3.4.1 Cruzamentos e tratamentos

Foi realizado um cruzamento para obter a progênie larval experimental onde machos *mwh/mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *wt*, *TM3*, *Sb1* (SIDOROV et al., 2001; EEKEN et al., 2002). A linhagem WTS foi adquirida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center da Universidade de Indiana (EUA), registrado sob o número Bloomington/7052.

A oviposição ocorreu por 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (ágar a 4% em água) e uma camada de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose. Após  $72 \pm 4$ h, larvas de terceiro estágio foram lavadas com água ultrapura e coletadas em uma peneira de malha fina.

Um estudo foi realizado para escolha das concentrações de VD3, no ETT. Para calcular a taxa de sobrevivência após a exposição, cem larvas foram contadas antes da distribuição em tubos de vidro contendo meio de cultura alternativo reidratado com as mesmas concentrações de VD3 isoladamente ou em associação com DXR, conforme descrito anteriormente no item 3.3.1 do SMART. O teste do Qui-quadrado foi realizado para comparação estatística da taxa de sobrevivência para as amostras (DE REZENDE et al., 2013).

Para o ETT, as concentrações de VD3 foram baseadas nos ensaios de sobrevivência. Os tratamentos foram realizados em um experimento com duas repetições, envolvendo quatro concentrações de VD3 isoladas (12,5; 25; 50 ou 100

mM) e três concentrações de VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) em associação com DXR (0,4 mM) (para cotratamentos). Três controles foram incluídos: (1) controle negativo (água ultrapura); (2) controle solvente (1% de Tween + 3% de etanol) e (3) controle positivo (Doxorrubicina, DXR 0,4 mM). A DXR foi diluída em água.

#### 3.4.2 Análise das moscas

Apenas as moscas emergentes com pelos longos e finos foram analisadas por serem portadoras do gene *WTS* e não possuírem o balanceador cromossômico (TM3, *Sb*<sup>1</sup>). Os indivíduos foram armazenados em etanol e, posteriormente, analisados em lâminas côncavas contendo glicerol, mediante visualização com microscópio estereoscópico (Bel® Photonics) para contagem de tumores. A presença de tumores foi avaliada e registrada em uma planilha padrão.

#### 3.4.3 Análise estatística

As frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com as diferentes concentrações de VD3 isoladas ou associadas com DXR, são comparadas estatisticamente com as frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados do controle solvente e do controle positivo, respectivamente; utilizando o Teste *U* não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância  $p \leq 0,05$ .

### 3.5 ANÁLISE *in silico*

#### 3.5.1 Modelagem e *docking* molecular

A proteína Receptor de Ecdisona (EcR) de *D. melanogaster* foi modelada, por homologia, usando o programa Modeller (WEBB e SALI, 2016). Foi utilizado como molde a proteína Receptor de Vitamina D3 (VDR) humana (PDBid: 3B0T). Na modelagem foram geradas 1000 estruturas, entre as quais foi selecionada a de melhor qualidade após avaliação pelos programas Dope (SHEN e SALI, 2006), Verify3D (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997), Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963) e ERRAT (COLOVOS e YEATES, 1993).

Ambas, VDR e EcR, foram submetidas à docagem com o calcitriol (vitamina D ativa) por meio do programa GOLD (JONES *et al.*, 1997), usando os parâmetros pré-definidos pelo programa, exceto para a flexibilidade do ligante que foi definida como 200%. Cada docagem foi realizada 50 vezes e as melhores posições de *docking* foram avaliadas a partir de um ranking da função de pontuação ChemPLP. Em seguida, foi realizada uma plotagem 2D das interações do ligante com a proteína.

### 3.5.2 Simulação da dinâmica molecular (DM)

As melhores posições do calcitriol para VDR e EcR do *docking* molecular foram submetidas a uma simulação de dinâmica molecular (DM) receptor-ligante, utilizando GROMACS (ABRAHAM *et al.*, 2015). Os parâmetros da topologia do ligante foram gerados por SwissParam (ZOETE *et al.*, 2011) usando o campo de força CHARMM.

A DM do complexo proteína-ligante foi realizada por meio do GROMACS (ABRAHAM *et al.*, 2015) utilizando TIP3P (Potenciais Intermoleculares Transferíveis) como modelo de água. A célula unitária foi definida como forma triclínica e água e íons foram adicionados. Após a minimização de energia, uma fase de equilíbrio foi realizada usando as condições NPT (número de partículas, pressão e temperatura constantes) e NVT (número de partículas, volume e temperatura constantes). A fase de produção foi conduzida por 20 nanosegundos (ns). As trajetórias foram analisadas por meio de desvio médio quadrático da raiz da proteína (RMSD), número de ligações de hidrogênio e energia de ligação entre a proteína e o ligante.

## 3.6 ANÁLISE *in vitro*

### 3.6.1 Linhagens celulares

As duas linhagens celulares utilizadas nesse estudo, MCF 10A e MDA-MB-231, foram obtidas da American Type Culture Collection (EUA) e confirmado como livre de contaminação por micoplasma. Os meios de cultivo foram suplementados com 10% de FBS e 50 µg/mL de gentamicina. A linhagem MCF 10A (não neoplásica) foi mantida em meio DMEM F12, enriquecido com 10µg/mL de EGF,

0,25 µg/mL de hidrocortisona e 10 µg/mL de insulina, em estufa a 37°C, com atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific™ Forma Series 3 Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator). A linhagem MDA-MB-231 (TNBC) foi cultivada em meio L15, os frascos foram mantidos fechados, livres de CO<sub>2</sub>. Para ambas linhagens, os meios foram trocados de acordo com a demanda metabólica, até que as células atingissem 80-90% de confluência, quando foram utilizadas em experimentos subsequentes. A linhagens MCF 10A e MDA-MB-231 apresentavam, respectivamente, 09 e 11 passagens.

### 3.6.2 Viabilidade celular após tratamentos com os compostos isolados

A metodologia MTT, 3-[4,5-dimetiltiazole-2-il] 2,5-difeniltetrazólio, descrita por Mosmann (1983), consiste em um ensaio colorimétrico utilizado para avaliação de viabilidade celular. As células metabolicamente viáveis apresentam as enzimas desidrogenases mitocondriais, responsáveis por clivar o anel de tetrazólio, transformando este composto, de coloração amarela, em um composto de coloração azul escuro, que são os cristais de formazan {E, Z-1-(4,5-dimetiltiazole-2-il) -1,3-difenilformazan}. A síntese desses cristais, que são insolúveis em soluções aquosas, atesta a funcionalidade da cadeia respiratória.

As células MCF 10A e MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Após confluência, as linhagens foram tratadas com diferentes concentrações de VD3, AZD2461 ou DXR (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 ou 160 µM). Os seguintes controles foram incluídos no ensaio: (i) controle de viabilidade, com células não tratadas; (ii) controle diluente, com células tratadas apenas com DMSO e (iii) controle negativo, com poços contendo apenas meio e DMSO (branco). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 e 48 horas, e os tratamentos realizados em triplicata.

O reagente MTT (10% p/v) foi, então, adicionado às células por 4h a 37°C, o sobrenadante descartado e o DMSO adicionado em todos os poços. Os valores de densidade óptica (DO) à frequência de absorbância de 570 nm, foram medidos em ELISA Reader (Readwell PLATE/Robonik®). A DO média das células tratadas foi comparada com a DO média dos poços controle (Mosmann, 1983). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela equação (F1), de acordo com Braga *et al.* (2018):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{AA - (CV - CN)}{DMSO - (CV - CN)} \times 100 \quad (F1)$$

AA = Amostra A<sub>570nm</sub> (células tratadas).

CV = Controle de viabilidade A<sub>570nm</sub> (células não tratadas)

CN = Controle negativo A<sub>570nm</sub> (branco)

DMSO = Controle diluente A<sub>570nm</sub> (células tratadas com DMSO)

Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) foram calculados para cada composto e após cada período de tratamento. Estes foram utilizados nos ensaios combinatórios posteriores analisados pelo método Chou-Talalay.

#### 3.6.2.1 Análise estatística

A análise estatística para o ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, C A, EUA) e as diferenças entre os grupos foram determinadas por meio do teste one way ANOVA e Tukey HSD post hoc para as múltiplas comparações. A IC<sub>50</sub> foi determinada a partir de uma regressão não linear, que relata a porcentagem de viabilidade celular em função do logaritmo das concentrações testadas. Os gráficos foram plotados com dados de média ± desvio padrão. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

#### 3.6.3 Determinação dos parâmetros de dose-efeito para cada composto isolado

Sete concentrações foram determinadas em diluição seriada, a partir do dobro da IC<sub>50</sub>, em um novo ensaio de viabilidade conduzido na linhagem TNBC MDA-MB-231 para cada um dos compostos, isoladamente. A fração de inibição (*fa*) foi calculada por meio da equação (F2):

$$Inibição\ (\%) = \left\{ 1 - \left[ \frac{AA - (CV - CN)}{DMSO - (CV - CN)} \right] \right\} \times 100 \quad (F2)$$

O programa CompuSyn (ComboSyn Inc., Paramus, NJ. U.S.A.) estabeleceu os parâmetros  $m$ ,  $D_m$  e  $r$  baseados na Equação de Efeito Mediano (F3) (CHOU e TALALAY, 1984; CHOU, 2006).

$$\frac{fa}{fu} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m \quad (F3)$$

$fa$  = fração de inibição (efeito)

$fu$  = fração não afetado ( $fu = 1 - fa$ )

$D$  = dose ou concentração do composto

$D_m$  = dose de efeito mediano

$m$  = forma da curva de dose-efeito

O parâmetro ( $m$ ) determina dose-efeito, sendo ( $m < 1$ ) ou ( $m > 1$ ) coerente com a maioria dos sistemas biológicos; o parâmetro ( $D_m$ ) identifica a potência do composto; já o parâmetro ( $r$ ) representa o coeficiente de correlação linear, indicando o grau de conformidade dos dados com a lei de ação em massa, sendo ( $r = 1$ ) em ideal conformidade (CHOU, 2006; 2010).

#### 3.6.4 Cálculo do Índice de Combinação (CI) pelo método Chou-Talalay

Para a identificação e a análise das interações farmacodinâmicas *in vitro* dos compostos foi realizado um novo de ensaio MTT com combinações binárias, com base no projeto experimental de razão não constante. Três combinações binárias (VD3 + AZD), (VD3 + DXR) e (AZD + DXR) foram testadas na linhagem TNBC MDA-MB-231; com sete diferentes concentrações de cada composto, em três repetições. Os efeitos citotóxicos foram avaliados após os períodos de incubação de 24 e 48 horas, em dois ensaios independentes.

Todas as concentrações utilizadas foram baseadas na  $IC_{50}$ . Para o ensaio de 24 horas foram utilizadas as seguintes concentrações: VD3 (1,34; 2,69; 5,38; 10,76; 21,52; 43,03 ou 86,06  $\mu M$ ), AZD (4,14; 8,28; 16,56; 33,13; 66,5; 132 ou 265  $\mu M$ ) e DXR (3,25; 6,5; 13; 26; 52; 104 ou 208  $\mu M$ ). No ensaio de 48 horas foram utilizadas as concentrações: VD3 (0,88; 1,75; 3,51; 7,01; 14,02; 28,04 ou 56,08

$\mu\text{M}$ ), AZD (2,69; 5,38; 10,77; 21,54; 43,07; 86,14 ou 172,28  $\mu\text{M}$ ) e DXR (0,34; 0,69; 1,38; 2,76; 5,51; 11,02 ou 22,04  $\mu\text{M}$ ).

Os valores do Índice de Combinação (CI) permitem identificar os tipos de interações de dose-efeito entre os compostos, *in vitro* (CHOU e TALALAY, 1984). O CI é calculado automaticamente por meio do software CompuSyn quantificando e determinando o tipo de interação farmacodinâmica sendo: sinérgica quando  $\text{CI} < 0,9$ , aditiva quando  $0,9 \leq \text{CI} \leq 1,1$ , ou antagônica quando  $\text{CI} > 1,1$  (CHOU, 2008).

O Índice de Redução de Dose (DRI) também foi calculado, o qual corresponde a um valor adimensional de quantas vezes a dose de cada composto, em combinação binária sinérgica, pode ser reduzida em uma determinada (*fa*), em comparação com as doses de cada tratamento com o composto isolado. Neste caso, **DRI** > 1 indica redução favorável de dose, **DRI** < 1 indica redução desfavorável de dose e **DRI** = 1 indica sem redução da dose (CHOU, 2006).

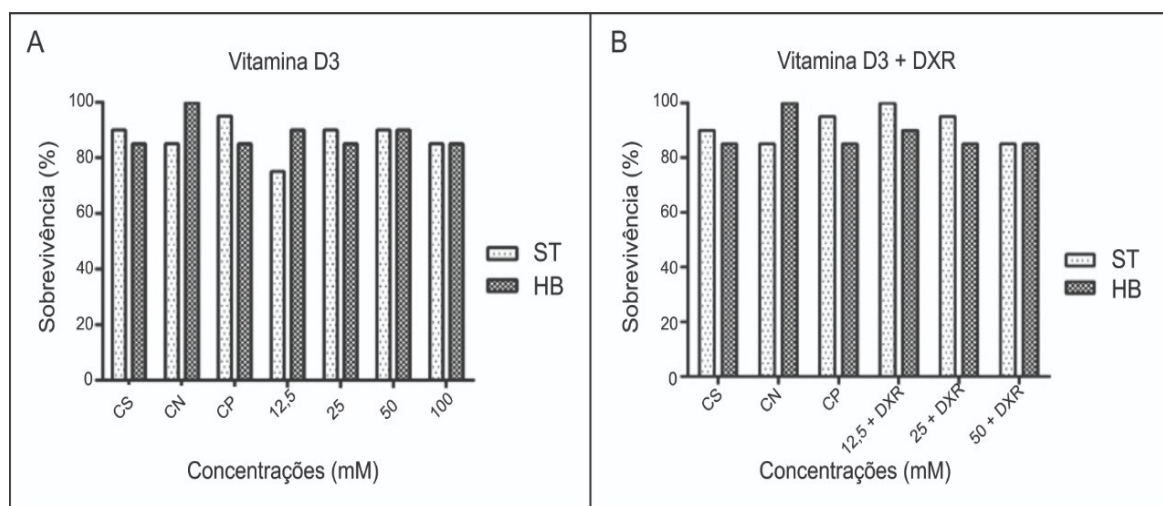
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART) EM ASAS

O SMART, teste *in vivo*, em asas de *D. melanogaster* foi realizado para avaliar o potencial mutagênico e recombinogênico da VD3 e seus possíveis efeitos moduladores em relação aos danos no DNA induzidos pela DXR.

As diferentes concentrações de VD3 usadas isoladamente ou em associação com DXR foram selecionadas com base em ensaios de sobrevivência com *Drosophila*. As taxas de sobrevivência (%) dos indivíduos resultantes dos cruzamentos ST e HB estão representadas na Figura 18.

**Figura 18.** Taxa de sobrevivência (%) de indivíduos resultantes dos cruzamentos ST e HB após exposição a diferentes concentrações de (A) VD3 (Vitamina D3 - mM) isolada; (B) VD3 em combinação com DXR (Doxorubicina – 0,4 mM). CS: Controle Solvente (Tween 80 a 1% + etanol a 3%); CN: Controle Negativo (água utltrapura); CP: Controle Positivo (DXR – 0,4 mM)



Os dados de sobrevivência validaram o uso de quatro concentrações (12,5; 25; 50 ou 100 mM) de VD3 isoladas e três concentrações de VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) em combinação com DXR, que foram testadas em dois experimentos independentes. Os dados foram agrupados após verificação de que não haviam diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre as repetições.

Os resultados para os descendentes de MH e BH, derivados do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de VD3 isoladamente ou em



combinação com DXR são mostrados na Tabela 1. Nos indivíduos MH, a VD3 isolada não mostrou mutagenicidade nas concentrações testadas. O tratamento com DXR, como esperado, induziu resultados positivos para todas as classes de manchas (simples pequena, simples grande e gêmea) quando comparadas ao controle negativo ( $p \leq 0,05$ ). A administração simultânea de VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) com DXR (0,4 mM) inibiu significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o número de manchas mutantes induzidas por DXR, em 33,79; 64,57 e 73,98%, respectivamente em comparação com DXR isolada.

Devido a importante redução observada em moscas tratadas simultaneamente com VD3 e DXR, também foram analisadas as asas dos descendentes de BH resultantes desses tratamentos. Com base na frequência de indução de clones por  $10^5$  células, comparou-se o número de manchas observadas nos indivíduos MH e BH e quantificada a contribuição (%) da mutação e recombinação para o número total de manchas observadas (FREI e WÜRGLER, 1996). A frequência de recombinação observada foi superior a 94% para todos os tratamentos.

**Tabela 1.** Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* na progênie heterozigota marcada (MH) e heterozigota balanceada (BH) resultante do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico de larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo)

Genótipos e Tratamentos (mM)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas); diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Mancha com clone <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência na formação de clones/10 <sup>5</sup> células por divisão <sup>d</sup>		Recombinação (%)	Inibição <sup>e</sup> (%)
		Mancha simples pequena (1-2 células) <sup>b</sup>	Mancha simples grande (>2 células) <sup>b</sup>	Mancha gêmea	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido		
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>										
Controle Negativo	40	0,95 (38)	0,03 (1)	0,00 (0)	0,98 (39)	37	1,90			
Controle Solvente	40	0,58 (23) -	0,18 (7) +	0,03 (1) i	0,78 (31) -	28	1,43	-0,47		
VD3 12,5	40	0,85 (34) i	0,05 (2) -	0,05 (2) i	0,95 (38) -	37	1,90	0,47		
VD3 25,0	40	0,80 (32) i	0,10 (4) -	0,00 (0) i	0,90 (36) -	36	1,84	0,41		
VD3 50,0	40	0,60 (24) -	0,05 (2) -	0,00 (0) i	0,65 (26) -	26	1,33	-0,10		
VD3 100,0	40	0,58 (23) -	0,05 (2) -	0,03 (1) i	0,65 (26) -	25	1,28	-0,15		
DXR 0,4	40	6,20 (248) +	8,60 (344) +	6,95 (278) +	21,75 (870) +	824	42,21	40,78	96,62	
VD3 12,5 + DXR 0,4	40	5,80 (232)	4,28 (171) *	4,20 (168) *	14,28 (571) *	555	28,43	27,00	99,26	33,79
VD3 25,0 + DXR 0,4	40	2,70 (108) *	2,88 (115) *	2,55 (102) *	8,13 (325) *	310	15,88	14,45	97,85	64,57
VD3 50,0 + DXR 0,4	40	2,93 (117) *	1,80 (72) *	1,45 (58) *	6,18 (247) *	235	12,04	10,61	94,15	73,98
<i>mwh/TM3</i>										
Controle Negativo	40	0,58 (23)	0,03 (1)	f	0,60 (24)	24	1,23			
DXR 0,4	40	1,03 (41) +	0,25 (10) +		1,28 (51) +	51	2,61	1,38		
VD3 12,5 + DXR 0,4	40	0,40 (16) *	0,10 (4)		0,50 (20) *	20	1,02	-0,20		
VD3 25,0 + DXR 0,4	40	0,33 (13) *	0,13 (5)		0,45 (18) *	18	0,92	-0,31		
VD3 50,0 + DXR 0,4	40	0,25 (10) *	0,05 (2) *		0,30 (12) *	12	0,61	-0,62		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e moscas heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988, 1995). Teste *U*; níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo;  $p \leq 0,05$  DXR vs. controle negativo; VD3 vs. controle solvente; \*, positivo;  $p \leq 0,05$  VD3 + DXR vs. DXR (0,4 mM) isolada.

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras

<sup>c</sup> Considerando clones de *mwh* de manchas simples e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Calculado como  $\{[DXR \text{ isolada} - DXR + VD3] / DXR\} \times 100$ , de acordo com Abraham (1994).

<sup>f</sup> Cromossomo balanceador TM3 não contém a mutação *flr*<sup>3</sup> e a recombinação é suprimida, devido às múltiplas regiões invertidas nesses cromossomos.

Os resultados do cruzamento de alta bioativação (HB) estão resumidos na Tabela 2. Os resultados obtidos com os indivíduos MH tratados apenas com VD3 foram negativos em todas as concentrações testadas quando comparados ao controle solvente. A DXR aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) todas as categorias de manchas quando comparadas ao controle negativo. A atividade recombinogênica foi a principal resposta, ao dano no DNA induzido por DXR (98,94%). Quando administrada em combinação com DXR, todas as concentrações de VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) foram responsáveis por reduzir significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o número de manchas induzidas por DXR. A taxa de inibição foi de, respectivamente, 45,25; 49,52 e 50,27%. Ao comparar o número de manchas observadas nos indivíduos MH e BH, constatou-se que as manchas induzidas ocorreram, principalmente, devido à recombinação, respectivamente, 95,13; 98,10 e 97,44%.

**Tabela 2.** Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* na progênie heterozigota marcada (MH) e heterozigota balanceada (BH) resultante do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico de larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo)

Genótipos e Tratamentos (mM)	Número de moscas	Manchas por mosca (número de manchas); diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Mancha com clone <i>mwh</i> <sup>c</sup>	Frequência na formação de clones/10 <sup>5</sup> células por divisão <sup>d</sup>		Recombinação (%)	Inibição <sup>e</sup> (%)
		Mancha simples pequena (1-2 células) <sup>b</sup>	Mancha simples grande (>2 células) <sup>b</sup>	Mancha gêmea	Total de manchas		Observado	Controle Corrigido		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>										
Controle Negativo	40	1,10 (44)	0,15 (6)	0,08 (3)	1,33 (53)	49	2,51			
Controle Solvente	40	1,15 (46) i	0,08 (3) i	0,13 (5) i	1,35 (54) -	51	2,61	0,10		
VD3 12,5	40	1,25 (50) -	0,15 (6) i	0,08 (3) i	1,48 (59) -	58	2,97	0,36		
VD3 25,0	40	1,10 (44) -	0,18 (7) i	0,05 (2) -	1,33 (53) -	53	2,72	0,10		
VD3 50,0	40	0,93 (37) -	0,08 (3) i	0,03 (1) -	1,03 (41) -	41	2,10	-0,51		
VD3 100,0	40	0,75 (30) -	0,15 (6) i	0,10 (4) i	1,00 (40) -	40	2,05	-0,56		
DXR 0,4	40	6,85 (274) +	10,20 (408) +	8,95 (358) +	26,00 (1040) +	988	50,61	48,00	98,94	
VD3 12,5 + DXR 0,4	40	5,40 (216) f*	4,73 (189) *	4,60 (184) *	14,73 (589) f*	564	28,89	26,28	95,13	45,25
VD3 25,0 + DXR 0,4	40	4,25 (170) f*	4,80 (192) *	4,65 (186) *	13,70 (548) *	524	26,84	24,23	98,10	49,52
VD3 50,0 + DXR 0,4	40	3,73 (149) *	4,90 (196) *	4,88 (195) *	13,50 (540) *	517	26,49	23,87	97,44	50,27
<i>mwh/TM3</i>										
Controle Negativo	40	0,95 (38)	0,15 (6)	f	1,10 (44)	44	2,25			
DXR 0,4	40	0,90 (36) -	0,45 (18) +		1,35 (54) -	54	2,77	0,51		
VD3 12,5 + DXR 0,4	40	1,48 (59) *	0,25 (10) i		1,73 (69) -	69	3,53	1,28		
VD3 25,0 + DXR 0,4	40	1,00 (40) -	0,33 (13) i		1,33 (53) -	53	2,72	0,46		
VD3 50,0 + DXR 0,4	40	1,18 (47) -	0,23 (9) i		1,40 (56) -	56	2,87	0,61		

Moscas trans-heterozigotas marcadas (*mwh/flr<sup>3</sup>*) e moscas heterozigotas balanceadas (*mwh/TM3*) foram avaliadas.

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988, 1995). Teste *U*; níveis de probabilidade: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo;  $p \leq 0,05$  DXR vs. controle negativo; VD3 vs. controle solvente; \*, positivo;  $p \leq 0,05$  VD3 + DXR vs. DXR (0,4 mM) isolada.

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras.

<sup>c</sup> Considerando clones de *mwh* de manchas simples e gêmeas.

<sup>d</sup> Frequência de formação de clones: clones/moscas/48.800 células (sem correção de tamanho).

<sup>e</sup> Calculado como  $\{[DXR \text{ isolada} - DXR + VD3] / DXR\} \times 100$ , de acordo com Abraham (1994).

<sup>f</sup> Cromossomo balanceador TM3 não contém a mutação *flr*<sup>3</sup> e a recombinação é suprimida, devido às múltiplas regiões invertidas nesses cromossomos.

Os resultados observados apenas com VD3, em ambos os cruzamentos (ST e HB), foram semelhantes. A VD3 não mostrou genotoxicidade nas concentrações utilizadas. Estudos da literatura revelam ausência de efeito mutagênico da VD3 em diferentes organismos e sistemas de teste, diferentes dos que fizemos. O SMD-502, um análogo da VD3, não se mostrou mutagênico em pele e em fígado de camundongos transgênicos *gpt* delta e nas células GDL1 (TAKEIRI *et al.*, 2012). Além disso, não houve relação geral entre 25(OH)D<sub>3</sub> e danos ao DNA em linfócitos humanos (NAIR-SHALLIKER *et al.*, 2012) e a suplementação com VD3 reduziu o estresse oxidativo e o dano ao DNA em pacientes com diabetes tipo 2 (FAGUNDES *et al.*, 2019). Não foi observada associação entre VD3 e dano ao DNA induzido por oxidação em linfócitos periféricos de adultos jovens (18 a 26 anos), mas a deficiência de VD3 foi altamente prevalente nos adultos jovens estudados e os autores não puderam descartar efeito de melhora de correção do déficit de VD3 no dano ao DNA (WANG *et al.*, 2016).

O controle positivo DXR induziu altas frequências de todos os tipos de manchas mutantes nos cruzamentos ST e HB. A comparação das frequências de manchas nas asas das moscas MH (genótipo *mwh/flr<sup>3</sup>*) e das moscas BH (genótipo *mwh/ TM3*) de ambos os cruzamentos ST e HB indicou que a recombinação foi a principal resposta para os tratamentos com DXR. Esses resultados são corroborados por investigações anteriores com DXR em *Drosophila* (VALADARES; GRAF; SPANÓ, 2008; DE REZENDE *et al.*, 2009; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A DXR apresenta diferentes mecanismos de danos ao DNA, como a ligação e a inibição da enzima topoisomerase II, uma girase de DNA com alta atividade em células proliferativas (KAISEROVÁ *et al.*, 2006; MARINELLO; DELCURATOLO; CAPRANICO, 2018). Além disso, a inibição efetuada pela droga anticâncer leva à instabilidade genética e causa biotransformação redutiva do anel quinona, produzindo um radical semiquinona, que tem efeito tóxico direto e/ou provoca reações redox (RAMJI *et al.*, 2003). A DXR também contribui para a produção de ERO, conferindo citotoxicidade secundária (GEWIRTZ, 1999; DOROSHOW, 2019).

A modulação de VD3 em células somáticas de *Drosophila*, avaliada nesse estudo, foi capaz de reduzir a frequência total de manchas mutantes induzidas por DXR em todas as concentrações, nos cruzamentos ST e HB. Assim, a VD3 foi

efetiva na redução do efeito mutagênico da DXR. Esses resultados reforçam os efeitos protetores da VD3 sobre os danos gerados pela DXR diretamente e após sua metabolização, como a formação de ERO.

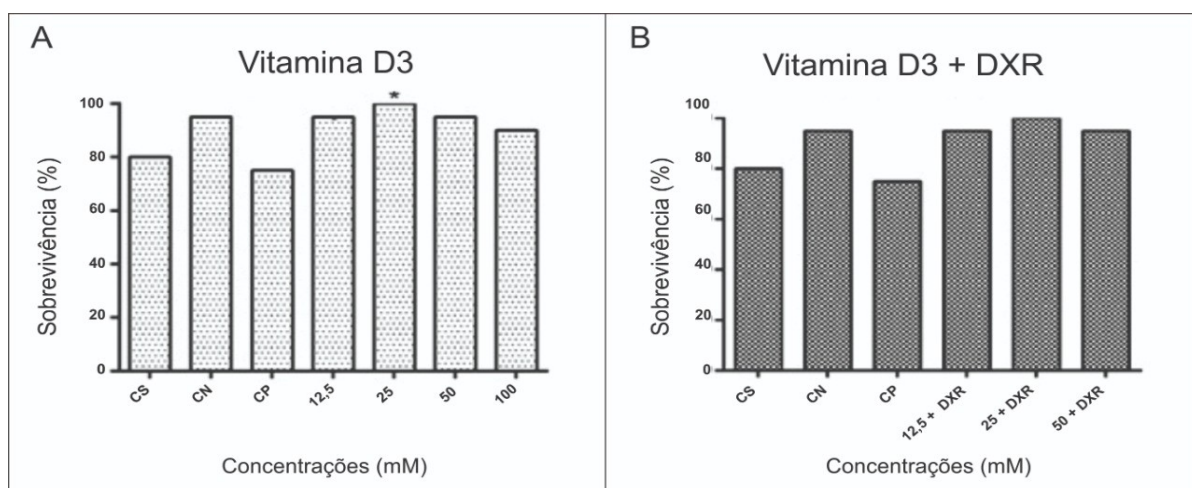
Mokhtari, Hekmatdoost e Nourian (2017) relataram o papel central da VD3 na supressão do complexo da enzima NADPH oxidase, que atua na formação de ERO. Tem sido demonstrado que a administração de VD3 reduz o dano ao DNA em camundongos diabéticos tipo 2 e a deficiência em VD3 foi associada a dano ao DNA em células mononucleares de pacientes asmáticos (WANG *et al.*, 2016). A literatura mostra efeitos controversos sobre a capacidade do VD3 de prevenir ou melhorar biomarcadores do estresse oxidativo (TAGLIAFERRI *et al.*, 2019).

A proteção contra a mutagenicidade induzida por DXR, observada na presente pesquisa, pode ser devida à inibição de radicais livres e ao aumento do status antioxidante.

## 4.2 TESTE DE TUMOR EPITELIAL (ETT)

Em *D. melanogaster*, o ETT foi realizado para avaliar o potencial carcinogênico de VD3 ou seu potencial anticarcinogênico quando associada à DXR. As diferentes concentrações de VD3 usadas isoladamente ou em combinação com DXR foram selecionadas com base em ensaios de sobrevivência (Figura 19).

**Figura 19.** Taxas de sobrevivência (%) de indivíduos resultantes do ETT após exposição a diferentes concentrações de (A) VD3 (vitamina D3 - mM) isoladamente; (B) VD3 em combinação com DXR (doxorrubicina - 0,4 mM). CS: Controle Solvente (1% de Tween + 3% de etanol); CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (DXR - 0,4 mM)





A Tabela 3 mostra a frequência de tumores nos segmentos do corpo de *D. melanogaster* tratadas com diferentes concentrações de VD3 isoladamente ou em combinação com DXR. As frequências totais de tumores observadas nos descendentes heterozigotos de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações de VD3 (12,5; 25; 50 ou 100 mM) não foram estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) quando comparadas à frequência observada no controle solvente. A maior frequência de tumores encontrada nos indivíduos tratados com DXR (0,4mM) foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparada à frequência no controle negativo. As frequências de tumor observadas nas moscas tratadas com VD3 (12,5; 25 ou 50 mM) em combinação com DXR foram significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) das frequências observadas naquelas tratadas apenas com DXR. A redução no número de tumores ocorreu perante o aumento das concentrações utilizadas.

**Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster* após tratamento crônico das larvas com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 - mM), água ultrapura (controle negativo), controle solvente e Doxorubicina 0,4 mM (DXR – controle positivo)

Tratamentos mM	Número de moscas	Frequência de tumores analisados (total de tumores)						Frequência de tumores	Redução (%)
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres		
Controle negativo	200	0,000 (00)	0,085 (17)	0,040 (08)	0,110 (22)	0,025 (05)	0,000 (00)	0,260 (52)	
Controle solvente	200	0,000 (00)	0,070 (14)	0,055 (11)	0,150 (30)	0,055 (11)	0,000 (00)	0,330 (66)	
VD3 12,5	200	0,000 (00)	0,050 (10)	0,030 (06)	0,080 (16)	0,045 (09)	0,000 (00)	0,205 (41)	
VD3 25,0	200	0,005 (01)	0,085 (17)	0,055 (11)	0,110 (22)	0,030 (06)	0,005 (01)	0,290 (58)	
VD3 50,0	200	0,000 (00)	0,050 (10)	0,030 (06)	0,130 (26)	0,010 (02)	0,015 (03)	0,235 (47)	
VD3 100,0	200	0,000 (00)	0,085 (17)	0,050 (10)	0,190 (38)	0,080 (18)	0,000 (00)	0,405 (81)	
Controle positivo	200	0,045 (09)	0,130 (26)	1,390 (278)	0,770 (154)	0,570 (114)	0,085 (17)	2,990 (598) *	
VD3 12,5 + DXR 0,4	200	0,015 (03)	0,055 (11)	0,305 (61)	0,435 (87)	0,210 (42)	0,045 (09)	1,065 (213) **	64,4
VD3 25,0 + DXR 0,4	200	0,030 (06)	0,050 (10)	0,210 (42)	0,425 (85)	0,145 (29)	0,015 (03)	0,875 (175) **	70,7
VD3 50,0 + DXR 0,4	200	0,010 (02)	0,035 (07)	0,140 (28)	0,290 (58)	0,140 (28)	0,005 (01)	0,620 (124) **	79,3

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann e Whitney.

\*, Diferente do controle negativo. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

\*\*, Diferente do controle positivo. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

Os resultados com VD3 isolada não mostraram carcinogenicidade nas doses utilizada. A vitamina foi capaz de reduzir significativamente a frequência de tumores induzidos pela DXR em todas as concentrações analisadas. Desta forma, os resultados revelam que a VD3 tem efeitos moduladores na carcinogenicidade induzida pela DXR.

A VD3, como pró-hormônio, sofre metabolismo em duas etapas, no fígado e nos rins, para produzir um metabólito biologicamente ativo, o calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]), que se liga ao VDR para a regulação da expressão de diversos genes (JEON e SHIN, 2018; ALMAIMANI *et al.*, 2019; EL-BOSHY *et al.*, 2019). O calcitriol é sintetizado a partir de um precursor de esteroide, colecalciferol ou pré-VD3, reconhecido como uma molécula semelhante aos antioxidantes da membrana celular, que é bioativada em duas etapas sob a ação do gene *CYP24A1*, resultando na formação de calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>) e calcitriol (WHEELER e NIJHOUT, 2003; SAKAKI *et al.*, 2014). O gene *CYP24A1*, encontrado em humanos, possui ortólogo em *D. melanogaster*, o *CYP12B2* (NCBI, 2020).

Nos vertebrados, foi descrita a existência de um VDR nuclear com capacidade intrínseca de ser ativado pelo calcitriol. Além desse metabólito ativo, o VDR é heterodimerizado pelo receptor X retinóide (RXR) e seu homólogo ultraspiracle (USP), encontrado em *D. melanogaster* (YAO *et al.*, 1992). Dela Cruz, Kirsch e Heinrich (2000) relatam ativação do VDR quando associado à USP, sem a necessidade de que esse receptor esteja sempre ligado ao metabólito ativo da VD3. Segundo Laudet *et al.* (1992) há estreita relação evolutiva do VDR e do receptor de ecdisona (EcR) encontrado em *D. melanogaster*, devido à semelhança no domínio de ligação ao ligante presente nesses dois receptores. O EcR possui três isoformas que, quando ativadas pelo USP e pelo hormônio esteroide 20-hidroxiecdisona, induzem a proliferação celular durante o período larval e a maturação durante o período pupal do inseto (DELA CRUZ, KIRSCH, HEINRICH, 2000; DELANOUE, SLAIDINA, LÉOPOLD, 2010). A sinalização pelo complexo EcR para a proliferação celular ocorre até o final do período larval, devido ao aumento gradual de 20-hidroxiecdisona e ao atingir o pico de ecdisona, novos genes serão ativados com a finalidade de maturação durante o período pupal (DELANOUE, SLAIDINA, LÉOPOLD, 2010; TSAO *et al.*, 2016).

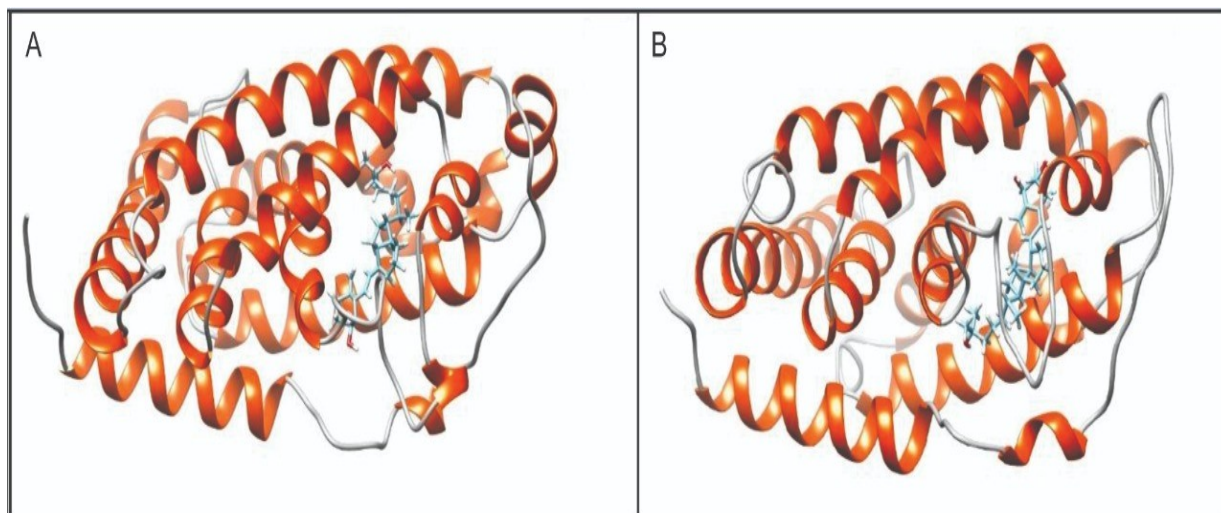
No presente estudo, para melhor compreensão das interações moleculares de VD3 e receptores, realizamos análise *in silico* com *docking* e dinâmica molecular, o que nos permitiu verificar uma interação estável entre calcitriol e EcR. Quando o VD3 foi testado por ETT, verificou-se que os períodos larval e pupal ocorreram no tempo regular, o que pode ser explicado pela interação favorável entre calcitriol e EcR. Desta forma, a inibição da carcinogênese pode ser atribuída ao metabólito ativo do VD3 que, ao final do período larval, deixou de induzir a proliferação celular, conforme descrito anteriormente por Sakaki *et al.* (2014).

Pawlowska, Wysokinski e Blasiak (2016) descreveram que a forma ativa da VD3 remove os danos ao DNA induzidos pela radiação ultravioleta (UV) em células pré-cancerosas, via reparo por excisão de nucleotídeos, o que reduz o processo de nitrosilação das enzimas de reparo do DNA. Estudos anteriores demonstraram que a VD3 pode apresentar propriedades oncoprotetoras, atuando na(o): (i) regulação do fator de crescimento, (ii) síntese e sinalização de citocinas, (ii) modulação da inflamação, (iii) proliferação e diferenciação celular, (iv) angiogênese, (v) potencial invasivo e metastático, (vi) apoptose e (vii) regulação da expressão do miRNA (HARRIS e GO, 2004; MERCHAN *et al.*, 2017). Revisão de literatura oferece análise atualizada dos papéis de VD3 e VDR na carcinogênese (MERCHAN *et al.*, 2017). Assim, o efeito modulador da VD3 sobre a carcinogenicidade induzida pela DXR apresentado neste trabalho, pode estar relacionado às diversas propriedades oncoprotetoras exercidas por esta vitamina.

#### 4.3 ANÁLISE *in silico*

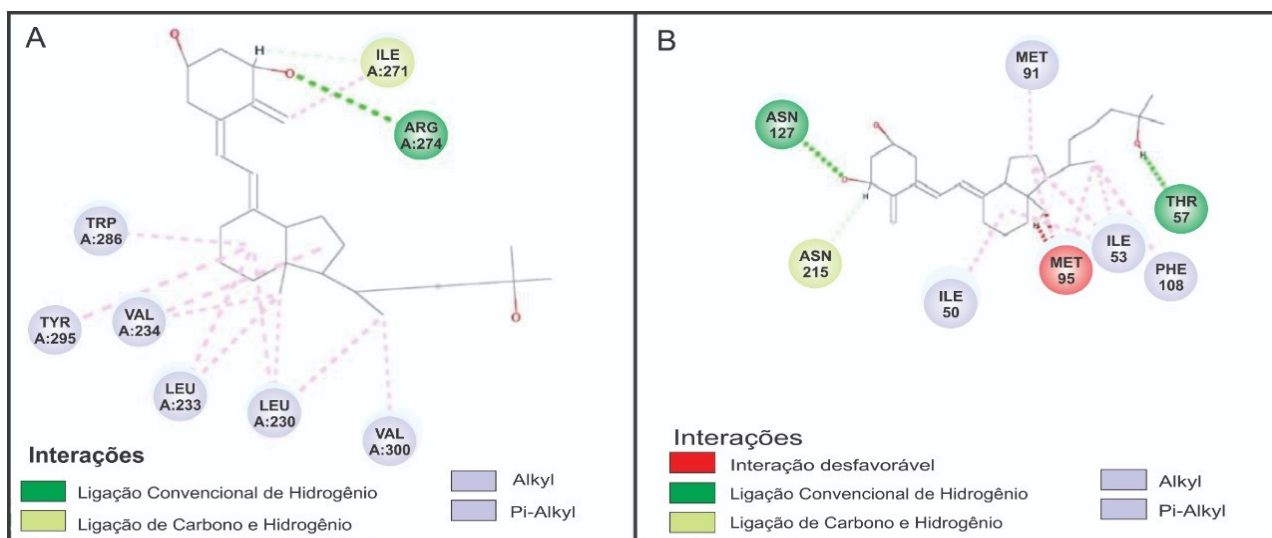
A Figura 20 apresenta o resultado da modelagem molecular e do *docking* entre o calcitriol (vitamina D ativa) e seu receptor de VDR (Fig. 20A) e entre o calcitriol e o receptor de ecdisona (EcR) (Fig. 20B). Verifica-se que o calcitriol, na proteína EcR, ocupa o local de ligação de forma invertida quando comparado com a proteína VDR.

**Figura 20.** Modelagem e *docking* molecular entre: (A) calcitriol (vitamina D ativa) e seu receptor VDR e em (B) calcitriol e o receptor de ecdisona (EcR)



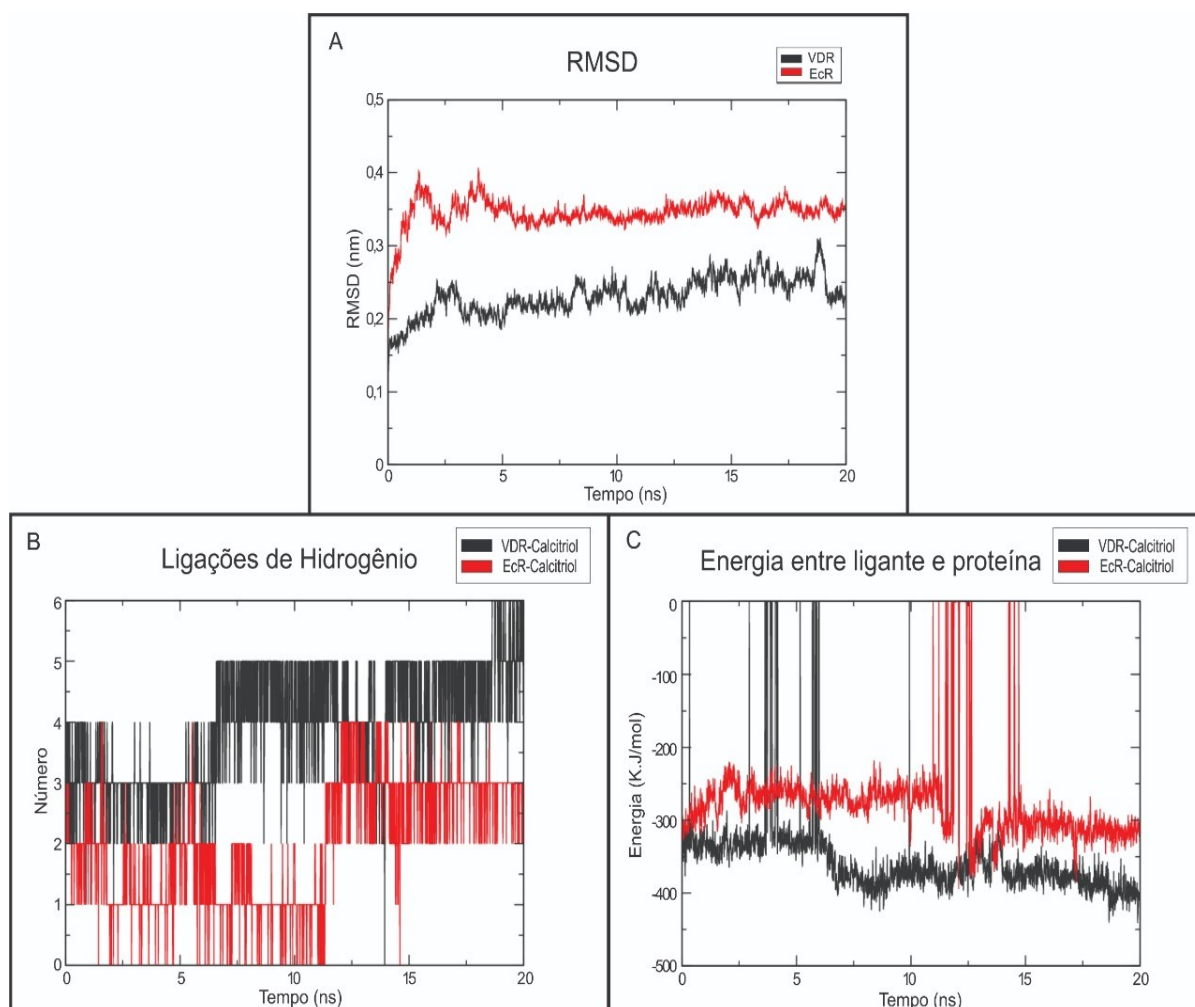
A Figura 21 ilustra um gráfico 2D das interações do ligante com proteínas receptoras, neste caso, entre calcitriol e VDR (Fig. 21A) e entre calcitriol e EcR (Fig. 21B). Nesse gráfico são mostradas, em **lilás**, as interações hidrofóbicas; em **verde**, as ligações de hidrogênio e em **vermelho**, as interações desfavoráveis. Apesar da interação desfavorável detectada entre calcitriol e EcR, os diagramas evidenciam a presença de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas essenciais para a estabilização do calcitriol no local de ligação.

**Figura 21.** Representação 2D de interações ligante-proteína: (A) Calcitriol e receptor VDR; (B) Calcitriol e o receptor de ecdisona (EcR). Interações hidrofóbicas (**lilás**); ligações de hidrogênio (**verde**) e interações desfavoráveis (**vermelho**)



A Figura 22 mostra a simulação da dinâmica molecular (DM) entre calcitriol e proteínas receptoras de VDR e EcR. A Figura 22A revela a estabilidade das proteínas, destacando-se que, para ambas, não há variação acentuada, principalmente, na segunda metade da simulação, indicando que as proteínas estão em equilíbrio com o sistema. A Figura 22B exibe as ligações de hidrogênio produzidas por calcitriol e proteínas, com resultado considerado satisfatório, pois durante os 20 nanossegundos da simulação essas ligações aumentaram, demonstrando maior estabilidade entre o calcitriol e os receptores. A Figura 29C mostra a medição da energia de ligação entre o ligante e a proteína. Em ambos os casos houve uma tendência de queda, destacando aumento na estabilidade de ambos os complexos proteína-ligante.

**Figura 22.** Simulação da dinâmica molecular entre calcitriol e proteínas. (A) Estabilidade proteica, VDR e EcR; (B) ligações de hidrogênio entre calcitriol e proteínas; (C) Energia entre ligante e proteínas

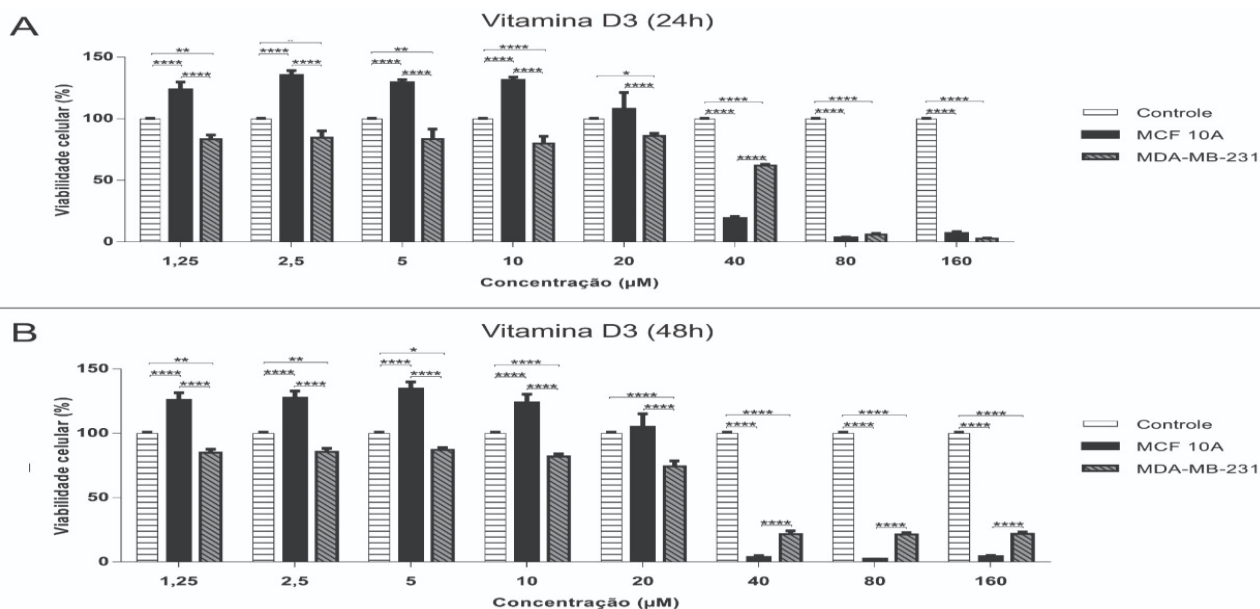


A análise *in silico* indica que, assim como na proteína receptora VDR, a ligação do calcitriol na proteína receptora EcR, apesar de estar em posição invertida quando comparada à VDR, prever fortes evidências de sua estabilidade com EcR, conforme demonstrado pelo *docking* e análise por DM. Essas considerações, de acordo com os dados experimentais, confirmam a possibilidade, em *D. melanogaster*, de transdução de sinal entre a forma ativa de VD3 (calcitriol) e o receptor de ecdisona, permitindo a ocorrência de diferentes eventos atribuídos a esse receptor em estágios distintos do ciclo de vida nesse organismo modelo.

#### 4.4 EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

O ensaio MTT investigou os efeitos da VD3, AZD2461 e DXR sobre a viabilidade das células MCF 10A (não-neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC), em tratamentos independentes de 24 e 48 horas. As concentrações utilizadas para os dois ensaios foram as mesmas para VD3, AZD2461 e DXR, a saber, 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; ou 160  $\mu$ M. A figura 23 mostra os resultados da viabilidade celular em relação à VD3; sendo o ensaio de 24 horas representado pela figura 23A e o ensaio de 48 horas representado pela figura 23B.

**Figura 23.** Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com VD3, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas



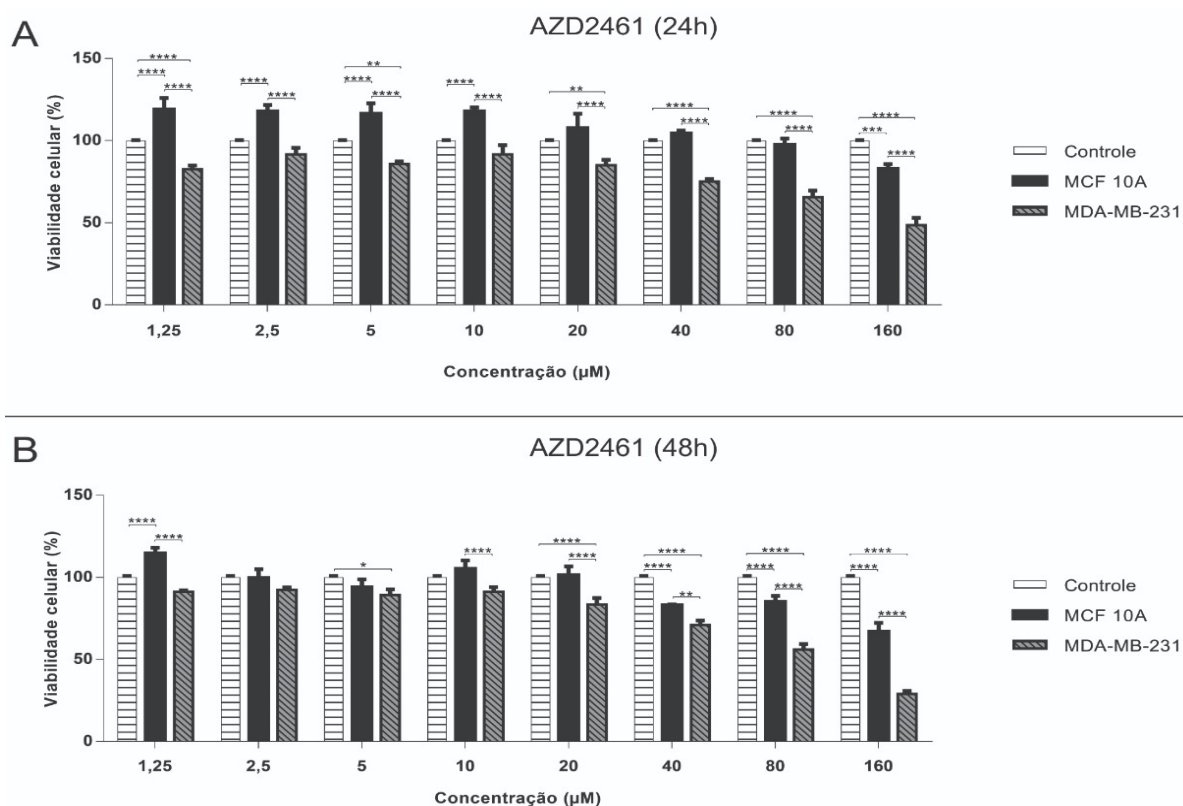
Para a VD3, as concentrações de 1,25; 2,5; 5 ou 10µM induziram, significativamente ( $p<0,05$ ), a proliferação da linhagem MCF 10A, após 24 e 48 horas de tratamento. Após esses dois períodos, a VD3 apresentou comportamento seletivo, se mostrando citotóxica à linhagem MDA-MB231 nas concentrações de 1,25 a 20 µM. A partir de 40µM a viabilidade da linhagem MCF 10A foi comprometida a mais de 50%, apesar da MDA-MB-231 se mostrar sensível ao tratamento.

Em consonância com nossos resultados, estudos anteriores observaram que a VD3 pode estimular o crescimento celular (ODA *et al.*, 2018; PATRIA *et al.*, 2019; ODA e BIKLE, 2020). Esse comportamento pode ser atribuído à ativação, pela VD3, da via de sinalização  $\beta$ -catenina, responsável pela progressão do ciclo celular e estímulo do crescimento celular (ODA *et al.*, 2018; ODA e BIKLE, 2020). Já a citotoxicidade verificada a partir de 40 µM pode decorrer da regulação negativa da expressão da enzima piruvato carboxilase, responsável pela produção de glicose, mediada pela VD3, conforme publicado por Sheeley, Teegarden e Wong (2019). Lee *et al.* (2007) também demonstraram a inibição do crescimento desta linhagem em função da ativação da via da Proteína quinase C alfa (PKC $\alpha$ ) pela VD3. Para a linhagem MDA-MB-231, Santos *et al.* (2018) relataram a citotoxicidade da VD3 pela redução da captação de glicose e regulação negativa da expressão de enzimas glicolíticas. Esses autores mencionaram que a VD3 induziu a ativação da via AMPK e a regulação negativa da via mTOR, conduzindo à apoptose. Contudo, essa linhagem também pode resistir à morte celular, como descrito por Brosseau, Pirianov e Colston (2010), em que a baixa atividade da via MAPK, induzida pela VD3, pode estar associada à resistência da linhagem MDA-MB-231 à apoptose.

A Figura 24 mostra os resultados do efeito de AZD2461 na viabilidade celular nas linhagens de mama citadas anteriormente, onde o ensaio de 24 horas está representado na Figura 24A e o ensaio de 48 horas, na figura 24B.



**Figura 24.** Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com AZD2461, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto químico foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas



O composto AZD, nas concentrações de 1,25; 2,5; 5 e 10 µM do ensaio de 24 horas, também induziu a proliferação da MCF 10A ( $p < 0,05$ ). Após 48 horas isso ocorreu apenas na menor concentração (1,25µM). Sugerimos que a linhagem MCF 10A, quando exposta a concentrações reduzidas de AZD, apresentou danos do tipo DSBs até o limiar de tolerância, seguido do reparo por recombinação homóloga. Nesse contexto, houve um aumento da demanda metabólica para o reparo dos danos causados pelas concentrações reduzidas desse composto.

Para a linhagem TNBC MDA-MB-231, o AZD foi seletivo. Este comportamento foi mais proeminente no ensaio de 24 horas; pois a viabilidade dessa linhagem foi diminuída em todas as concentrações testadas. Quando o composto foi administrado a 80 µM houve uma redução da viabilidade da MCF 10A e MDA-MB-231 de 2,5% e 34,5%, respectivamente, após 24 horas, e de 15% e 44%, respectivamente, após 48 horas.

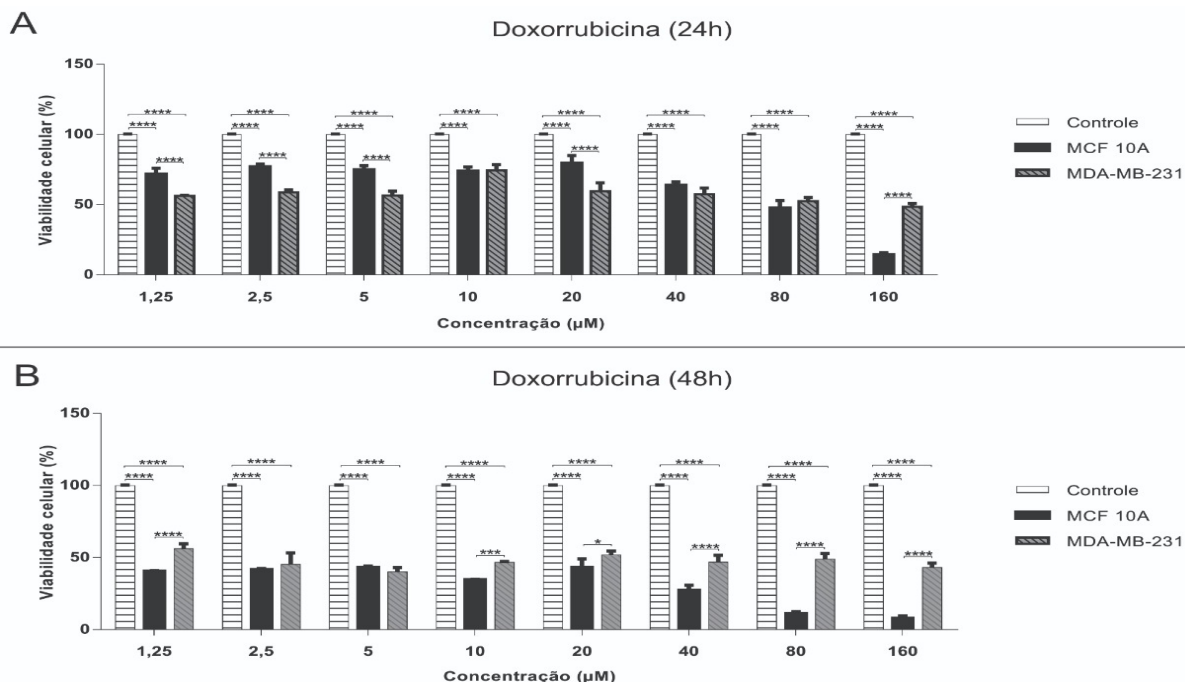
Estudos revelam que o AZD apresenta respostas tão eficazes quanto seu precursor, o Olaparibe, no que se refere ao potencial de inibição de PARP1 e PARP2 (OPLUSTIL O'CONNOR *et al.*, 2016; KEUNG, WU, VADGAMA, 2019). Segundo Zhao *et al.* (2018) as ações do Olaparibe são (i) indução na quebra da fita dupla do DNA (DSB), corroborado por Dubois *et al.* (2020); (ii) indução da clivagem de PARP, corroborado por Zhao *et al.* (2019); (iii) bloqueio do reparo por excisão de bases; (iv) inibição da recombinação homóloga; (v) inibição da progressão do ciclo celular, corroborado por Michelena *et al.* (2018) e (vi) indução do reparo sujeito a erros (NHEJ), corroborado por Clements *et al.* (2019). Esses efeitos são evidentes em linhagens mutantes para os genes *BRCA*. Contudo, Zhao *et al.* (2018) e Dubois *et al.* (2020). Observaram na linhagem MDA-MB-231 níveis reduzidos na expressão da proteína de reparo de recombinação homóloga RAD51, presumindo comprometimento da recombinação homóloga mimetizado pela perda de *BRCA1/2* e, conseqüentemente, expressão do fenótipo de BRCAness. Sugerimos que a seletividade do AZD contra a linhagem MDA-MB-231 pode ser decorrente da deficiência dos mecanismos de reparo aos danos causados por este composto ao DNA, resultando em morte celular dessa linhagem de TNBC BRCAness (ZHAO *et al.*, 2018; DUBOIS *et al.*, 2020).

Concentrações mais elevadas de AZD podem causar DSBs acima do limiar de tolerância a danos, o que justifica a citotoxicidade do composto à MCF 10A nas concentrações de 80 e 160  $\mu$ M. Nessas condições, a linhagem MCF 10A, mesmo possuindo reparo por recombinação homóloga funcional, este foi insuficiente para manutenção de sua viabilidade, conforme já relatado por Oplustil O'Connor *et al.* (2016).

Finalmente, os resultados para o tratamento das linhagens com DXR estão apresentados na Figura 25, onde o ensaio de 24 horas está representado na Figura 25A e o ensaio de 48 horas, na figura 25B. Nos dois períodos de incubação (24 e 48 horas) foi observada significativa ( $p < 0,05$ ) citotoxicidade da DXR em ambas linhagens, sendo este evento mais expressivo no ensaio de 48 horas. A DXR não foi seletiva à MDA-MB-231, comprometendo a viabilidade da MCF 10A, sobretudo quando administrada a 160  $\mu$ M. Diferentes mecanismos de ação da DXR são relacionados à regulação negativa do crescimento celular, como a inibição da enzima topoisomerase II, essencial na replicação do DNA, além da quelação do

ferro, elemento importante para a síntese de DNA, transporte mitocondrial de elétrons e detecção de oxigênio (PATEL e THAKKAR, 2014).

**Figura 25.** Viabilidade celular (%) de linhagens de mama tratadas com DXR, realizada por ensaio MTT. A citotoxicidade do composto químico foi avaliada em MCF 10A (não neoplásica) e MDA-MB-231 (TNBC). Em (A) período de incubação de 24 horas, em (B) período de incubação de 48 horas



A Tabela 4 sumariza os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos testados (VD3, AZD e DXR). Menores valores foram observados após 48 horas de tratamento. A DXR foi o composto mais citotóxico, contudo, não seletivo. Importante salientar que a resistência a esse quimioterápico é um dos principais problemas enfrentados no tratamento do câncer de mama. Marinello *et al.* (2019) associaram a via de sinalização TGF-β1 à adaptação das linhagens MFC-7 e MDA-MB-231 contra apoptose e estresse oxidativo gerado pela DXR. Também já foi descrito na literatura que a linhagem MDA-MB-231, quando exposta a concentrações reduzidas de Olaparibe, a longo prazo, apresenta atividade clonogênica (DUBOIS *et al.*, 2020). Segundo Clairmont *et al.* (2020) a resistência da linhagem de câncer de mama SUM149PT ao Olaparibe pode estar associada à regulação negativa da via NHEJ. Nesse contexto, o estudo de combinações farmacológicas é mandatório na busca de tratamentos otimizados contra os mais variados tumores, incluindo o TNBC.

**Tabela 4.** Valores calculados da IC<sub>50</sub> para os compostos Vitamina D3 (VD3 - µM), AZD2461 (AZD - µM) e Doxorrubicina (DXR - µM). Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas e a viabilidade avaliada pelo método MTT em linhagem celular de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB-231) e linhagem celular de mama não neoplásica (MCF 10A)

Tratamento único	IC <sub>50</sub> (µM)			
	24 h		48 h	
	MCF 10A	MDA-MB-231	MCF 10A	MDA-MB-231
VD3	37,11	43,03	34,67	28,04
AZD	ND1	132,5	ND1	86,14
DXR	51,93	104,0	ND2	11,02

ND1 – Não determinado > 160 µM

ND2 – Não determinado < 1,25 µM

#### 4.5 PARÂMETROS DE DOSE-EFEITO DOS COMPOSTOS ISOLADOS EM LINHAGEM TNBC

A partir do dobro da IC<sub>50</sub> foram definidas sete concentrações em diluição seriada para um novo ensaio de MTT com os compostos individuais. Foi calculada a (*fa*) e, posteriormente, utilizando o software CompuSyn, foram determinados os parâmetros (*m*), (*Dm*) e (*r*), para a linhagem TNBC MDA-MB-231.

As concentrações de todos os compostos, nos ensaios de 24 e 48 horas, inibiram o crescimento celular (*fa*) de maneira dose dependente (Tabela 5). O parâmetro dose-efeito (*m*) manteve o comportamento individual, nos dois períodos de incubação, sendo VD3 e AZD com (*m*>1), enquanto a DXR com (*m*<1); índices que estão coerentes com a maioria dos sistemas biológicos.

No ensaio de 24 horas, os valores de *Dm* da VD3, AZD e DXR foram, respectivamente, 31,1922; 81,6844 e 447,946 µM. A VD3 se mostrou o composto mais potente contra a linhagem MDA-MB-231. No ensaio de 48 horas, os valores da VD3, AZD e DXR foram, respectivamente, 15,9352; 66,5327 e 2,60743 µM; sendo a DXR mostrou ser o composto mais potente.

**Tabela 5.** Parâmetros de dose-efeito e resumo dos resultados com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 -  $\mu\text{M}$ ), AZD2461 (AZD -  $\mu\text{M}$ ) e Doxorubicina (DXR -  $\mu\text{M}$ ) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativa (MDA-MB -231). Tratamentos únicos foram realizados por 24 e 48 horas

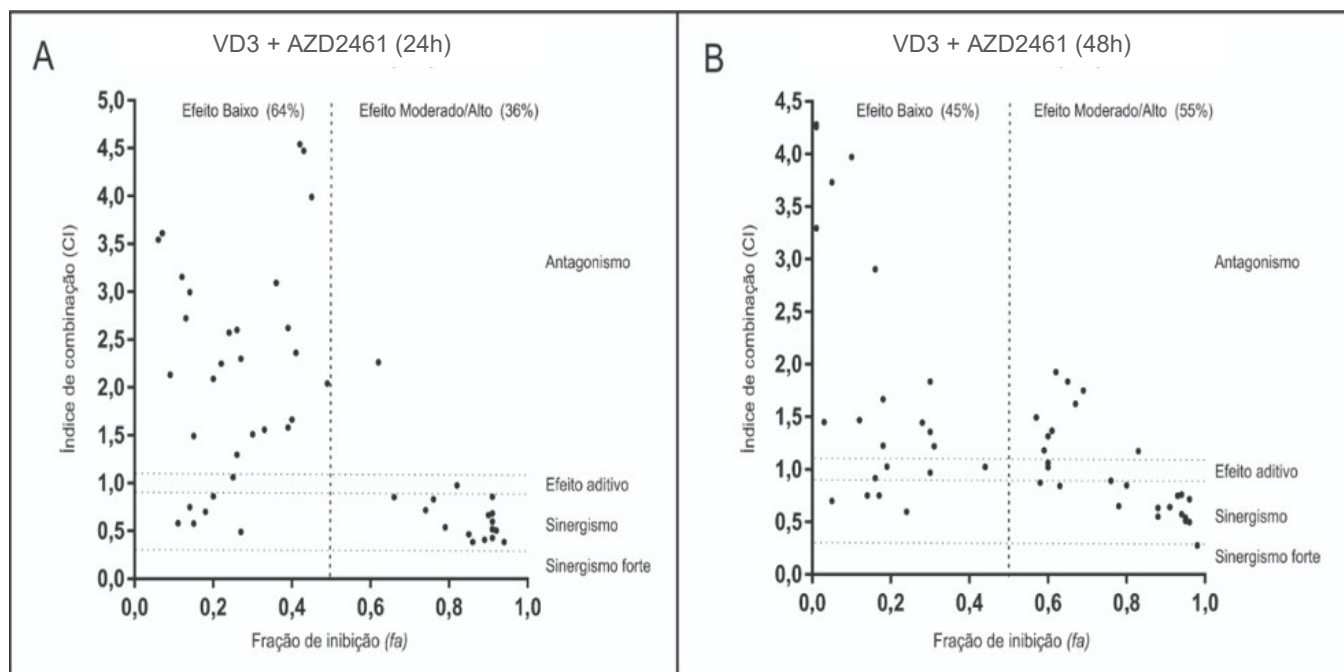
Período: após 24 horas							Período: após 48 horas						
Tratamento único ( $\mu\text{M}$ )			Fração de Inibição ( <i>fa</i> )	Parâmetros			Tratamento único ( $\mu\text{M}$ )			Fração de Inibição ( <i>fa</i> )	Parâmetros		
VD3	AZD	DXR		m	Dm	r	VD3	AZD	DXR		m	Dm	r
86,06			0,92	1,37187	31,1922	0,93566	56,08			0,94	1,50520	15,9352	0,96350
43,03			0,50				28,04			0,59			
21,52			0,19				14,02			0,29			
10,76			0,11				7,01			0,20			
5,38			0,11				3,51			0,08			
2,69			0,08				1,75			0,08			
1,34			0,01				0,88			0,01			
	265,00		0,89	1,03371	81,6844	0,94690		172,28		0,80	1,44746	66,5327	0,99660
	132,50		0,51					86,14		0,55			
	66,25		0,35					43,07		0,35			
	33,13		0,23					21,54		0,21			
	16,56		0,11					10,77		0,07			
	8,28		0,12					5,38		0,02			
	4,14		0,06					2,69		0,01			
		208,00	0,50	0,06868	447,946	0,84080			22,04	0,71	0,41245	2,60743	0,97762
		104,00	0,47						11,02	0,60			
		52,00	0,46						5,51	0,60			
		26,00	0,45						2,76	0,56			
		13,00	0,41						1,38	0,41			
		6,50	0,45						0,69	0,37			
		3,25	0,42						0,34	0,29			

#### 4.6 ANÁLISE DE INTERAÇÕES FARMACODINÂMICAS

A análise das interações farmacodinâmicas, *in vitro*, entre VD3, AZD e DXR, segundo o método Chou-Talalay, foi realizada em combinações binárias de razão não constante entre os três compostos testados na linhagem MDA-MB-231. Considerando os dados experimentais reais, o CI foi calculado automaticamente, quantificando e determinando o tipo de interação farmacodinâmica entre VD3, AZD e DXR, sendo esta sinérgica ( $CI < 0.9$ ), aditiva ( $0.9 \leq CI \leq 1.1$ ) ou antagônica ( $CI > 1.1$ ).

A Figura 26 apresenta os resultados da combinação entre VD3 + AZD2461; sendo o ensaio de 24 horas representado pela figura 26A e o ensaio de 48 horas representado pela figura 26B.

**Figura 26.** Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação **VD3 + AZD2461** em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas



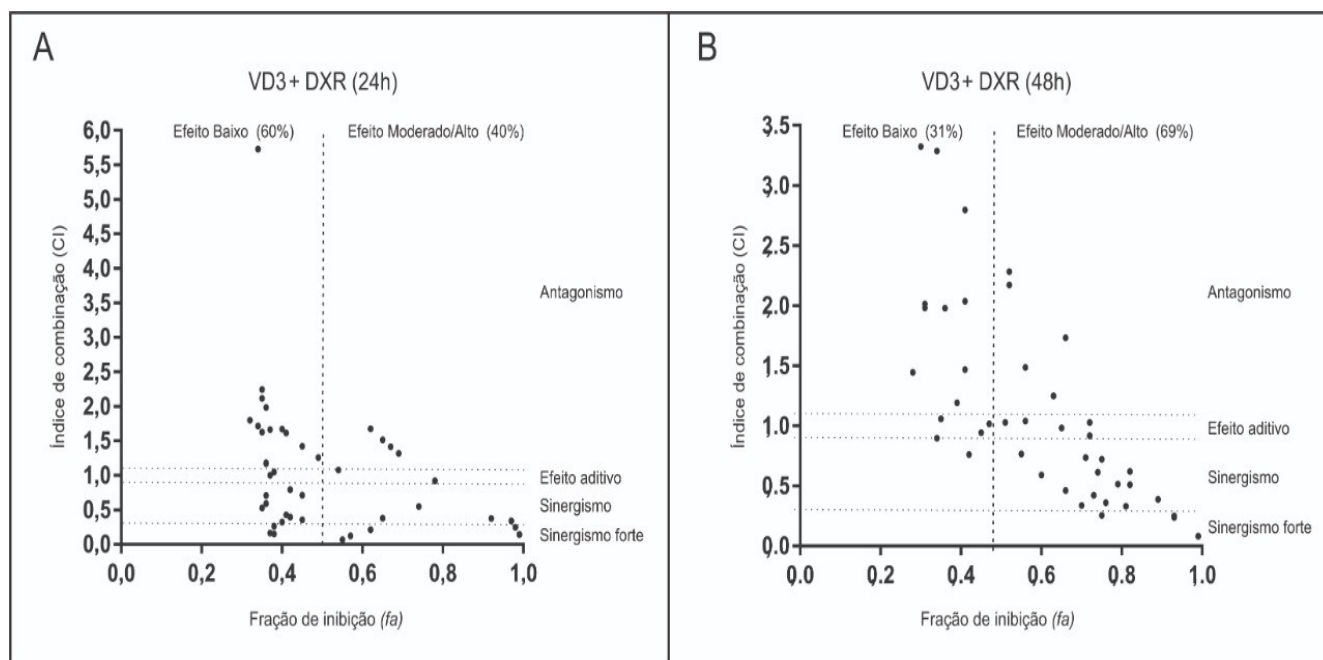
Após 24 horas de tratamento foram identificadas: (i) vinte e duas combinações sinérgicas, sendo dezesseis com efeito moderado/alto e seis com efeito baixo; (ii) duas combinações aditivas, sendo uma com efeito moderado/alto e uma com efeito baixo e (iii) vinte e cinco combinações antagônicas, sendo uma

com efeito moderado/alto e vinte e quatro com efeito baixo. No ensaio de 48 horas verificou-se (i) vinte combinações sinérgicas, sendo dezesseis com efeito moderado/alto e quatro com efeito baixo. Destas combinações sinérgicas, uma apresentou sinergismo forte com efeito moderado/alto; (ii) seis combinações aditivas, sendo duas com efeito moderado/alto e quatro com efeito baixo e (iii) vinte e três combinações antagônicas, sendo nove com efeito moderado/alto e quatorze com efeito baixo.

Sugerimos que a atividade sinérgica entre VD3 e AZD2461 seja decorrente da ativação da via AMPK na linhagem MDA-MB-231. Esta é acompanhada da regulação negativa da via de sobrevivência mTOR e, portanto, inibe o crescimento celular (WICKI e HAGMANN, 2011). Esses mecanismos foram descritos nos trabalhos de Santos *et al.* (2018) que utilizaram VD3 contra a linhagem MDA-MB-231 e por Hijaz *et al.* (2016) que cultivaram células de câncer de ovário com Olaparibe. Entretanto, o sinergismo e/ou a aditividade podem ser atribuídos a vias distintas induzidas por estes dois compostos como a inibição da via Proteína quinase B (Akt)/mTOR pela VD3, conforme descrito por Han *et al.* (2019) e a clivagem de PARP1 causada pelo AZD2461, conforme resultados de Oplustil O'Connor *et al.* (2016) e Zhao *et al.* (2019). Finalmente, compostos em sinergismo podem ativar uma terceira via e, caso isso tenha acontecido, necessita ser posteriormente elucidado.

A Figura 27 expressa os resultados da combinação entre VD3 + DXR; sendo o ensaio de 24 horas representado pela figura 27A e o ensaio de 48 horas representado pela figura 27B. Após 24 horas foram identificadas as seguintes combinações (i) vinte e cinco sinérgicas, sendo treze com efeito moderado/alto e doze com efeito baixo. Destas, sete apresentaram sinergismo forte com efeito moderado/alto; (ii) quatro aditivas, sendo duas com efeito moderado/alto e duas com efeito baixo e (iii) vinte antagônicas, sendo quatro com efeito moderado/alto e dezesseis com efeito baixo. No ensaio de 48 horas foram observadas (i) vinte e seis combinações sinérgicas, sendo vinte e quatro com efeito moderado/alto e duas com efeito baixo. Destas combinações sinérgicas, dez apresentaram sinergismo forte com efeito moderado/alto; (ii) oito combinações aditivas, sendo cinco com efeito moderado/alto e três com efeito baixo e (iii) quinze combinações antagônicas, sendo cinco com efeito moderado/alto e dez com efeito baixo.

**Figura 27.** Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação **VD3 + DXR** em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas



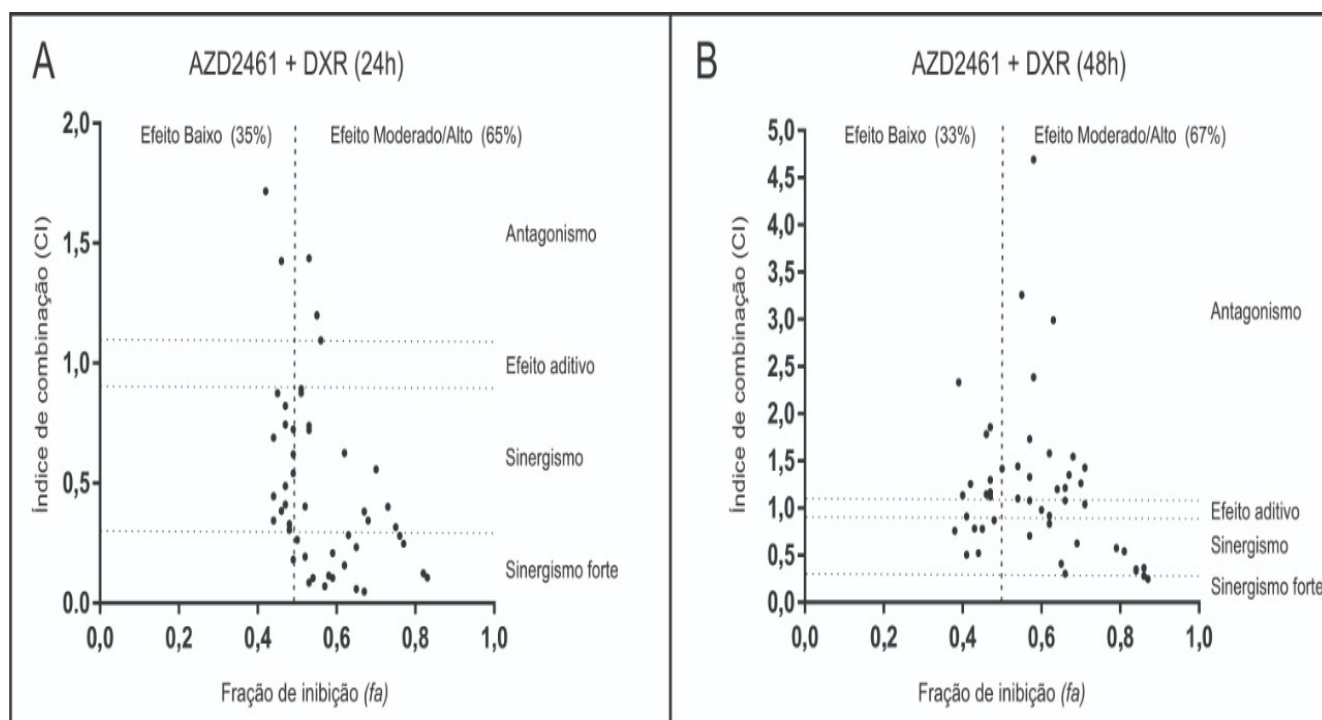
Zhang *et al.* (2020) descrevem os efeitos da DXR contra células de camundongos C57BL, por meio da inibição dessa via, da via Akt/mTOR, a qual também é alvo da VD3, resultando em queda na proliferação celular. Corroborando nossos resultados, Maayah *et al.* (2018) relataram a atuação da combinação da VD3 + DXR na inibição do crescimento celular dependente da via Akt/mTOR, em linhagem de osteossarcoma MG63. Além disso, a apoptose também pode ter ocorrido após a inibição da glicólise ocasionada pela VD3, como descrito por Santos *et al.* (2018) e em decorrência do stress oxidativo mediado pela DXR (MAAYAH *et al.*, 2018; ANTONUCCI *et al.*, 2020).

A Figura 28 mostra os resultados da combinação entre AZD2461 + DXR; sendo o ensaio de 24 horas representado pela figura 28A e o ensaio de 48 horas representado pela figura 28B. No ensaio de 24 horas foram observadas: (i) quarenta e três combinações sinérgicas, sendo vinte e oito com efeito moderado/alto e quinze com efeito baixo. Destas combinações sinérgicas, dezoito apresentaram sinergismo forte e efeito moderado/alto; (ii) uma combinação aditiva com efeito moderado/alto e (iii) cinco combinações antagônicas, sendo três com efeito moderado/alto e duas com efeito baixo. No ensaio de 48 horas verificou-se



(i) dezoito combinações sinérgicas, sendo doze com efeito moderado/alto e seis com efeito baixo. Destas duas combinações apresentaram sinergismo forte e efeito moderado/alto; (ii) seis combinações aditivas, sendo cinco com efeito moderado/alto e uma com efeito baixo e (iii) vinte e cinco combinações antagônicas, sendo dezesseis com efeito moderado/alto e nove com efeito baixo.

**Figura 28.** Distribuição dos valores do Índice de Combinação em função do efeito anti-proliferativo da combinação **AZD2461 + DXR** em linhagem de mama MDA-MB-231. (A) Período de incubação de 24 horas; (B) período de incubação de 48 horas



A literatura descreve a instabilidade genômica por DSBs como resultante dos mecanismos de ação do AZD, com a estabilização do complexo PARP-DNA ou “PARP trapping” (OPLUSTIL O’CONNOR *et al.*, 2016; KEUNG, WU, VADGAMA, 2019; LUO *et al.*, 2020) e da DXR, com a inibição da topoisomerase II (NITISS, 2009; PATEL e THAKKAR, 2014). Park *et al.* (2018) apresentaram resultados do cotratamento com DXR e Olaparibe, o qual aumentou o índice de apoptose em células de osteossarcoma (U2OS), com elevação dos níveis de PARP1 clivada, caspase 3 clivada, da proteína pró-apoptótica BAX e redução na expressão da proteína anti-apoptótica BCL2. É possível, então, sugerir que AZD e DXR atuam sinergicamente na indução de DSBs e, consequentemente, na indução da apoptose

na linhagem TNBC e BRCAness, MDA-MB-231 (ZHAO *et al.*, 2018; DUBOIS *et al.*, 2020). Além disso, a DXR apresenta efeito tóxico direto e indireto, gerando ambiente de estresse oxidativo severo, responsável por aumentar o quadro de instabilidade genômica e induzir vias pró-apoptóticas (DOROSHOW, 2019; ANTONUCCI *et al.*, 2020), justificando os efeitos efeito moderado/alto de suas combinações.

A Tabela 6 mostra os resultados da análise do método Chou-Talalay utilizando diferentes concentrações de VD3 + AZD2461 contra a linhagem MDA-MB-231, após período de 48 horas de tratamento em combinações binárias. As combinações binárias foram associadas aos níveis das interações farmacodinâmicas e ao parâmetro DRI, que foi calculado pelo CompuSyn. É interessante destacar as seguintes combinações, com redução nas concentrações e efeito moderado/alto: (i) duas combinações aditivas com efeito 0,60, sendo (1) 1,75VD3 x 86,14AZD e (2) 0,88VD3 x 86,14AZD; (ii) cinco combinações sinérgicas com efeitos entre 0,78 e 0,91, sendo (1) 28,04VD3 x 86,14AZD, (2) 14,02VD3 x 86,14AZD, (3) 28,04VD3 x 43,07AZD, (4) 28,04VD3 x 21,54AZD e (5) 14,02VD3 x 43,07AZD. Em todas as combinações sinérgicas, o valor do DRI foi favorável à redução de dose.

**Tabela 6.** Resumo dos resultados do método Chou-Talalay com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 -  $\mu\text{M}$ ) e AZD2461 (AZD -  $\mu\text{M}$ ) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), após 48 horas de tratamento com combinações binárias

Combinações binárias ( $\mu\text{M}$ )		Fração de inibição (fa)	Parâmetros			Interações farmacodinâmicas		
VD3	AZD		CI	DRI (VD3)	DRI (AZD)	Sinergismo	Aditividade	Antagonismo
56,08	172,28	0,96	0,71425	2,34700	3,47008	++		
28,04		0,93	0,74916	3,16896	2,30626	++		
14,02		0,83	1,17269	3,25920	1,15491			-
7,01		0,69	1,74834	3,86810	0,67122			---
3,51		0,65	1,83435	6,84955	0,59229			---
1,75		0,62	1,92569	12,6058	0,54161			---
0,88		0,67	1,62201	28,9873	0,62992			---
56,08	86,14	0,94	0,75912	1,76787	5,16889	++		
28,04		0,91	0,64014	2,64321	3,81953	+++		
14,02		0,80	0,84712	2,85494	2,01267	++		
7,01		0,60	1,31442	2,97597	1,02208			--
3,51		0,59	1,17981	5,78183	0,99319			-
1,75		0,60	1,06228	11,9209	1,02208		+-	
0,88		0,60	1,02058	23,7063	1,02208		+-	
56,08	43,07	0,96	0,49812	2,34700	13,8803	+++		
28,04		0,88	0,63175	2,13528	6,11880	+++		
14,02		0,78	0,64951	2,63507	3,70347	+++		
7,01		0,58	0,87296	2,81689	1,93065	+		
3,51		0,44	1,02325	3,86784	1,30768		+-	
1,75		0,30	1,35524	5,18620	0,86028			--
0,88		0,31	1,21911	10,6418	0,88878			--
56,08	21,54	0,95	0,53995	2,00959	23,6176	+++		
28,04		0,88	0,55006	2,13528	12,2348	+++		
14,02		0,63	0,84192	1,61871	4,46144	++		
7,01		0,28	1,44559	1,21377	1,60847			--
3,51		0,30	0,96808	2,58571	1,72015		+-	

Continua na próxima página

Combinações binárias (µM)		Fração de inibição (fa)	Parâmetros			Interações farmacodinâmicas		
VD3	AZD		CI	DRI (VD3)	DRI (AZD)	Sinergismo	Aditividade	Antagonismo
1,75	21,54	0,18	1,22368	3,32513	1,08349			--
0,88		0,19	1,02631	6,91042	1,13430		+ -	
56,08	10,77	0,98	0,27618	3,77099	90,8901	+++ +		
28,04		0,76	0,89116	1,22226	13,6983	+		
14,02		0,30	1,83543	0,64735	3,44030			---
7,01		0,18	1,66615	0,83010	2,16699			---
3,51		0,12	1,46880	1,20830	1,55960			---
1,75		0,24	0,59514	4,23387	2,78593	+++		
0,88		0,14	0,75179	5,42138	1,76263	++		
56,08	5,38	0,95	0,50819	2,00959	94,5581	+++		
28,04		0,61	1,36661	0,76497	16,8447			--
14,02		0,16	2,90177	0,37771	3,93296			---
7,01		0,05	3,72942	0,32143	1,61736			----
3,51		0,16	0,91708	1,50870	3,93296		+ -	
1,75		0,01	4,25948	0,43002	0,51706			----
0,88		0,03	1,44872	1,79853	1,12018			--
56,08	2,69	0,94	0,57170	1,76787	165,520	+++		
28,04		0,57	1,49242	0,68533	30,0503			---
14,02		0,10	3,97201	0,26403	5,42038			----
7,01		0,01	4,2821	0,10735	1,03411			----
3,51		0,17	0,75252	1,58325	8,27052	++		
1,75		0,01	3,29247	0,43002	1,03411			---
0,88		0,05	0,69970	2,56046	3,23472	+++		

Níveis das interações farmacodinâmicas: sinergismo muito forte (+ + + + +), sinergismo forte (+ + + +), sinergismo (+ + +), sinergismo moderado (+ +), sinergismo leve (+), antagonismo muito forte (- - - -), antagonismo forte (- - -), antagonismo (- - -), antagonismo moderado (- -) e antagonismo leve (-) (CHOU, 2008).

A Tabela 7 mostra os resultados da análise do método Chou-Talalay utilizando diferentes concentrações de VD3 + DXR contra a linhagem MDA-MB-231, após período de 48 horas de tratamento utilizando combinações binárias. Assim como na Tabela 6, os valores de DRI foram calculados e, juntamente, com os níveis das interações farmacodinâmicas, foram associados as combinações binárias. Desses resultados, valem destacar as seguintes combinações, com redução nas concentrações, que geraram efeito moderado/alto: (i) uma combinação aditiva (0,88VD3 x 11,02DXR) com efeito 0,65; (ii) cinco combinações sinérgicas com efeitos entre 0,75 e 0,93 sendo (1) 28,04VD3 x 11,02DXR, (2) 3,51VD3 x 11,02DXR, (3) 28,04VD3 x 5,51DXR, (4) 3,51VD3 x 5,51DXR e (5) 28,04VD3 x 2,76DXR. Em duas destas combinações sinérgicas houve sinergismo forte e em todas essas combinações sinérgicas o valor do DRI foi favorável à redução de dose.

A ocorrência de combinações sinérgicas, com concentrações inferiores e efeito moderado/alto, sugere uma redução nas doses dos fármacos e, por conseguinte, nos efeitos colaterais decorrentes do tratamento para pacientes com TNBC. No entanto, são necessários ensaios *in vivo* posteriores para sua validação terapêutica.

**Tabela 7.** Resumo dos resultados do método Chou-Talalay com diferentes concentrações de Vitamina D3 (VD3 -  $\mu\text{M}$ ) e Doxorrubicina (DXR -  $\mu\text{M}$ ) em uma linhagem de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), após 48 horas de tratamento com combinações binárias

Combinações binárias ( $\mu\text{M}$ )		Fração de inibição ( <i>fa</i> )	Parâmetros			Interações Farmacodinâmicas		
VD3	DXR		CI	DRI (VD3)	DRI (DXR)	Sinergismo	Aditividade	Antagonismo
56,08	22,04	0,99	0,08239	12,1559	8156,21	+	+	+
28,04		0,93	0,25073	4,25965	62,6163	+	+	+
14,02		0,82	0,51094	3,36725	4,67367	+	+	+
7,01		0,79	0,51563	5,70439	2,93831	+	+	+
3,51		0,81	0,33005	12,6979	3,97931	+	+	+
1,75		0,72	0,91695	16,4283	1,16811		+	-
0,88		0,66	1,73174	25,6007	0,59078			- - -
56,08	11,02	0,99	0,08233	12,1559	16312,4	+	+	+
28,04		0,89	0,38750	2,77065	37,6273	+	+	+
14,02		0,75	0,72119	2,34392	3,39491	+	+	
7,01		0,71	0,73656	3,93033	2,07414	+	+	
3,51		0,76	0,36029	9,81175	3,87043	+	+	+
1,75		0,63	1,24999	11,4902	0,85988			- -
0,88		0,65	0,98279	24,6368	1,06134		+	-
56,08	5,51	0,99	0,08230	12,1559	32624,8	+	+	+
28,04		0,93	0,23875	4,25965	250,465	+	+	+
14,02		0,74	0,61390	2,23931	5,97622	+	+	+
7,01		0,73	0,42296	4,28357	5,27669	+	+	+
3,51		0,75	0,25409	9,36231	6,78983	+	+	+
1,75		0,70	0,33709	15,1007	3,69177	+	+	+
0,88		0,66	0,46223	25,6007	2,36312	+	+	+
56,08	2,76	0,99	0,08228	12,1559	65131,5	+	+	+
28,04		0,82	0,62075	1,68363	37,3216	+	+	+
14,02		0,56	1,48731	1,11429	1,69527			- - -

Continua na próxima página

Combinações binárias (µM)		Fração de inibição	Parâmetros			Interações Farmacodinâmicas		
VD3	DXR	(fa)	CI	DRI (VD3)	DRI (DXR)	Sinergismo	Aditividade	Antagonismo
7,01	2,76	0,56	1,03859	2,22857	1,69527		+ -	
3,51		0,60	0,59090	5,13239	2,52490	++ +		
1,75		0,55	0,76675	8,61899	1,53675	++		
0,88		0,51	1,02773	14,9107	1,04095		+ -	
56,08	1,38	0,99	0,08227	12,1559	130263	++++ +		
28,04		0,72	1,02892	1,02531	18,6559		+ -	
14,02		0,41	2,79586	0,65930	0,78179			---
7,01		0,41	2,03749	1,31860	0,78179			---
3,51		0,47	1,01558	3,25355	1,41197		+ -	
1,75		0,41	1,46843	5,28195	0,78179			---
0,88		0,45	0,94355	12,1019	1,16154		+ -	
56,08	0,69	0,99	0,08227	12,1559	260526	++++ +		
28,04		0,52	2,28198	0,48449	4,58824			---
14,02		0,34	3,28779	0,50857	0,75673			---
7,01		0,36	1,97873	1,09773	0,93654			---
3,51		0,39	1,19097	2,44982	1,27750			-
1,75		0,42	0,76145	5,47405	1,72781	++		
0,88		0,31	1,98030	7,19581	0,54309			---
56,08	0,34	0,99	0,08227	12,1559	528714	++++ +		
28,04		0,52	2,17143	0,48449	9,31143			---
14,02		0,30	3,32378	0,43356	0,98302			----
7,01		0,31	2,01434	0,90333	1,10215			---
3,51		0,35	1,05866	2,11084	1,70966		+ -	
1,75		0,34	0,89660	4,07434	1,53572	+		
0,88		0,28	1,44500	6,34914	0,77670			--

Níveis das interações farmacodinâmicas: sinergismo muito forte (++++ +), sinergismo forte (+++ +), sinergismo (++ +), sinergismo moderado (++), sinergismo leve (+), antagonismo muito forte (----), antagonismo forte (---), antagonismo (--), antagonismo moderado (-) e antagonismo leve (-) (CHOU, 2008).

## 5 CONCLUSÕES

A investigação, em *Drosophila melanogaster*, do potencial modulador da Vitamina D3 (VD3) na Mutagenicidade, avaliado pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em asas e do potencial carcinogênico pelo Teste de Tumor Epitelial (ETT); do sinergismo com diferentes fármacos, revelado *in vitro*, pelo Método de Chou-Talalay em linhagem humana de câncer de mama triplo negativa MDA-MB-231 e, ainda, por abordagem *in silico*, por meio de *docking* e dinâmica molecular, para melhor compreensão e embasamento das interações moleculares de VD3 e receptores permitiu concluir que, em *D. melanogaster* e nas condições experimentais dessas análises:

1. A VD3 não apresenta toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade;
2. A VD3 mostrou efeito modulador na mutagenicidade e carcinogenicidade induzidas pela Doxorrubicina (DXR);
3. A VD3 isolada não aumentou a frequência de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster*, mas reduziu a frequência das manchas induzidas por DXR quando coadministrada com esse composto;
4. A atividade recombinogênica manteve-se como a principal resposta, ao dano no DNA induzido por DXR, mesmo coadministrada com VD3;
5. A VD3 em diferentes concentrações não aumentou a frequência total de tumor epitelial em descendentes heterozigotos de *D. melanogaster*, mas reduziu, de modo dose-dependente, a frequência de tumor quando coadministrada com DXR, revelando que a VD3 tem efeito modulador na carcinogênese;



6. A análise *in silico* por *docking* associado a dinâmica molecular entre calcitriol e Receptor de Ecdisona (EcR) exibiu interação estável, indicando a possibilidade de transdução de sinal entre VD3 (calcitriol) e EcR, com possibilidade de ocorrência de diferentes eventos atribuídos a esse receptor em estágios distintos do ciclo de vida de *D. melanogaster*;
7. Em tratamentos individuais, em células MDA-MB-231, a VD3 foi mais potente no ensaio de 24 horas e a DXR após 48 horas;
8. O AZD2461 foi seletivo para a linhagem TNBC;
9. Em relação à importância das combinações farmacológicas no tratamento do câncer, a VD3, associada ao AZD2461 ou à DXR, apresentou efeito sinérgico ( $IC_{50} < 0,9$ ), indicando redução favorável de dose ( $DRI > 1$ ), o que os torna potencialmente promissores no tratamento do TNBC.

## REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, M.R.; BAGHERI, V.; RAZAVI, M.S.; MOMTAZI, A.A.; SAHEBKAR, A.; GHOLAMIN, M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v.232, n.8, p.2008–2018, 2017. DOI: 10.1002/jcp.25759

ABDELGHANY, A.H.; BASALAMAH, M.A.; IDRIS, S.; AHMAD, J.; REFAAT, B. The fibrolytic potentials of vitamin D and thymoquinone remedial therapies: insights from liver fibrosis established by CCl<sub>4</sub> in rats. **Journal of Translational Medicine**, v.14, p.1-15, 2016. DOI: 10.1186/s12967-016-1040-4

ABOLAJI, A.O.; KAMDEM, J.P.; FAROMBI, E.O.; ROCHA, J.B.T. *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. **Archives of Basic and Applied Medicine**, v.1, p.33-38, 2013.

ABRAHAM, M.J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J.C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v.1-2, p.19-25, 2015. DOI: 10.1016/j.softx.2015.06.001

ABRAHAM, S.K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v.9, p.383-386, 1994. DOI: 10.1093/mutage/9.4.383

ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.G.; SCHERER, S.E.; LI, P.W.; HOSKINS, R.A.; GALLE, R.F.; GEORGE, R.A.; LEWIS, S.E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S.N.; SUTTON, G.G.; WORTMAN, J.R.; YANDELL, M.D.; ZHANG, Q.; CHEN, L.X.; BRANDON, R.C.; ROGERS, Y.H.; BLAZEJ, R.G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B.D.; WAN, K.H.; DOYLE, C.; BAXTER, E.G.; HELT, G.; NELSON, C.R.; GABOR, G.L.; ABRIL, J.F.; AGBAYANI, A.; AN, H.J.; ANDREWS-PFANNKUCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R.M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGU, L.; BEASLEY, E.M.; BEESON, K.Y.; BENOS, P.V.; BERMAN, B.P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M.R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K.C.; BUSAM, D.A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J.M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L.B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A.D.; DEW, I.; DIETZ, S.M.; DODSON, K.; DOUP, L.E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B.C.; DUNN, P.; DURBIN, K.J.; EVANGELISTA, C.C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A.E.; GARG, N.S.; GELBART, W.M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J.H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N.L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T.J.; HERNANDEZ, J.R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K.A.; HOWLAND, T.J.; WEI, M.H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G.H.; KE, Z.; KENNISON, J.A.; KETCHUM, K.A.; KIMMEL, B.E.; KODIRA, C.D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A.A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.;

MATTEI, B.; MCINTOSH, T.C.; MCLEOD, M.P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N.V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S.M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D.M.; NELSON, D.L.; NELSON, D.R.; NELSON, K.A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D.R.; PACLEB, J.M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G.S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M.G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R.D.; SCHEELER, F.; SHEN H.; SHUE, B.C.; SIDÉN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M.P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A.C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A.H.; WANG, X.; WANG, Z.Y.; WASSARMAN, D.A.; WEINSTOCK, G.M.; WEISSENBACH, J.; WILLIAMS, S.M.; WORLEY, K.C.; WU, D.; YANG, S.; YAO, Q.A.; YE, J.; YEH, R.F.; ZAVERI, J.S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X.H. ZHONG, F.N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H.O.; GIBBS, R.A.; MYERS, E.W.; RUBIN, G.M.; VENTER, J.C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v.287, n.5461, p.2185-2195, 2000. DOI: 10.1126/science.287.5461.2185

ALEMASOVA, E.E.; LAVRIK, O.I. Poly (ADP-ribosyl) ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. **Nucleic Acids Research**, v.47, n.8, p.3811-3827, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz120

ALLRED, D.C. Ductal carcinoma *in situ*: terminology, classification, and natural history. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v.2010, n.41, p.134-138, 2010. DOI: 10.1093/jncimonographs/lgq035

ALMAIMANIA, R.A.; ALMASMOUM, H.; GHAITH, M.M.; EL-BOSHY, M.; IDRIS, S.; AHMAD, J.; ABDELGHANY, A.H.; BASALAMAH, M.A.; MAHBUB, A.; REFAAT, B. Enhanced remedial effects for vitamin D3 and calcium co-supplementation against pre-existing lead nephrotoxicity in mice: The roles of renal calcium homeostatic molecules. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1865, p.512-524, 2019. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.11.023

ALMANAA, T.N.; GEUSZ, M.E.; JAMASBI, R.J. A new method for identifying stem-like cells in esophageal cancer cell lines. **Journal of Cancer**, v.4, n.7, p.536–548, 2013. DOI: 10.7150/jca.6477

ANTONUCCI S.; DI SANTE, M.; TONOLO, F.; PONTAROLLO, L.; SCALCON, V.; ALANOVA, P.; MENABÒ, R.; CARPI, A.; BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M.P.; GIORGIO, M.; KALUDERCIC, N.; DI LISA, F. The determining role of mitochondrial reactive oxygen species generation and monoamine oxidase activity in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2020. DOI: 10.1089/ars.2019.7929

ATASHZAR, M.R.; BAHARLOU, R.; KARAMI, J.; ABDOLLAHI, H.; REZAEI, R.; POURRAMEZAN, F.; MOGHADDAM, S.H.Z. Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. **Journal of Cellular Physiology**, v.235, n.2, p.790-803, 2020. DOI: 10.1002/jcp.29044

BANG, Y.J.; IM, S.A.; LEE, K.W.; CHO, J.Y.; SONG, E.K.; LEE, K.H.; KIM, Y.H.; PARK, J.O.; CHUN, H.G.; ZANG, D.Y.; FIELDING, A.; ROWBOTTOM, J.; HODGSON, D.; O'CONNOR, M.J.; YIN, X.; KIM, W.H. Randomized, double-blind phase ii trial with prospective classification by ATM protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.33, n.33, p.3858-3865, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2014.60.0320

BIANCHINI, G.; BALKO, J.M.; MAYER, I.A.; SANDERS, M.E.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.3, n.11, p.674-690, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.66

BISHOP, A.J., SCHIESTL, R.H. Homologous Recombination and its role in carcinogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2, n.2, p.75-85, 2002. DOI: 10.1155/S1110724302204052

BISHOP, A.J., SCHIESTL, R.H. Role of homologous recombination in carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v.74, n.2, p.94-105, 2003. DOI: 10.1016/s0014-4800(03)00010-8

BRAGA, D.L.; MOTA, S.T.S.; ZÓIA, M.A.P.; LIMA, P.M.A.P.; ORSOLIN, P.C.; VECCHI, L.; NEPOMUCENO, J.C.; FÜRSTENAU, C.R.; MAIA, Y.C.P.; GOULART, L.R.; ARAÚJO, T.G. Ethanolic extracts from *azadirachta indica* leaves modulate transcriptional levels of hormone receptor variant in breast cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciencies**, v.19.n.7, p.1879, 2018. DOI: 10.3390/ijms19071879

BRASIL. Ministério da Saúde. Câncer de mama no Brasil: mortalidade está abaixo da média mundial. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/cancer-de-mama-no-brasil-mortalidade-esta-abaixo-da-media-mundial>> Acesso:15/10/2020.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018, 270 p.

BROSSEAU, C.M.; PIRIANOV, G.; COLSTON, K.W. Involvement of stress activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D3-induced breast cell death. **Steroids**, v.75, n.13-14, p.1082-1088, 2010. DOI: 10.1016/j.steroids.2010.07.007

BUNCH, B.L.; MA, Y.; ATTWOOD, K.; AMABLE, L.; LUO, W.; MORRISON, C.; GURU, K.A.; WOLOSZYNSKA-READ, A.; HERSHBERGER, P.A.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D3 enhances the response to cisplatin in bladder cancer through VDR and TAp73 signaling crosstalk. **Cancer Medicine**, v.8, p.2449-2461, 2019. DOI: 10.1002/cam4.2119

CECCALDI, R.; LIU, J.C.; AMUNUGAMA, R.; HAJDU, I.; PRIMACK, B.; PETALCORIN, M.I.; O'CONNOR, K.W.; KONSTANTINOPOULOS, P.A.; ELLEDGE, S.J.; BOULTON, S.J.; YUSUFZAI, T.; D'ANDREA, A.D. Homologous-recombination-deficient tumors are dependent on Polθ-mediated repair. **Nature**, v.518, n.7538, p.258-262, 2015. DOI: 10.1038/nature14184

CHATTERJEE, A.; MAMBO, E.; SIDRANSKY, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. **Oncogene**, v.25, n.34, p.4663-4674, 2006. DOI: 10.1038/sj.onc.1209604

CHEN, J.; LI, Y.; YU, T.S.; MCKAY, R.M.; BURNS, D.K.; KERNIE, S.G.; PARADA, L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. **Nature**, v.488, n.7412, p.522-526, 2012. DOI: 10.1038/nature11287

CHOU, T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research**, v.70, n.2, p.440-446, 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947

CHOU, T-C. Preclinical versus clinical drug combination studies. **Leukemia & Lymphoma**, v.49, n.11, p.2059–2080, 2008. DOI: 10.1080/10428190802353591

CHOU, T-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.621–681, 2006. DOI: 10.1124/pr.58.3.10

CHOU, T-C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in enzyme regulation**, v.22, p.27–55, 1984. DOI: 10.1016/0065-2571(84)90007-4

CIOFFI, M.; D'ALTERIO, C.; CAMERLINGO, R.; TIRINO, V.; CONSALES, C.; RICCIO, A.; IERANÒ, C.; CECERE, S.C.; LOSITO, N.S.; GREGGI, S.; PIGNATA, S.; PIROZZI, G.; SCALA, S. Identification of a distinct population of CD133(+)CXCR4(+) cancer stem cells in ovarian cancer. **Scientific Report**, v.5, p.10357, 2015. DOI: 10.1038/srep10357

CLAIRMONT, C.S.; SARANGI, P.; PONNIENSELVAN, K.; GALLI, L.D.; CSETE, I.; MOREAU, L.; ADELMANT, G.; CHOWDHURY, D.; MARTO, J.A.; D'ANDREA, A.D. TRIP13 regulates DNA repair pathway choice through REV7 conformational change. **Nature Cell Biology**, v.22, n.1, p.87-96, 2020. DOI: 10.1038/s41556-019-0442-y

CLEMENTS, K.E.; HALE, A.; TOLMAN, N.J.; NICOLAE, C.M.; SHARMA, A.; THAKAR, T.; LIANG, X.; KAWASAWA, Y.I.; WANG, H-G.; DE, S.; MOLDOVAN, G-L. Identification of regulators of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitor response through complementary CRISPR knockout and activation screens. **The Preprint Server for Biology**, 2019. DOI: 10.1101 / 871970

COLLINS, L.C.; TAMIMI, R.M.; BAER, H.J.; CONNOLLY, J.L.; COLDITZ, G.A.; SCHNITT, S.J. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ untreated after diagnostic biopsy: results from the Nurses' Health Study. **Cancer**, v.103, n.9, p.1778-1784, 2005. DOI: 10.1002/cncr.20979

COLOVOS, C.; YEATES, T.O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v.2, p.1511-1519, 1993. DOI: 10.1002/pro.5560020916

DE REZENDE, A.A.A.; GRAF, U.; GUTERRES, Z.R.; KERR, W.E.; SPANÓ, M.A. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1466-1472, 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2009.03.031

DE REZENDE, A.A.A.; MUNARI, C.C.; OLIVEIRA, P.F.; FERREIRA, N.H.; TAVARES, D.C.; SILVA, M.L.A.; REZENDE, K.C.S.; SPANÓ, M.A. A comparative study of the 21 modulatory effects of (-)- cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.645-652, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2013.01.050

DELA CRUZ, F.E.; KIRSCH, D.R.; HEINRICH, J.N. Transcriptional activity of *Drosophila melanogaster* ecdysone receptor isoforms and ultraspiracle in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.24, p.183-191, 2000. DOI: 10.1677/jme.0.0240183

DELANOUE, R.; SLAIDINA, M.; LÉOPOLD, P. The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing *dMyc* function in *Drosophila* fat cells. **Developmental Cell**, v.18, p.1012-1021, 2010. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.05.007

DEL CONTE, G.; SESSA, C.; VON MOOS, R.; VIGANÒ, L.; DIGENA, T.; LOCATELLI, A.; GALLERANI, E.; FASOLO, A.; TESSARI, A.; CATHOMAS, R.; GIANNI, L. Phase I study of olaparib in combination with liposomal doxorubicin in patients with advanced solid tumours. **British Journal of Cancer**, v.111, n.4, p.651-659, 2014. DOI: 10.1038/bjc.2014.345

DESANTIS, K.A.; ROBILOTTO, S.L.; MATSON, M.; KOTB, N.M.; LAPIERRE, C.M.; MINHAS, Z.; LEDER, A.A.; ABDUL, K.; FACTEAU, E.M.; WELSH, J. VDR in salivary gland homeostasis and cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.199, p.1-10, 2020. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105600

DOROSHOW, J.H. Mechanisms of anthracycline-enhanced reactive oxygen metabolism in tumor cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2019, p.1-15, 2019. DOI: 10.1155/2019/9474823

DUBOIS, C.; MARTIN, F.; HASSEL, C.; MAGNIER, F.; DAUMAR, P.; AUBEL, C.; GUERDER, S.; MOUNETOU, E.; PENNAULT-LORCA, F.; BAMDAD, M. Low-dose and long-term olaparib treatment sensitizes MDA-MB-231 and SUM1315 triple-negative breast cancers spheroids to fractionated radiotherapy. **Journal of Clinical Medicine**, v.9, n.1, p.64, 2020. DOI: 10.3390/jcm9010064

DUFFY, M.J.; WALSH, S.; MCDERMOTT, E.W.; CROWN, J. Biomarkers in breast cancer: where are we and where are we going? **Advances in Clinical Chemistry**, v.71, p.1-23, 2015. DOI: 10.1016/bs.acc.2015.05.001

DURKACZ, B.W.; OMIDIJI, O.; GRAY, D.A.; SHALL, S. (ADP-ribose) n participates in DNA excision repair. **Nature**, v.283, n.5747, p.593-596, 1980. DOI: 10.1038/283593a0

EEKEN, J.C., KLINK, I., VAN VEEN, B.L., PASTINK, A., FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.40, n.4, p. 277-82, 2002. DOI: 10.1002/em.10119

EETEZADI, S.; EVANS, J.C.; SHEN, Y.T.; DE SOUZA, R.; PIQUETTE-MILLER, M.; ALLEN, C. Ratio-dependent synergism of a doxorubicin and olaparib combination in 2D and spheroid models of ovarian cancer. **Molecular Pharmaceutics**, v.15, n.2, p.472-485, 2018. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00843

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J.U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v.277, p.396-404, 1997. DOI: 10.1016/s0076-6879(97)77022-8

EL-BOSHY, M.; BASALAMAH, M.A.; AHMAD, J.; IDRIS, S.; MAHBUB, A.; ABDELGHANY, A.H.; ALMAIMANI, R.A.; ALMASMOUM, H.; GHAITH, M.M.; ELZUBIER, M.; REFAAT, B. Vitamin D protects against oxidative stress, inflammation and hepatorenal damage induced by acute paracetamol toxicity in rat. **Free Radical Biology and Medicine**, v.141, p.310–321, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.030

FAGUNDES, G.E.; MACAN, T.P.; ROHR, P.; DAMIANI, A.P.; DA ROCHA, F.R.; PEREIRA, M.; LONGARETTI, L.M.; VILELA, T.C.; CERETTA, L.B.; MENDES, C.; SILVEIRA, P.C.L.; TEIXEIRA, J.P.F.; DE ANDRADE, V.M. Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. **Mutagenesis**, v.34, p.135-145, 2019. DOI: 10.1093/mutage/gez001

FATHI, N.; AHMADIAN, E.; SHAHI, S.; ROSHANGAR, L.; KHAN, H.; KOUHSOLTANI, M.; MALEKI DIZAJ, S.; SHARIFI, S. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.109, p.391-401, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.102

FDA (Food and Drug Administration). FDA approves talazoparib for gBRCAm HER2negative locally advanced or metastatic breast cancer. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-talazoparib-gbrca-her2-negative-locally-advanced-or-metastatic-breast-cancer>> (2018) > Acesso: 07/05/2020.

FELTON, S.J.; COOKE, M.S.; KIFT, R.; BERRY, J.L.; WEBB, A.R.; LAM, P.M.W.; RUIJL, F.R.; VAIL, A.; RHODES, L.E. Concurrent beneficial (vitamin D production) and hazardous (cutaneous DNA damage) impact of repeated low-level summer sunlight exposures. **British Journal of Dermatology**, v.175, p.1320–1328, 2016. DOI: 10.1111/bjd.14863

FORBES, C.; FAYTER, D.; DE KOCK, S.; QUEK, R.G. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of *BRCA*-mutated breast cancer. **Cancer Management and Research**, v.11, p.2321-2337, 2019. DOI: 10.2147/CMAR.S189627

FREI, H.; CLEMENTS, J.; HOWE, D.; WÜRGLER, F. E. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v.279, n.1, p.21-33, 1992. DOI: 10.1016/0165-1218(92)90262-X

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v.11, p.315-325, 1996. DOI: 10.1093/mutage/11.4.315

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v.334, p.247-258, 1995. DOI: 10.1016/0165-1161(95)90018-7

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.297-308, 1988. DOI: 10.1016/0165-1161(88)90019-2

GAIVÃO, I.; FERREIRA, J.; SIERRA, L. M. The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) of em *Drosophila melanogaster* for detecting antigenotoxic activity [Online First]. **IntechOpen**, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.91630. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/online-first/the-w-w-somatic-mutation-and-recombination-test-smart-of-drosophila-melanogaster-for-detecting-antig>> Acesso em: 23/10/2020.



GARRIDO-CASTRO, A.C.; LIN, N.U.; POLYAK, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. **Cancer Discovery**, v.9, n.2, p.176-198, 2019. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177

GARRAWAY, L.A.; LANDER, E.S. Lessons from the cancer genome. **Cell**, v.153, n.1, p.17-37, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.002

GERLACH, S.U.; EICHENLAUB, T.; HERRANZ, H. Yorkie and JNK control tumorigenesis in *Drosophila* cells with cytokinesis failure. **Cell Reports**, v.23, n.5, p.1491-1503, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.006

GERLACH, S.U.; HERRANZ, H. Genomic instability and cancer: lessons from *Drosophila*. **Open Biology**, v.10, n.6, p.200060, 2020. DOI: 10.1098/rsob.200060

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthacycline antibiotics andriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.727-741, 1999. DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4

GHARBARAN, R.; ZHANG, B.; VALERIO, L.; ONWUMERE, O.; WONG, M.; MIGHTY, J.; REDENTI, S. Effects of vitamin D3 and its chemical analogs on the growth of Hodgkin's lymphoma, *in vitro*. **BMC Research Notes**, v.12, p.1-6, 2019. DOI: 10.1186/s13104-019-4241-0

GIULIANO, A.E.; CONNOLLY, J.L.; EDGE, S.B.; MITTENDORF, E.A.; RUGO, H.S.; SOLIN, L.J.; WEAVER, D.L.; WINCHESTER, D.J.; HORTOBAGYI, G.N. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.67, n.4, p.290-303, 2017. DOI: 10.3322/caac.21393

GOGOLA, E.; DUARTE, A.A.; DE RUITER, J.R.; WIEGANT, W.W.; SCHMID, J.A.; DE BRUIJN, R.; JAMES, D.I.; LLOBET, S.G.; VIS, D.J.; ANNUNZIATO, S.; VAN DEN BROEK, B.; BARAZAS, M.; KERSBERGEN, A.; VAN DE VEM, M.; TAROUNAS, M.; OGILVIE, D.J.; VAN VUGT, M.; WESSELS, L.F.A.; BARTKOVA, J.; GROMOVA, I.; ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; BARTEK, J.; LOPES, M.; VAN ATTIKUM, H.; BORST, P.; JONKERS, J.; ROTTENBERG, S. Selective loss of PARG restores PARylation and counteracts PARP inhibitor-mediated synthetic lethality. **Cancer Cell**, v.35, n.6, p.950-952, 2019. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.05.008

GOMBART, A.F.; PIERRE, A.; MAGGINI, S. A Review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. **Nutrients**, v.12, p.1-40, 2020. DOI: 10.3390/nu12010236

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.J.; WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989. DOI: 10.1016/0165-1218(89)90112-2

GRAF, U.; HEO, O.S.; RAMIREZ, O.O. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.266, n. 2, p.197-203, 1992. DOI: 10.1016/0027-5107(92)90187-7

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1992. DOI: 10.1016/0165-1161(92)90032-h

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.6, p.153-188, 1984. DOI: 10.1002/em.2860060206

GRANT, W.B.; LAHORE, H.; MCDONNELL, S.L.; BAGGERLY, C.A.; FRENCH, C.B.; ALIANO, J.L.; BHATTOA, H.P. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and Covid-19 infections and deaths. **Nutrients**, v.12, n.4, p.988, 2020. DOI: 10.3390/nu12061626

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 780p.

GRZESIAK, M.; WASZKIEWICZ, E.; WOJTAS, M.; KOWALIK, K.; FRAN CZAK, A. Expression of vitamin D receptor in the porcine uterus and effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on progesterone and estradiol-17b secretion by uterine tissues *in vitro*. **Theriogenology**, v.125, p.102-108, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.10.026

HALHALI, A.; FIGUERAS, A.G.; DÍAZ, L.; AVILA, E.; BARRERA, D.; HERNÁNDEZ, G.; LARREA, F. Effects of calcitriol on calbindins gene expression and lipid peroxidation in human placenta. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.121, p.448-451, 2010. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.008

HAN, J.; TANG, Y.; ZHONG, M.; WU, W. Antitumor effects and mechanisms of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the Pfeiffer diffuse large B lymphoma cell line. **Molecular Medicine Reports**, v.20, n.6, p.5064-5074, 2019. DOI: 10.3892/mmr.2019.10756

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57–70, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9

HANZLIKOVA, H.; CALDECOTT, K.W. Perspectives on PARPs in S phase. **Trends in Genetics**, v.35, n.6, p.412-422, 2019. DOI: 10.1016/j.tig.2019.03.008

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. Breast cancer. **Nature Reviews: Disease Primers**, v.5, n.1, p.66, 2019. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2

HARRIS, D.M.; GO, V.L. Vitamin D and colon carcinogenesis. **The Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p.3463S - 3471S, 2004. DOI: 10.1093/jn/134.12.3463S

HERRANZ, H.; EICHENLAUB, T.; COHEN, S.M. Cancer in *Drosophila*: Imaginal discs as a model for epithelial tumor formation. **Current Topics in Developmental Biology**, v.116, p.181-199, 2016. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.037

HIJAZ, M.; CHHINA, J.; MERT, I.; TAYLOR, M.; DAR, S.; AL-WAHAB, Z.; ALI-FEHMI, R.; BUEKERS, T.; MUNKARAH, A.R.; RATTAN, R. Preclinical evaluation of olaparib and metformin combination in BRCA1 wildtype ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v.142, n.2, p.323-331, 2016. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.06.005

HUSS, L.; BUTT, S.T.; BORGQUIST, S.; ELEBRO, K.; SANDSVEDEN, M.; ROSENDAHL, A.; MANJER, J. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. **Breast Cancer Research**, v.21, p.1-13, 2019. DOI: 10.1186/s13058-019-1169-1

ILIE, P.C.; STEFANESCU, S.; SMITH, L. The role of Vitamin D in the prevention of Coronavirus Disease 2019 infection and mortality. **Aging Clinical and Experimental Research**, v.32, p.1195–1198, 2020. DOI: 10.1007/s40520-020-01570-8

INBAR-ROZENSAL, D.; CASTIEL, A.; VISOCHEK, L.; CASTEL, D.; DANTZER, F.; IZRAELI, S.; COHEN-ARMON, M. A selective eradication of human nonhereditary breast cancer cells by phenanthridine-derived polyADP-ribose polymerase inhibitors. **Breast Cancer Research**, v.11, n.R78, 2009. DOI: 10.1186/bcr2445

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>> Acesso: 25/03/2020.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Fisiopatologia do câncer. In: \_\_\_\_\_. Ações de enfermagem no controle do câncer. 2ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. p.55-81.

IRVING, A.A.; PLUM, L.A.; BLASER, W.J.; FORD, M.R.; WENG, C.; CLIPSON, L.; DELUCA, H.F.; DOVE, W.F. Cholecalciferol or 25-Hydroxycholecalciferol neither prevents nor treats adenomas in a rat model of familial colon cancer. **The Journal of Nutrition**, v.145, p.291-298, 2015. DOI: 10.3945/jn.114.204396

JASPERS, J.E.; KERSBERGEN, A.; BOON, U.; SOL, W.; VAN DEEMTER, L.; ZANDER, S.A.; DROST, R.; WIENTJENS, E.; JI, J.; ALY, A.; DOROSHOW, J.H.; CRANSTON, A.; MARTIN, N.M.; LAU, A.; O'CONNOR, M.J.; GANESAN, S.; BORST, P.; JONKERS, J.; ROTTENBERG, S. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. **Cancer Discovery**, v.3, n.1, p.68-81, 2013. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0049

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.2, p.407-440, 2009. DOI: 10.3390/ijms10020407

JEON, S-M.; SHIN, E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. **Experimental & Molecular Medicine**, v.50, p.1-14, 2018. DOI: 10.1038/s12276-018-0038-9

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v.267, p.727-748, 1997. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897

KAISEROVÁ, H.; DEN HARTOG, G.J.M.; ŠIMŮNEK, T.; SCHRÖTEROVÁ, L.; KVASNIČKOVÁ, E.; BAST, A. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. **British Journal of Pharmacology**, v.149, p.920-930, 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706930

KANIKARLA-MARIE, P.; JAIN, S.K. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibits oxidative stress and monocyte adhesion by mediating the upregulation of GCLC and GSH in endothelial cells treated with acetoacetate (ketosis). **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.159, p.94-101, 2016. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.002

KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v.9, p.527-549, 1970. DOI: 10.1016/0027-5107(70)90038-2

KEUNG, M.Y.; WU, Y.; BADAR, F.; VADGAMA, J.V. Response of breast cancer cells to PARP inhibitors is independent of BRCA status. **Journal of Clinical Medicine**, v.9, n.4, p.940, 2020. DOI: 10.3390/jcm9040940

KEUNG, M.Y.T.; WU, Y.; VADGAMA, J.V. PARP inhibitors as a therapeutic agent for homologous recombination deficiency in breast cancers. **Journal of Clinical Medicine**, v.8, n.4, p.435, 2019. DOI: 10.3390/jcm8040435

KONRAD, C.V.; MURALI, R.; VARGHESE, B.A.; NAIR, R. The role of cancer stem cells in tumor heterogeneity and resistance to therapy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.95, n.1, p.1-15, 2017. DOI: 10.1139/cjpp-2016-0079

KOON, A.C.; CHAN, H.Y.E. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study RNA toxicity of repeat expansion-associated neurodegenerative and neuromuscular diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.11, p.70, 2017. DOI: 10.3389/fncel.2017.00070

KOREN, R.; HADARI-NAOR, I.; ZUCK, E.; ROTEM, C.; LIBERMAN, U.A.; RAVID, A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. **Cancer Research**, v.61, p.1439-1444, 2001.

KRAUS, W.L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.20, n.3, p.294-302, 2008. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.03.006

LAFARGUE, C.J.; DAL MOLIN, G.Z.; SOOD, A.K.; COLEMAN, R.L. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors. **The Lancet Oncology**, v.20, n.1, p.e15-e28, 2019. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30786-1

LANDER, E.S.; LINTON, M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.;  
BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.;  
GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.;  
LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J.P.;  
MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.;  
SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, Y.;  
STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.;  
AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.;  
COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.;  
DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.;  
HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.;  
MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J.C.; MUNGALL, A.;  
PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R.H.;  
WILSON, R.K.; HILLIER, L.W.; MCPHERSON, J.D.; MARRA, M.A.; MARDIS,  
E.R.; FULTON, L.A.; CHINWALLA, A.T.; PEPIN, K.H.; GISH, W.R.; CHISSOE,  
S.L.; WENDL, M.C.; DELEHAUNTY, K.D.; MINER, T.L.; DELEHAUNTY, A.;  
KRAMER, J.B.; COOK, L.L.; FULTON, R.S.; JOHNSON, D.L.; MINX, P.J.;  
CLIFTON, S.W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON,  
P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J.F.; OLSEN, A.;  
LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R.A.; MUZNY,  
D.M.; SCHERER, S.E.; BOUCK, J.B.; SODERGREN, E.J.; WORLEY, K.C.;  
RIVES, C.M.; GORRELL, J.H.; METZKER, M.L.; NAYLOR, S.L.;  
KUCHERLAPATI, R.S.; NELSON, D.L.; WEINSTOCK, G.M.; SAKAKI, Y.;  
FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.;  
WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.;  
SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.;  
ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D.R.; DOUCETTE-STAMM, L.;  
RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H.M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.;  
PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.;  
WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.;  
DAVIS, R.W.; FEDERSPIEL, N.A.; ABOLA, A.P.; PROCTOR, M.J.; MYERS, R.M.;  
SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D.R.; OLSON, M.V.; KAUL,  
R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G.A.;  
ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B.A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.;  
LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W.R.; DE LA BASTIDE, M.;  
DEDHIA, N.; BLÖCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.;  
ARAVIND, L.; BAILEY, J.A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.;  
BORK, P.; BROWN, D.G.; BURGE, C.B.; CERUTTI, L.; CHEN, H.C.; CHURCH,  
D.; CLAMP, M.; COPLEY, R.R.; DOERKS, T.; EDDY, S.R.; EICHLER, E.E.;  
FUREY, T.S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J.G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.;  
HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L.S.;

JONES, T.A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W.J.; KITTS, P.; KOONIN, E.V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T.M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J.V.; MULDER, N.; POLLARA, V.J.; PONTING, C.P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A.F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y.I.; WOLFE, K.H.; YANG, S.P.; YEH, R.F.; COLLINS, F.; GUYER, M.S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K.A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M.J.; DE JONG, P.; CATANESE, J.J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y.J.; SZUSTAKOWKI, J. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n.6822, p.860-921, 2001. DOI: 10.1038/35057062

LAUDET, V.; HÄNNI, C.; COLL, J.; CATZEFLIS, F.; STÉHELIN, D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **The EMBO Journal**, v.11, n.3, p.1003–1013, 1992. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05139.x

LEE, H.J.; JI, Y.; PAUL, S.; MAEHR, H.; USKOKOVIC, M.; NANJOO, S. Activation of bone morphogenetic protein signaling by a novel vitamin D3 analog is mediated through Ras and protein kinase C $\alpha$  pathway in MCF10 breast epithelial cells. **Cancer Research**, v.67, n.9, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1549

LEHMANN, B.D.; JOVANOVIĆ, B.; CHEN, X.; ESTRADA, M.V.; JOHNSON, K.N.; SHYR, Y.; MOSES, H.L.; SANDERS, M.E.; PIETENPOL, J.A. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. **PLoS One**, v.11, n.6, p.e0157368, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0157368

LI, C.; HEIDT, D.G.; DALERBA, P.; BURANT, C.F.; ZHANG, L.; ADSAY, V.; WICHA, M.; CLARKE, M.F.; SIMEONE, D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Research**, v.67, n.3, p.1030-1037, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2030

LI, F.; LING, X.; HUANG, H.; BRATTAIN, L.; APONTES, P.; WU, J.; BINDERUP, L.; GBRATTAIN, M. Differential regulation of survivin expression and apoptosis by vitamin D3 compounds in two isogenic MCF-7 breast cancer cell sublines. **Oncogene**, v.24, p.1385–1395, 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208330

LI, J.; FENG, W.; LU, H.; WEI, Y.; MA, S.; WEI, L.; LIU, Q.; ZHAO, J.; WEI, Q.; YAO, J. Artemisinin inhibits breast cancer-induced osteolysis by inhibiting osteoclast formation and breast cancer cell proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, v.235, n.5, p.4983, 2020. DOI: 10.1002/jcp.27875

LITTON, J.K.; RUGO, H.S.; ETTL, J.; HURVITZ, S.A.; GONÇALVES, A.; LEE, K.H.; FEHRENBACHER, L.; YERUSHALMI, R.; MINA, L.A.; MARTIN, M.; ROCHÉ, H.; IM, Y.H.; QUEK, R.G.W.; MARKOVA, D.; TUDOR, I.C.; HANNAH, A.L.; EIERMANN, W.; BLUM, J.L. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. **The New England Journal of Medicine**, v.379, n.8, p.753-763, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1802905

LIM, J.S.J.; TAN, D.S.P. Understanding resistance mechanisms and expanding the therapeutic utility of PARP inhibitors. **Cancers**, v.9, n.8, p.109, 2017. DOI: 10.3390/cancers9080109

LIVRAGHI, L.; GARBER, J.E. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. **BMC Medicine**, v.13, n.188, 2015. DOI: 10.1186/s12916-015-0425-1

LUO, M.L.; ZHENG, F.; CHEN, W.; LIANG, Z.M.; CHANDRAMOULY, G.; TAN, J.; WILLIS, N.A.; CHEN, C.H.; TAVEIRA, M.O.; ZHOU, X.Z.; LU, K.P.; SCULLY, R.; WULF, G.M.; HU, H. Inactivation of the prolyl isomerase pin1 sensitizes BRCA1-proficient breast cancer to PARP inhibition. **Cancer Research**, v.80, n.14, p.3033-3045, 2020. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2739

MAAYAH, Z.H.; ZHANG, T.; FORREST, M.L.; ALRUSHAID, S.; DOSCHAK, M.R.; DAVIES, N.M.; EL-KADI, A.O.S. DOX-Vit D, a novel doxorubicin delivery approach, inhibits human osteosarcoma cell proliferation by inducing apoptosis while inhibiting Akt and mTOR signaling pathways. **Pharmaceutics**, v.10, n.3, p.144, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10030144

MACHADO, C.S.; VENANCIO, V.P.; AISSA, A.F.; HERNANDES, L.C.; MELLO, M.B.; DEL LAMA, J.E.C.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Vitamin D3 deficiency increases DNA damage and the oxidative burst of neutrophils in a hypertensive rat model. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.798, p.19–26, 2016. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.01.005

MAGAN, N.; ISAACS, R.J.; STOWELL, K.M. Treatment with the PARP-inhibitor PJ34 causes enhanced doxorubicin-mediated cell death in HeLa cells. **Anticancer Drugs**, v.23, n.6, p.627-637, 2012. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328350900f

MANI, C.; JONNALAGADDA, S.; LINGAREDDY, J.; AWASTHI, S.; GMEINER, W.H.; PALLE, K. Prexasertib treatment induces homologous recombination deficiency and synergizes with olaparib in triple-negative breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v.21, n.1, p.104, 2019. DOI: 10.1186/s13058-019-1192-2

MARCOS, R.; SIERRA, L.M.; GAIVÃO, I. The SMART assays of *Drosophila*: Wings and eyes as target tissues. In: SIERRA, L.M.; GAIVÃO, I. (editors). **Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach**. New York: Humana Press, 2014. p.283-295. DOI: 10.1007/978-1-4939-1068-7\_16

MARINELLO, J.; DELCURATOLO, M.; CAPRANICO, G. Anthracyclines as topoisomerase II poisons: From early studies to new perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.34, p.3480, 2018. DOI: 10.3390/ijms19113480

MARINELLO, P.C.; PANIS, C.; SILVA, T.N.X.; BINATO, R.; ABDELHAY, E.; RODRIGUES, J.A.; MENCALHA, A.L.; LOPES, N.M.D.; LUIZ, R.C.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.5864, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-42357-w

MASANNAT, Y.A.; HUSAIN, E.; ROYLANCE, R.; HEYS, S.D.; CARDER, P.J.; ALI, H.; MAURICE, Y.; PINDER, S.E.; SAWYER, E.; SHAABAN, A.M. Pleomorphic LCIS what do we know? A UK multicenter audit of pleomorphic lobular carcinoma *in situ*. **The Breast**, v.38, p.120-124, 2018. DOI: 10.1016/j.breast.2017.12.011

MATEO, J.; CARREIRA, S.; SANDHU, S.; MIRANDA, S.; MOSSOP, H.; PEREZ-LOPEZ, R.; NAVA RODRIGUES, D.; ROBINSON, D.; OMLIN, A.; TUNARIU, N.; BOYSEN, G.; PORTA, N.; FLOHR, P.; GILLMAN, A.; FIGUEIREDO, I.; PAULDING, C.; SEED, G.; JAIN, S.; RALPH, C.; PROTHEROE, A.; HUSSAIN, S.; JONES, R.; ELLIOTT, T.; MCGOVERN, U.; BIANCHINI, D.; GOODALL, J.; ZAFEIRIOU, Z.; WILLIAMSON, C.T.; FERRALDESCHI, R.; RIISNAES, R.; EBBS, B.; FOWLER, G.; RODA, D.; YUAN, W.; WU, Y.M.; CAO, X.; BROUGH, R.; PEMBERTON, H.; A'HERN, R.; SWAIN, A.; KUNJU, L.P.; EELES, R.; ATTARD, G.; LORD, C.J.; ASHWORTH, A.; RUBIN, M.A.; KNUDSEN, K.E.; FENG, F.Y.; CHINNAIYAN, A.M.; HALL, E.; DE BONO, J.S. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.373, n.18, p.1697-1708, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1506859

MATEO, J.; LORD, C.J.; SERRA, V.; TUTT, A.; BALMAÑA, J.; CASTROVIEJO-BERMEJO, M.; CRUZ, C.; OAKNIN, A.; KAYE, S.B.; DE BONO, J.S. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. **Annals of Oncology**, v.30, n.9, p.1437-1447, 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz192

MATEOS-GOMEZ, P.A.; GONG, F.; NAIR, N.; MILLER, K.M.; LAZZERINI-DENCHI, E.; SFEIR, A. Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. **Nature**, v.518, n.7538, p.254-257, 2015. DOI: 10.1038/nature14157

MCCABE, N.; TURNER, N.C.; LORD, C.J.; KLUZEK, K.; BIALKOWSKA, A.; SWIFT, S.; GIAVARA, S.; O'CONNOR, M.J.; TUTT, A.N.; ZDZIENICKA, M.Z.; SMITH, G.C.; ASHWORTH, A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. **Cancer Research**, v.66, n.16, p.8109-8115, 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0140

MERCHAN, B.B.; MORCILLO, S.; MARTIN-NUÑEZ, G.; TINAHONES, F.J.; MACÍAS-GONZÁLEZ, M. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.167, p.203-218, 2017. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.11.020



MICCHELLI, C.A.; PERRIMON, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. **Nature**, v.439, n.7075, p.475-479, 2006. DOI: 10.1038/nature04371

MICHELENA, J.; LEZAJA, A.; TELONI, F.; SCHMID, T.; IMHOF, R.; ALTMAYER, M. Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. **Nature Communications**, v.9, p.2678, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-05031-9

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v.56, p.185-229, 2004. DOI: 10.1124/pr.56.2.6

MIRZOYAN, Z.; SOLLAZZO, M.; ALLOCCA, M.; VALENZA, A.M.; GRIFONI, D.; BELLOSTA, P. *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. **Frontiers Genetics**, v.10, p.51, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00051

MISHRA, N.; SRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, U.R.; TEWARI, R.R. An insight into the genotoxicity assessment studies in dipterans. **Mutation Research**, v.773, p.220-229, 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.10.001

MOKHTARI, Z.; HEKMATDOOST, A.; NOURIAN, M. Antioxidant efficacy of vitamin D. **Journal of Parathyroid Disease**, v.5, n.1, p.11-16, 2017.

MORGAN, T.H. Sex limited inheritance in *Drosophila*. **Science**, v.32, p.120-122, 1910. DOI: 10.1126/science.32.812.120

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n.1-2, p.55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

MURAI, J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v.22, n.4, p.619–628, 2017. DOI: 10.1007/s10147-017-1145-7

NAIR-SHALLIKER, V.; FENECH, M.; FORDER, P.M.; CLEMENTS, M.S.; ARMSTRONG, B.K. Sunlight and vitamin D affect DNA damage, cell division and cell death in human lymphocytes: a cross-sectional study in South Australia. **Mutagenesis**, v.27, p.609-614, 2012. DOI: 10.1093/mutage/ges026

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Gene: Genes identified as putative homologs of one another during the construction of HomoloGene. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=cyp24a1>> Acesso: 05 de novembro de 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.1226p.

NEPOMUCENO, J.C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents thought the test for detection of epithelial tumor clones (warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v.3, p.2-8, 2015. DOI: 10.4172/2379-1764.1000149

NIMMAKAYALA, R.K.; BATRA, S.K.; PONNUSAMY, M.P. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v.1871, n1, p.50-63, 2019. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.10.006

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IADA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog *Drosophila* warts supressor, *h-warts*, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v.459, n.2, p.159-165, 1999. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01224-7

NITISS, J. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p.327–337, 2009. DOI: 10.1038/nrc2608

ODA, Y.; BIKLE, D.D. Vitamin D and calcium signaling in epidermal stem cells and their regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v.12, n.7, p.604-611, 2020. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i7.604

ODA, Y.; HU, L.; NGUYEN, T.; FONG, C.; ZHANG, J.; GUO, P.; BIKLE, D.D. Vitamin D receptor is required for proliferation, migration, and differentiation of epidermal stem cells and progeny during cutaneous wound repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v.138, n.11, p.2423-2431, 2018. DOI: 10.1016/j.jid.2018.04.033

OLIVEIRA, V.C.; CONSTANTE, S.A.R.; ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C.; DE REZENDE, A.A.A.; SPANÓ, M.A. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.106, p.283-291, 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.052

OLIVEIRA, V.C.; NAVES, M.P.C.; DE MORAIS, C.R.; CONSTANTE, S.A.R.; ORSOLIN, P.C.; ALVES, B.S.; RINALDI NETO, F.; DA SILVA, L.H.D.; DE OLIVEIRA, L.T.S.; FERREIRA, N.H.; ESPERANDIM, T.R.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C.; SPANÓ, M.A. Betulinic acid modulates urethane-induced genotoxicity and mutagenicity in mice and *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.138, p.111228, 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111228

OPLUSTIL O'CONNOR, L.; RULTEN, S.L.; CRANSTON, A.N.; ODEDRA, R.; BROWN, H.; JASPERS, J.E.; JONES, L.; KNIGHTS, C.; EVERS, B.; TING, A.; BRADBURY, R.H.; PAJIC, M.; ROTTENBERG, S.; JONKERS, J.; RUDGE, D.; MARTIN, N.M.; CALDECOTT, K.W.; LAU, A.; O'CONNOR, M.J. The PARP inhibitor AZD2461 provides insights into the role of PARP3 inhibition for both synthetic lethality and tolerability with chemotherapy in preclinical models. **Cancer Research**, v.76, n.20, p.6084-6094, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3240

ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPOMUCENO, J.C. Modulating effect of simvastatin on the DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.90, p.10-17, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.01.022

OWENS, D.J.; TANG, J.C.Y.; BRADLEY, W.J.; SPARKS, A.S.; FRASER, W.D.; MORTON, J.P.; CLOSE, G.L. Efficacy of high-dose vitamin D supplements for elite athletes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.49, p.349-356, 2017. DOI: 10.1249/mss.0000000000001105

PARK, H.J.; BAE, J.S.; KIM, K.M.; MOON, Y.J.; PARK, S.H.; HA, S.H.; HUSSEIN, U.K.; ZHANG, Z.; PARK, H.S.; PARK, B.H.; MOON, W.S.; KIM, J.R.; JANG, K.Y. The PARP inhibitor olaparib potentiates the effect of the DNA damaging agent doxorubicin in osteosarcoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.37, n.1, p.107, 2018. DOI: 10.1186/s13046-018-0772-9

PATEL, P.B.; THAKKAR, V.R. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. **Nutrition and Cancer**, v.66, p.453–462, 2014. DOI: 10.1080/01635581.2014.884230

PATRIA, F.F.; CECCARINI, M.R.; CODINI, M.; CONTE, C.; PERIOLI, L.; BECCARI, T.; ALBI, E. A role for neutral sphingomyelinase in wound healing induced by keratinocyte proliferation upon  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.15, p.3634, 2019. DOI: 10.3390/ijms20153634

PAWLOWSKA, E.; WYSOKINSKI, D.; BLASIAK, J. Nucleotide excision repair and vitamin D—Relevance for skin cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.4, p.1-21, 2016. DOI: 10.3390/ijms17040372

PETTITT, S.J.; KRASTEV, D.B.; BRANDSMA, I.; DRÉAN, A.; SONG, F.; ALEKSANDROV, R.; HARRELL, M.I.; MENON, M.; BROUGH, R.; CAMPBELL, J.; FRANKUM, J.; RANES, M.; PEMBERTON, H.N.; RAFIQ, R.; FENWICK, K.; SWAIN, A.; GUETTLER, S.; LEE, J.M.; SWISHER, E.M.; STOYNOV, S.; YUSA, K.; ASHWORTH, A.; LORD, C.J. Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. **Nature Communications**, v.9, n.1, p.1849, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03917-2

POULTON, J.S.; CUNINGHAM, J.C.; PEIFER, M. Acentrosomal *Drosophila* epithelial cells exhibit abnormal cell division, leading to cell death and compensatory proliferation. **Developmental Cell**, v.30, n.6, p.731-745, 2014. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.08.007

PRINCE, M.E.; SIVANANDAN, R.; KACZOROWSKI, A.; WOLF, G.T.; KAPLAN, M.J.; DALERBA, P.; WEISSMAN, I.L.; CLARKE, M.F.; AILLES, L.E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.3, p.973-978, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0610117104

RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science**, v.307, n.5717, p.1904-1909, 2005. DOI: 10.1126/science

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v.7, n.1, p.95–99, 1963. DOI: 10.1016/s0022-2836(63)80023-6

RAMJI, S.; LEE, C.; INABA, T.; PATTERSON, A.V.; RIDDICK, D.S. Human NADPH-cytochrome P450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. **Cancer Research**, v.63, n.20, p.6914 – 6919, 2003.

RAY CHAUDHURI, A.; NUSSENZWEIG, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.18, n.10, p.610-621, 2017. DOI: 10.1038/nrm.2017.53

REN, J.X.; GONG, Y.; LING, H.; HU, X.; SHAO, Z.M. Racial/ethnic differences in the outcomes of patients with metastatic breast cancer: contributions of demographic, socioeconomic, tumor and metastatic characteristics. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.173, n.1, p.225-237, 2019. DOI: 10.1007/s10549-018-4956-y

SAKAKI, T., YASUDA, K., KITAKA, A., YAMAMOTO, K., CHEN, T.C., 2014. CYP24A1 as a potential target for cancer therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.14, p.97-108, 2014. DOI: 10.2174/18715206113139990307

SANDERS, M.E.; SCHUYLER, P.A.; SIMPSON, J.F.; PAGE, D.L.; DUPONT, W.D. Continued observation of the natural history of low-grade ductal carcinoma in situ reaffirms proclivity for local recurrence even after more than 30 years of follow-up. **Modern Pathology**, v.28, n.5, p.662-669, 2015. DOI: 10.1038/modpathol.2014.141

SANTOS, J.M.; KHAN, Z. S.; MUNIR, M.T.; TARAFDAR, K.; RAHMAN, S.M.; HUSSAIN, F. Vitamin D3 decreases glycolysis and invasiveness, and increases cellular stiffness in breast cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.53, p.111-120, 2018. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.10.013

SAUL, L.; MAIR, I.; IVENS, A.; BROWN, P.; SAMUEL, K.; CAMPBELL, J.D.M.; SOONG, D.Y.; KAMENJARIN, N.; MELLANBY, R.J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 restrains CD4<sup>+</sup> T cell priming ability of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells by upregulating expression of CD31. **Frontiers in Immunology**, v.10, p.600, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00600

SHAH, C.; WOBB, J.; MANYAM, B.; KUNDU, N.; ARTHUR, D.; WAZER, D.; FERNANDEZ, E.; VICINI, F. Management of ductal carcinoma *in situ* of the breast: A Review. **JAMA Oncology**, v.2, n.8, p.1083-1088, 2016. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.0525

SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, v.34, n.5-6, p.360-394, 2020. DOI: 10.1101/gad.334516.119

SHAKER, O.G.; SENOUSY, M.A. Association of SNP-SNP interactions between *RANKL*, *OPG*, *CHI3L1* and *VDR* genes with breast cancer risk in Egyptian women. **Clinical Breast Cancer**, v.19, n.1, p.e220-e238, 2019. DOI: 10.1016/j.clbc.2018.09.004

SHEELEY, M.; TEEGARDEN, D.; WONG, K.1, 25-Dihydroxyvitamin D3 altered metabolism of MCF10A-ras cells decreases viability in extracellular matrix detached conditions (FS13-05-19). **Current Developments in Nutrition**, v.3, 2019. DOI: 10.1093/cdn/nzz030.FS13-05-19

SHEN, M.Y.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v.15, p.2507-2524, 2006. DOI: 10.1110/ps.062416606

SIDOROV, R.A., UGNIVENKO, E.G., KHOVANOVA, E.M., BELITSKY, G.A. Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.498, n.1-2, p.: 181-191, 2001. DOI: 10.1016/S1383-5718(01)00277-7

SILVA-OLIVEIRA, R.G.; ORSOLIN, P.C.; NEPOMUCENO, J.C. Modulating effect of losartan potassium on the mutagenicity and recombinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.95, p.211-218, 2016. DOI: 10.1016/j.fct.2016.07.003

SINN, H.P.; KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th Edition, focusing on issues and updates from the 3rd Edition. **Breast Care (Basel)**, v.8, n.2, p.149-154, 2013. DOI: 10.1159/000350774

SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, v.16, p.385–394, 2001. DOI: 10.1093/mutage/16.5.385

SPANÓ, M.A.; GRAF, U. Segundo taller sobre Smart: un método para detectar las actividades mutagénica y recombinogénica en células somáticas de *Drosophila*, en la Universidad Federal de Uberlandia (MG) Brasil. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.14, n.2, p.111-114, 1998.

STAMENKOVIĆ-RADAK, M.; ANDJELKOVIĆ, M. Studying genotoxic and antimutagenic effects of plant extracts in *Drosophila* test systems. **Botanica Serbica**, v.40, n.1, p.21-28, 2016. DOI: 10.5281/zenodo.48854

STARK, M.B. An hereditary tumor in the fruit fly, *Drosophila*. **Cancer Research**, v.3, n.3, 1918. DOI: 10.1158/jcr.1918.279

ST. JOHNSTON, D. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. **Nature Reviews Genetics**, v.3, n.3, p.176–188, 2002. DOI: 10.1038/nrg751

STRATTON, M.R.; CAMPBELL, P.J.; FUTREAL, P.A. The cancer genome. **Nature**, v.458, n.7239, p.719-724, 2009. DOI: 10.1038/nature07943

STURTEVANT, A.H. Thomas Hunt Morgan. **National Academy of Sciences Biographical Memoirs**, v.33, p.283-325, 1959.

TAGLIAFERRI, S.; PORRI, D.; DE GIUSEPPE, R.; MANUELLI, M. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. **Nutrition Research Reviews**, v. 32, n.1, p. 99-105, 2019. DOI: 10.1017/S0954422418000197

TAKEIRI, A.; TANAKA, K.; SHIODA, A.; HARADA, A.; YANO, M.; KAWASE, A.; YAMAGUCHI, K.; MITSUI, T.; MISHIMA, M. Lack of mutagenicity of SMD-502, a new vitamin D3 analog for topical application, in skin and liver of *gpt* delta transgenic mice and in GDL1 cells. **Genes and Environment**, v.34, p.107–114, 2012. DOI: 10.3123/jemsge.34.107

TALBOT, S.J.; CRAWFORD, D.H. Viruses and tumours-an update. **European Journal of Cancer**, v.40, n.13, p.1998-2005, 2004. DOI: 10.1016/j.ejca.2003.11.039

TING, H-J.; YASMIN-KARIM, S.; YAN, S-J.; HSU, J-W.; LIN, T-H.; ZENG, W.; MESSING, J.; SHEU, T-J.; BAO, B-Y.; LI, W.X.; MESSING, E.; LEE, Y-F. A positive feedback signaling loop between ATM and the vitamin D receptor is critical for cancer chemoprevention by vitamin D. **Cancer Research**, v.72, p.958-968, 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0042

TSANG, J.Y.; HUANG, Y.H.; LUO, M.H.; NI, Y.B.; CHAN, S.K.; LUI, P.C.; YU, A.M.; TAN, P.H.; TSE, G.M. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.136, n.2, p.407-417, 2012. DOI: 10.1007/s10549-012-2271-6

TSAO, C.K.; KU, H.Y.; LEE, Y.M.; HUANG, Y.F.; SUN, Y.H. Long term *ex vivo* culture and live imaging of *Drosophila* larval imaginal discs. **PLoS One**, v.11, n.9, p.e0163744, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163744

TUTT, A.; ROBSON, M.; GARBER, J.E.; DOMCHEK, S.M.; AUDEH, M.W.; WEITZEL, J.N.; FRIEDLANDER, M.; ARUN, B.; LOMAN, N.; SCHMUTZLER, R.K.; WARDLEY, A.; MITCHELL, G.; EARL, H.; WICKENS, M.; CARMICHAEL, J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. **Lancet**, v.376, n.9737, p.235-244, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60892-6

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H.J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v.9, p.235-244, 2016. DOI: 10.1242/dmm.023762

VALADARES, B.L.B.; GRAF, U.; SPANÓ, M.A. Inhibitory effect of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.1103-1110, 2008. DOI: 10.1016/j.fct.2007.11.005

VASCONCELOS, M.A.; ORSOLIN, P.C.; OLIVEIRA, V.C.; LIMA, P.M.A.P.; NAVES, M.P.C.; DE MORAIS, C.R.; NICOLAU-JÚNIOR, N.; BONETTI, A.M.; SPANÓ, M.A. Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and *in silico* studies. **Food and Chemical Toxicology**, v.143, p.111549, 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111549

VASCONCELOS, M.A.; ORSOLIN, P.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G.; NEPOMUCENO, J.C.; SPANÓ, M.A. Assessment of the carcinogenic potential of high intense sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p.1-7, 2017. DOI: 10.1016/j.fct.2016.12.028

VILLEGAS, S.N. One hundred years of *Drosophila* cancer research: no longer in solitude. **Disease Models & Mechanisms**, v.12, n.4, p.039032, 2019. DOI: 10.1242/dmm.039032

VLASTOS, D.; DROSOPOULOU, E.; EFTHIMIOU, I.; GAVRIILIDIS, M.; PANAGAKI, D.; MPATZIOU, K.; KALAMARA, P.; MADEMTZOGLU, D.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Genotoxic and antigenotoxic assessment of chios mastic oil by the *in vitro* micronucleus test on human lymphocytes and the *in vivo* wing somatic test on *Drosophila*. **PLoS One**, v.10, n.6, p.e0130498, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130498

VOGEL, E.W.; NIVARD, M.J.M.; ZIJLSTRA, J.A. Variation of spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: A pilot study on the effects of polyaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. **Mutation Research**, v.250, p.291-298, 1991. DOI: 10.1016/0027-5107 (91)90184-p

WANG, D.Y.; JIANG, Z.; ZACKSENHAUS, E. Stratifying the stratifiers of triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v.11, n.4, p.306-308, 2020. DOI: 10.18632/oncotarget.27455

WANG, E.W.; COLLINS, A.R.; PANG, M.Y.C.; SIU, P.P.M.; LAI, C.K.Y.; WOO, J.; BENZIE, I.F.F. Vitamin D and oxidation-induced DNA damage: is there a connection? **Mutagenesis**, v.31, n.6, p.655-659, 2016. DOI: 10.1093/mutage/gew033

WANG, L.S.; WANG, Y.R.; YE, D.W.; LIU, Q.Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.55, n.6, p.105948, 2020. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105948

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v.54, n.1, p.5.6.1-5.6.37, 2016. DOI: 10.1002/cpbi.3

WHEELER, D.E.; NIJHOUT, H.F. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. **Bioessays**, v.25, n.10, p.994-1001, p.2003. DOI: 10.1002/bies.10337

WHO (World Health Organization) Global Health Observatory. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/about/facts/en/>> Acesso:25/03/2020

WICKI, A.; HAGMANN, J. Diet and cancer. **Swiss Medical Weekly**, v.141, p.13250, 2011. DOI: 10.4414/smw.2011.13250

WODARZ A., NÄTHKE I. Cell polarity in development and cancer. **Nature Cell Biology**, v.9, p.1016–1024, 2007. DOI: 10.1038/ncb433

WOO, D.K.; EIDE, M.J. Tanning beds, skin cancer, and vitamin D: an examination of the scientific evidence and public health implications. **Dermatologic Therapy**, v.23, n.1, p.61-67, 2010. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2009.01291.x

WÜRGLER, E.E.; VOGEL, E.W. *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: SERRES, F.J. (editor). **Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection**. 10.ed. New York: Plenum Press, 1986. p.1-72.

XIA, H.; QI, H.; LI, Y.; PEI, J.; BARTON, J.; BLACKSTAD, M.; XU, T.; TAO, W. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. **Oncogene**, v. 21, n.8, p.1233-1241, 2002. DOI: 10.1038/sj.onc.1205174



XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R.A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: The *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v.121, n.4, p.1053-1063, 1995.

YAO, T.P.; SEGRAVES, W.A.; ORO, A.E.; MCKEOWN, M.; EVANS R.M. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. **Cell**, v.71, n.1, p.63-72, 1992. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90266-f

YARCHOAN, M.; MYZAK, M.C.; JOHNSON III, B.A.; DE JESUS-ACOSTA, A.; LE, D.T.; JAFFEE, E.M.; AZAD, N.S.; DONEHOWER, R.C.; ZHENG, L.; OBERSTEIN, P.E.; FINE, R.L.; LAHERU, D.A.; GOGGINS, M. Olaparib in combination with irinotecan, cisplatin, and mitomycin C in patients with advanced pancreatic cancer. **Oncotarget**, v.8, n27, p.44073-44081, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.17237

ZHAO, H.; YANG, Q.; HU, Y.; ZHANG, J. Antitumor effects and mechanisms of olaparib in combination with carboplatin and BKM120 on human triple-negative breast cancer cells. **Oncology Reports**, v.40, n.6, p.3223-3234, 2018. DOI: 10.3892/or.2018.6716

ZHAO, Q.; LAN, T.; SU, S.; RAO, Y. Induction of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells by a PARP1-targeting PROTAC small molecule. **Chemical communications**, v.55, n.3, p.369-372, 2019. DOI: 10.1039/c8cc07813k

ZHANG, J.; WANG, M.; DING, W.; ZHAO, M.; YE, J.; XU, Y.; WANG, Z.; YE, D.; LI, D.; LIU, J.; WAN, J. Resolvin E1 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress, autophagy and apoptosis by targeting AKT/mTOR signaling. **Biochemical Pharmacology**, v.180, p.114188, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114188

ZHANG, L.; LIU, Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. **Journal of Medical Virology**, v.92, n.5, p.479–490, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25707

ZOETE, V.; CUENDET, M.A.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of Computational Chemistry**, v.32, n.11, p.2359-2368, 2011. DOI: 10.1002/jcc.21816

ZUCCHETTI, B.; SHIMADA, A.K.; KATZ, A.; CURIGLIANO, G. The role of histone deacetylase inhibitors in metastatic breast cancer. **The Breast**, v.43, p.130-134, 2019. DOI: 10.1016/j.breast.2018.12.001

## **ANEXO 1**



# Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and *in silico* studies

Mirley Alves Vasconcelos, Master<sup>a</sup>, Priscila Capelari Orsolin, PhD<sup>b</sup>, Victor Constante Oliveira, Master<sup>a</sup>, Paula Marynella Alves Pereira Lima, Master<sup>a</sup>, Maria Paula Carvalho Naves, Master<sup>a</sup>, Cássio Resende de Moraes, PhD<sup>c</sup>, Nilson Nicolau-Júnior, PhD<sup>a</sup>, Ana Maria Bonetti, PhD<sup>a</sup>, Mário Antônio Spanó, PhD<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Cytogenetic and Mutagenesis, University Center of Patos de Minas, Patos de Minas, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Cell Biology, Carmeliana Mário Palmério Foundation, Monte Carmelo, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Cholecalciferol  
Docking molecular  
Epithelial tumor test  
Molecular dynamics  
Smart  
Somatic mutation and recombination test

## ABSTRACT

Vitamin D3 (VD3) deficiency increases DNA damage, while supplementation may exert a pro-oxidant activity, prevent viral infections and formation of tumors. The aim of this study was to investigate the mutagenicity and carcinogenicity of VD3 alone or in combination with doxorubicin (DXR) using the Somatic Mutation and Recombination Test and the Epithelial Tumor Test, both in *Drosophila melanogaster*. For better understanding of the molecular interactions of VD3 and receptors, *in silico* analysis were performed with molecular docking associated with molecular dynamics. Findings revealed that VD3 alone did not increase the frequency of mutant spots, but reduced the frequency of mutant spots when co-administered with DXR. In addition, VD3 did not alter the recombinogenic effect of DXR in both ST and HB crosses. VD3 alone did not increase the total frequency of tumor, but significantly reduced the total frequency of tumor when co-administered with DXR. Molecular modeling and molecular dynamics between calcitriol and Ecdysone Receptor (EcR) showed a stable interaction, indicating the possibility of signal transduction between VD3 and EcR. In conclusion, under these experimental conditions, VD3 has modulatory effects on the mutagenicity and carcinogenicity induced by DXR in somatic cells of *D. melanogaster* and exhibited satisfactory interactions with the EcR.

## 1. Introduction

Cholecalciferol, also known as vitamin D3 (VD3), is a steroid hormone derived from cholesterol (secosteroid). VD3 is traditionally recognized as an important substance for maintaining serum calcium homeostasis and bone mineralization (Abdelghany et al., 2016). Calcium also exerts a reciprocal effect on the production of the pre-hormone calcidiol [25-hydroxyvitamin D - 25(OH)D<sub>3</sub>] in the liver and calcitriol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] in the kidney, which is the biologically active form of vitamin D (VD) (Lucock et al., 2015; Jeon and Shin, 2018; Alaimani et al., 2019; El-Boshy et al., 2019). Woo and Eide (2010) report the need for a five to 30-min exposure to the midday sun, at least twice a week, for

satisfactory VD3 synthesis.

In humans, VD3 is related to the development of therapies for autoimmune and chronic inflammatory diseases (Saul et al., 2019), besides to reducing the risk of viral infections (Gombart et al., 2020). Recent scientific studies have suggested that the adequate supplementation of VD may increase the resistance to the novel coronavirus (SARS-CoV-2), the causative agent of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Wang et al., 2020). Therefore, VD supplementation might be a useful measure for reducing the risk of respiratory tract infections and for acting as one more therapeutic option for the treatment against this new virus (Grant et al., 2020; Zhang and Liu, 2020).

Prior studies supporting the role of VD in reducing risk of COVID-19

\* Corresponding author. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Mutagenese, Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil.

E-mail addresses: [mirleyalves@yahoo.com.br](mailto:mirleyalves@yahoo.com.br) (M.A. Vasconcelos), [pricaorsolin@hotmail.com](mailto:pricaorsolin@hotmail.com) (P.C. Orsolin), [victor.biologia@hotmail.com](mailto:victor.biologia@hotmail.com) (V.C. Oliveira), [paulamarynella@hotmail.com](mailto:paulamarynella@hotmail.com) (P.M.A.P. Lima), [mpcnaves@hotmail.com](mailto:mpcnaves@hotmail.com) (M.P.C. Naves), [cassio.1015@hotmail.com](mailto:cassio.1015@hotmail.com) (C.R. de Moraes), [nicolaujr@ufu.br](mailto:nicolaujr@ufu.br) (N. Nicolau-Júnior), [anabonettiufu@gmail.com](mailto:anabonettiufu@gmail.com) (A.M. Bonetti), [maspano@ufu.br](mailto:maspano@ufu.br), [maspano60jahr@gmail.com](mailto:maspano60jahr@gmail.com) (M.A. Spanó).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111549>

Received 4 May 2020; Received in revised form 18 June 2020; Accepted 21 June 2020

Available online 5 July 2020

0278-6915/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

indicate that the outbreak occurred in winter, when 25 (OH)D concentrations are low and, importantly, VD deficiency has been found to contribute to acute respiratory distress syndrome. In fact, VD levels have shown to be severely low in the aging population, especially in Spain, Italy and Switzerland, being the elderly the most vulnerable group of population for COVID-19. Therefore, it has been recommended that people at risk consider an intake of 10,000 IU/d of VD3 for a few weeks to rapidly raise 25 (OH)D levels (Grant et al., 2020; Ilie et al., 2020).

Mechanisms of signalling by VD3 are only possible through a highly specific VD nuclear receptor (VDR) (Grzesiak et al., 2019). Upon binding to calcitriol, the activated VDR recruits retinoid X receptor (RXR) and co-modulators for transcription of target genes, such as *cyp24a1* (Bunch et al., 2019). Thus, the [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]-VDR complex is related to the control of gene expression, in addition to mediating pathologies, including breast cancer in humans (Huss et al., 2019).

According to previous studies, VDR expression is related to anti-tumor events in various tissues (Gharbaran et al., 2019; Shaker and Senousy, 2019; DeSantis et al., 2020). Supplementation with VD3 is necessary to activate the VDR pathway and thus prevent the formation of tumors, since, as reported in the literature, this vitamin has several anti-cancer mechanisms, such as: (i) induction of apoptosis, (ii) anti-proliferative effects, (iii) anti-inflammatory effects, (iv) stimulation of differentiation, (v) inhibition of angiogenesis and (vi) inhibition of invasion and metastasis (Fathi et al., 2019). Other researches, however, have reported that excessive VD3 supplementation may present potentially harmful effects on the body (Owens et al., 2017), including changes in the cell cycle regulatory pathways (Sakaki et al., 2014; Irving et al., 2015) and pro-oxidation (Koren et al., 2001; Halhali et al., 2010).

Among the different toxicological tests used to evaluate substances that can cause DNA damage and/or induce cancer, the wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the Epithelial Tumor Test (ETT), both conducted in *Drosophila melanogaster*, have drawn considerable attention due to their sensitivity in assessing chemicals with mutagenic, recombinogenic and/or carcinogenic properties (Graf et al., 1984; Graf and van Schaik, 1992; Nepomuceno, 2015).

*D. melanogaster* has proven to be an excellent *in vivo* model organism for over a century. The major advantages of its use in research are the short life cycle, high offspring numbers and low costs for maintenance, being also an alternative model system to the use of vertebrates, since the fruit fly shares several basic biological, biochemical, neurological and physiological similarities with mammals. Furthermore, approximately 75% of genes related to human disease are conserved between humans and *Drosophila* (Pandey and Nichols, 2011; Abolaji et al., 2013; Koon and Chan, 2017).

The wing SMART allows to assess the potential of a chemical to induce loss of heterozygosity resulting from gene mutation, chromosomal rearrangement, chromosome breakage, or chromosome loss (Graf et al., 1984; De Andrade et al., 2003). Indeed, SMART has been successfully used to detect the mutagenic/recombinogenic as well as anti-mutagenic/antirecombinogenic properties of many chemical compounds (Orsolin et al., 2016; Oliveira et al., 2017, 2020; Naves et al., 2019).

The ETT allows to identify epithelial tumors induced by xenobiotic agents (Orsolin et al., 2012; Nepomuceno, 2015; Vasconcelos et al., 2017; Morais et al., 2017, 2018). The test uses a *D. melanogaster* strain containing the *wt*s marker, which, when expressed in the wild type, acts as a tumor suppressor gene (Xu et al., 1995). The deletion of the wild-type gene *wt*s and consequent expression of the mutant allele lead to the formation of highly invasive cell clones, hence resulting in the development of epithelial tumors in the body and appendages of adult flies (Nishiyama et al., 1999).

For conducting *in vivo* tests, it is essential to know whether the model organism has human orthologous receptors, which can be activated with the compound to be tested and, consequently, express a response in the model system. Therefore, *in silico* analyzes with molecular docking associated with molecular dynamics are recommended, in which,

through computer simulation, it is possible to predict the best position and orientation of a ligand in another receptor molecule, an association that can be: (i) protein-peptide, (ii) protein-protein and (iii) protein-small molecule (Agrawal et al., 2019). In association with molecular docking, molecular dynamics (MD) is a tool that allows the simulation of the behavior of a molecular system; that is, MD leads to the understanding of ligand-receptor interactions with prediction of the intensity of stability and the consequent biological activity of this ligand-receptor system (Namba et al., 2008).

Given that VD3 has already been associated with events that result in modulation of genetic instability (Elhousseini et al., 2018; Fagundes et al., 2019), the aim of the present study was to evaluate the mutagenicity and carcinogenicity of VD3 when administered alone or its anti-mutagenicity and anticarcinogenicity when administered simultaneously with DXR, through SMART and ETT. Additionally, we performed *in silico* analysis with molecular docking and simulation of molecular dynamics between VD3 and receptors VDR and ECR.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemical agents

Vitamin D3 (VD3) (CAS 67-97-0) was obtained from Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis (GO), Brazil (Fig. 1A). Doxorubicin (DXR) (CAS 25316-40-9), commercially known as Adriblastina® RD, was manufactured and packaged by Activis Italy Sp - Nerviano (Milan, Italy) and imported by Pfizer Laboratório Ltda., São Paulo, Brazil (Fig. 1B).

### 2.2. *Drosophila* stocks

Three *D. melanogaster* strains were used to investigate the mutagenicity and recombinogenicity of VD3 when administered alone or its antimutagenicity and antirecombinogenicity when administered simultaneously with DXR: [1] multiple wing hairs (*mwh/mwh*; *y*; *mwh jv*, 3 (3–0.3)); [2] flare-3 (*flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3*, *ri p<sup>p</sup> sep l (3)89Aa bx<sup>34e</sup>* and *Bd<sup>S</sup>*); and [3] ORR; flare-3 (*ORR/ORR*; *flr<sup>3</sup>/In(3LR) TM3*, *ri p<sup>p</sup> sep l (3)89Aa bx<sup>34e</sup>* and *Bd<sup>S</sup>*). Two *Drosophila* strains were used to investigate the carcinogenicity of VD3 when administered alone or its anticarcinogenicity when administered simultaneously with DXR: [1] multiple wing hairs (*mwh/mwh*; *y*; *mwh jv*, 3 (3–0.3)) and [2] “warts” (*wt*s/TM3; ST [1] *in [1] kni [ri-1] wt*s [3–17]/TM3, *Sb<sup>1</sup>*). These strains were kept in glass vials filled with a maintenance medium (i.e., agar-agar, banana, yeast, methylparaben, water and penicillin/streptomycin) in a Bio-Oxygen Demand-type (B.O.D.) chamber (Model: SL224, SOLAB – Equipamentos para Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brazil) at 25 ± 1 °C, under 12 h light/12 h dark cycles of photoperiod.

### 2.3. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

#### 2.3.1. Crosses and treatments

Two crosses were carried out to produce the experimental larval progeny: (1) Standard (ST) cross: *mwh/mwh* males crossed with flare-3 virgin females (Graf et al., 1984, 1989); (2) High bioactivation (HB) cross: *mwh/mwh* males crossed with ORR; flare-3 virgin females (Graf and van Schaik, 1992). These crosses yielded two types of offspring: marked trans-heterozygous (MH) (*mwh* +/+ *flr<sup>3</sup>*) flies with phenotypically wild-type wings and balanced heterozygous (BH) (*mwh* +/+ TM3, *Bd<sup>S</sup>*) flies with phenotypically serrated wings. These offspring are phenotypically distinct due to the marker TM3, *Bd<sup>S</sup>*.

Eggs were collected over 8 h in vials containing a solid agar base (4% agar in water) and a layer of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with sucrose. After 72 ± 4 h, third instar larvae were washed up with tap water and collected using a fine mesh sieve. We performed a pilot study to test the VD3 toxicity in the SMART. To calculate the survival rates upon exposure, larvae were counted before the distribution

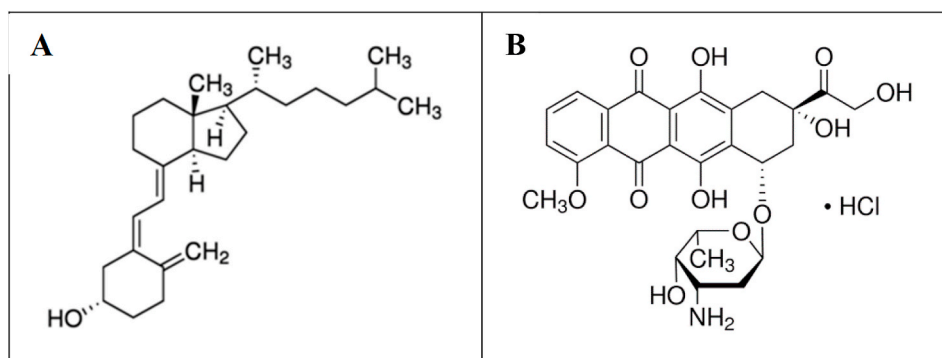


Fig. 1. Structural formula of (A) Vitamin D3; (B) Doxorubicin.

into glass tubes containing an alternative culture medium, prepared with instant potato puree Yoki® Alimentos S.A (Spanó et al., 2001). and different concentrations of VD3 alone (12.5; 25.0; 50.0 and 100.0 mM) dissolved in a mixture of 1% Tween 80 (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, Brazil) and 3% ethanol (Neon Comercial Ltda., São Paulo, Brazil) or in association with DXR (0.4 mM) (for co-treatments). The survival tests were performed only once, without replicates. The hatched flies were counted and stored in 70% ethanol. Chi-squared test was used for statistical comparisons of the survival rate ratios for independent samples (De Rezende et al., 2013).

Therefore, for SMART the VD3 concentrations were based on survival assays in *D. melanogaster* (Fig. 2). Treatments were done in two independent experiments, with two replicates, considering four concentrations of VD3 alone (12.5; 25.0; 50.0 and 100.0 mM) and three concentrations of VD3 (12.5; 25.0 and 50.0 mM) in association with DXR (0.4 mM) (for co-treatments). Three controls were included: (1) negative control (ultrapure water); (2) solvent control (1% Tween 80 + 3% ethanol) and (3) positive control (doxorubicin - 0.4 mM DXR).

### 2.3.2. Analysis of flies

Emerging adult flies from the different treatments were collected and fixed in 70% ethanol. The wings were removed from the flies, soaked in Faure's solution (30 g of gum arabic, 20 mL of glycerol, 1.5 g of chloral hydrate and 5.0 mL of distilled water) and arranged on a dry slide. The slides were dried for 1 h on a hot plate (40 °C). Then, the slides were coverslipped and dried at room temperature.

Wings were examined on a microscope (Nikon Eclipse E200, 400 X) to record the number and types of spots (single or twin) as well as their size and position along the wing. Approximately 24,400 cells per wing were analyzed.

### 2.3.3. Statistical analysis

The wings of 40 flies from each treated series were scored, including controls. The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würigler (1988, 1995), resulting in three different diagnoses: negative, positive or inconclusive. The frequency of each type of spot (small single, large single or twin) and the total frequency of spots per fly for each treatment were compared pair-wise, i.e., solvent control vs. VD3 alone; and positive control (DXR) alone vs. DXR plus VD3, following recommendations of Kastenbaum and Bowman (1970) with  $p = 0.05$ . All inconclusive and weak results were analyzed with the non-parametric *U* test of Mann, Whitney and Wilcoxon ( $\alpha = \beta = 0.05$ , one sided) to exclude false positives (Frei and Würigler, 1995).

Modulating effects of VD3 on the mutagenicity and recombination of DXR were quantified by comparing the two genotypes (*mwh/flr<sup>3</sup>* and *mwh/TM3*) and by applying the formulas: Recombination ( $R$ ) =  $1 - [(\text{control corrected n/negative control in BH flies})/(\text{control corrected n/negative control in MH flies})] \times 100$ ; Mutation ( $M$ ) =  $100 - R$  (Frei and Würigler, 1996).

Based on the control-corrected spot frequencies per  $10^5$  cells, the

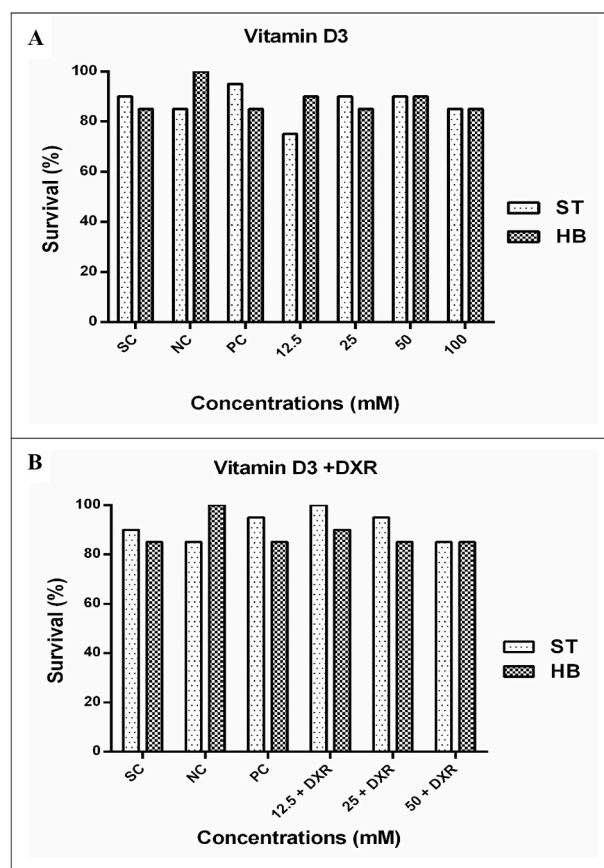


Fig. 2. Survival rates (%) of individuals from ST and HB crosses upon exposure to different concentrations of (A) VD3 (Vitamin D3 - mM) alone; (B) VD3 in combination with DXR (Doxorubicin - 0.4 mM). SC: Solvent control (1% tween 80 and 3% ethanol); NC: Negative control (ultrapure water); PC: Positive control (DXR - 0.4 mM). Data are representative of survival tests performed only once, without replica. Statistical comparisons were made by using Chi-square test for ratios for independent samples ( $p > 0.05$ ).

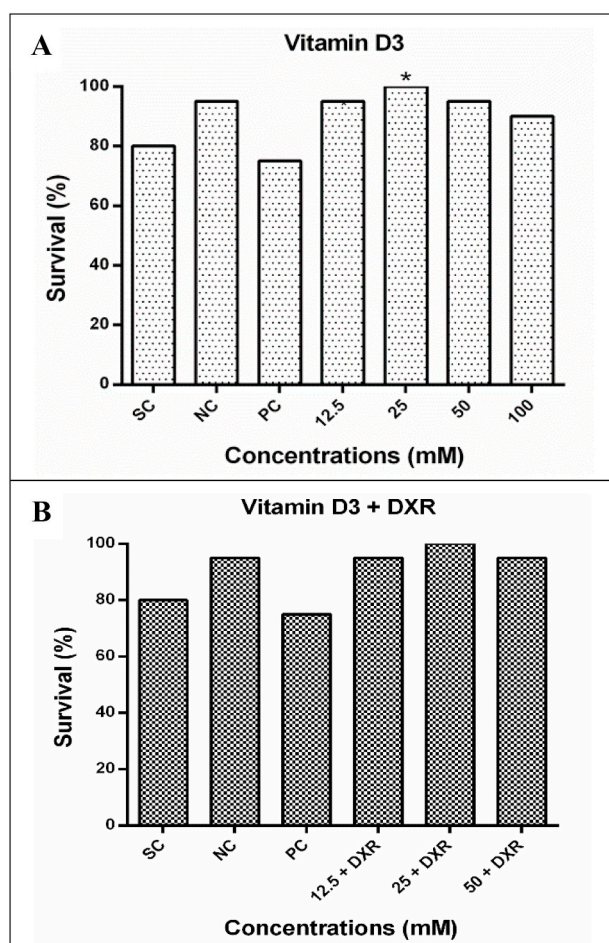
percentage of VD3 inhibition was calculated as:  $[(\text{DXE alone} - (\text{DXR} + \text{VD3})/\text{DXR alone}) \times 100]$  (Abraham, 1994).

### 2.4. Epithelial Tumor Test (ETT)

#### 2.4.1. Cross and treatments

One cross was carried out to produce the experimental larval progeny: *mwh/mwh* males were crossed with *wts, TM3, Sb<sup>1</sup>* virgin females (Nepomuceno, 2015). The *wts* strain was supplied by the Bloomington *Drosophila* Stock Center of the University of Indiana (USA), registered





**Fig. 3.** Survival rates (%) of individuals from ETT upon exposure to different concentrations of (A) VD3 (Vitamin D3 - mM) alone; (B) VD3 in combination with DXR (Doxorubicin - 0.4 mM). SC: Solvent control (1% tween 80 and 3% ethanol); NC: Negative control (ultrapure water); PC: Positive control (DXR - 0.4 mM). Data are representative of survival tests performed only once, without replica. Statistical comparisons were made by using Chi-square test for ratios for independent samples ( $p > 0.05$ ).

under the number Bloomington/7052.

Eggs were collected over 8 h in vials containing a solid agar base (4% agar in water) and a layer of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with sucrose. After  $72 \pm 4$  h, third instar larvae were washed with tap water and collected using a fine mesh sieve.

We performed a pilot study to test the VD3 toxicity in the ETT. In order to calculate the survival rates after exposure, larvae were counted before distribution in glass tubes containing an alternative culture medium rehydrated with the same concentrations of VD3 alone or in association with DXR, as described previously in the item 2.3.1 of SMART. These survival tests were performed only once. Chi-squared test was performed for statistical comparisons of the survival rate ratios for independent samples (De Rezende et al., 2013).

Therefore, for ETT the VD3 concentrations were based on survival assays in *D. melanogaster* (Fig. 3). Treatments were done in two independent experiments, with two replicates, with four concentrations of VD3 alone (12.5; 25.0; 50.0 and 100.0 mM) and three concentrations of VD3 (12.5; 25.0 and 50.0 mM) in association with DXR (0.4 mM) (for co-treatments). Three controls were included: (1) negative control (ultrapure water); (2) solvent control (1% Tween + 3% ethanol) and (3) positive control (doxorubicin - 0.4 mM DXR).

#### 2.4.2. Analysis of flies

Emerging flies with long and thin hairs were analyzed because they were carriers of the *wt*s gene and lacked the chromosome balancer (TM3, *Sb*<sup>1</sup>). Individuals were transferred to concave slides containing glycerol and then examined on a stereoscopic microscope (Bel® Photonics) for visualization and tumour counting. The presence of tumors was evaluated and recorded on a standard spreadsheet.

#### 2.4.3. Statistical analysis

Statistical differences between tumor frequencies in the experimental (at the concentrations tested) and control groups were calculated using the non-parametric Mann-Whitney *U* test at a significance level  $\alpha = 0.05$ .

#### 2.5. In silico analysis

##### 2.5.1. Molecular modeling and docking

The Ecdysone Receptor Protein (ECR) of *D. melanogaster* was modeled using homology modeling by the program Modeller (Webb and Sali, 2017). The human Vitamin D3 Receptor (VDR) protein was used as template (PDBid: 3B0T). During the modeling, 1000 structures were generated. Among all, the best quality structure was selected after evaluation by Dope (Shen and Sali, 2006), Verify3D (Eisenberg et al., 1997), Ramachandran (Ramachandran et al., 1963) and ERRAT (Colovos and Yeates, 1993) programs.

Both VDR and ECR were subjected to docking simulation studies with calcitriol (active vitamin D) through the program GOLD (Jones et al., 1997) using the parameters predefined by the program, except for the flexibility of the ligand, which was defined as 200%. Each docking was performed 50 times and the best docking positions were assessed based on a ranking of the ChemPLP scoring function. Then, a 2D plot of the protein-ligand interactions was performed.

##### 2.5.2. Molecular dynamics simulation

The best calcitriol poses for VDR and ECR from molecular docking were submitted to a receptor-ligand molecular dynamics (MD) simulation using GROMACS (Abraham et al., 2015). The ligand topology parameters were generated by SwissParam (Zoete et al., 2011) using the CHARMM force field.

The protein-ligand complex MD were performed on GROMACS (Abraham et al., 2015) using TIP3P as water model. The unit cell was defined as triclinic shape and water and ions were added. After energy minimization, an equilibrium phase was carried out using NPT and NVT conditions. The production phase was conducted by a 20 ns. The trajectories were analyzed by means of protein root mean square deviation (RMSD), H bond number and binding energy between protein and ligand.

### 3. Results

#### 3.1. Somatic Mutation and Recombination Test - SMART

The wing SMART of *D. melanogaster* was performed to assess the mutagenic and recombinogenic potential of VD3 and its possible modulating effects on DNA damage induced by doxorubicin (DXR).

The different concentrations of VD3 used alone or in combination with DXR were selected based on survival assays with *Drosophila*. The survival rates (%) of individuals from ST and HB crosses are depicted in Fig. 2. Therefore, these survival data validated the use of four concentrations (12.5; 25.0; 50.0 and 100.0 mM) of VD3 alone, and three concentrations of VD3 (12.5; 25.0 and 50.0 mM) in combination with DXR, which were tested in two independent experiments. The data were pooled after verifying that there were no significant differences between repetitions.

The results for the MH and BH descendants, derived from the Standard Cross (ST), treated with different concentrations of VD3 alone or in

**Table 1**

Summary of results obtained with the *Drosophila melanogaster* wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with different concentrations of vitamin D3 (VD3 - mM), ultrapure water (negative control), solvent control and doxorubicin 0.4 mM (DXR - positive control).

Genotypes and Treatments (mM)	Number of flies	Spots per fly (number of spots); statistical diagnoses <sup>a</sup>				Spots with <i>mwh</i> clone <sup>c</sup>	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells per division <sup>d</sup>		Recombination (%)	Inhibition <sup>e</sup> (%)
		Small single spots (1–2 cells) <sup>b</sup>	Large single spots (>2 cells) <sup>b</sup>	Twin spots	Total spots		Observed	Control Corrected		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>										
Negative control	40	0.95 (38)	0.03 (1)	0.00 (0)	0.98 (39)	37	1.90			
Solvent control	40	0.58 (23) -	0.18 (7) +	0.03 (1) i	0.78 (31) -	28	1.43	−0.47		
VD3 12.5	40	0.85 (34) i	0.05 (2) -	0.05 (2) i	0.95 (38) -	37	1.90	0.47		
VD3 25.0	40	0.80 (32) i	0.10 (4) -	0.00 (0) i	0.90 (36) -	36	1.84	0.41		
VD3 50.0	40	0.60 (24) -	0.05 (2) -	0.00 (0) i	0.65 (26) -	26	1.33	−0.10		
VD3 100.0	40	0.58 (23) -	0.05 (2) -	0.03 (1) i	0.65 (26) -	25	1.28	−0.15		
DXR 0.4	40	6.20 (248) +	8.60 (344) +	6.95 (278) +	21.75 (870) +	824	42.21	40.78	96.62	
VD3 12.5 + DXR 0.4	40	5.80 (232)	4.28 (171) *	4.20 (168) *	14.28 (571) *	555	28.43	27.00	99.26	33.79
VD3 25.0 + DXR 0.4	40	2.70 (108) *	2.88 (115) *	2.55 (102) *	8.13 (325) *	310	15.88	14.45	97.85	64.57
VD3 50.0 + DXR 0.4	40	2.93 (117) *	1.80 (72) *	1.45 (58) *	6.18 (247) *	235	12.04	10.61	94.15	73.98
<i>mwh/TM3</i>										
Negative control	40	0.58 (23)	0.03 (1)	f	0.60 (24)	24	1.23			
DXR 0.4	40	1.03 (41) +	0.25 (10) +		1.28 (51) +	51	2.61	1.38		
VD3 12.5 + DXR 0.4	40	0.40 (16) *	0.10 (4)		0.50 (20) *	20	1.02	−0.20		
VD3 25.0 + DXR 0.4	40	0.33 (13) *	0.13 (5)		0.45 (18) *	18	0.92	−0.31		
VD3 50.0 + DXR 0.4	40	0.25 (10) *	0.05 (2) *		0.30 (12) *	12	0.61	−0.62		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

<sup>f</sup> Balancer chromosome TM3 does not carry the *flr<sup>3</sup>* mutation and recombination is suppressed, due to the multiple inverted regions in these chromosomes.

<sup>a</sup> Statistical diagnose according to Frei and Würzler (1988, 1995). U test, two sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive;  $p < 0.05$  DXR vs. negative control; VD3 vs. solvent control; \*, positive;  $p \leq 0.05$  VD3 + DXR vs. DXR (0.4 mM) only.

<sup>b</sup> Including rare *flr<sup>3</sup>* single spots.

<sup>c</sup> Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

<sup>d</sup> Frequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction).

<sup>e</sup> Calculated as  $\{[\text{DXR alone} - \text{DXR} + \text{VD3}]/\text{DXR}\} \times 100$ , according to Abraham (1994).

combination with DXR are shown in Table 1. In the MH individuals, VD3 alone did not exhibit any mutagenicity at the doses used. DXR treatment, as expected, induced positive results for all classes of spots (small single, large single and twin spots) when compared to the negative control ( $p < 0.05$ ). The simultaneous administration of VD3 (12.5; 25.0 or 50.0 mM) with DXR (0.4 mM) inhibited significantly ( $p < 0.05$ ) the number of DXR-induced mutant spots (33.79, 64.57 and 73.98%, respectively) in comparison to DXR alone. Due to the significant reduction observed in flies simultaneously treated with VD3 plus DXR, the wings of the BH descendants resulting from these treatments were also scored. Based on the clone induction frequency per 10<sup>5</sup> cells, we compared the number of observed spots in the MH and BH individuals and quantified the contribution (%) of mutation and recombination to the total number of observed spots (Frei and Würzler, 1996). The observed frequency of recombination was higher than 94% for all treatments.

The results of the HB cross are summarized in Table 2. The findings obtained with the MH individuals treated with VD3 alone were negative at all tested concentrations when compared to the solvent control. DXR statistically increased ( $p < 0.05$ ) all categories of spots when compared

to the negative control. The recombinogenic activity was the major response to DXR-induced DNA damage (98.94%). When administered with DXR, all concentrations of VD3 (12.5; 25.0 or 50.0 mM) were found to significantly decrease the number of spots ( $p < 0.05$ ) induced by DXR. The inhibition rate was, respectively, 45.25; 49.52 and 50.27%. By comparing the number of observed spots in the MH and BH individuals, we found that the induced spots were mainly due to recombination (respectively 95.13; 98.10 and 97.44%).

### 3.2. Epithelial Tumor Test - ETT

The ETT of *D. melanogaster* was performed to assess the carcinogenic potential of VD3 or its anticarcinogenic potential when associated to doxorubicin (DXR). The different concentrations of VD3 used alone or in combination with DXR were selected based on survival assays with *Drosophila*. The survival rates (%) are depicted in Fig. 3.

Table 3 shows the frequency of tumors found in the different segments of the body of *D. melanogaster* treated with different concentrations of VD3 alone or in combination with DXR.

**Table 2**

Summary of results obtained with the *Drosophila melanogaster* wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with different concentrations of vitamin D3 (VD3 - mM), ultrapure water (negative control), solvent control and doxorubicin 0.4 mM (DXR - positive control).

Genotypes and Treatments (mM)	Number of flies	Spots per fly (number of spots); statistical diagnoses <sup>a</sup>				Spots with <i>mwh</i> clone <sup>c</sup>	Frequency of clone formation/10 <sup>5</sup> cells per division <sup>d</sup>		Recombination (%)	Inhibition <sup>e</sup> (%)
		Small single spots (1–2 cells) <sup>b</sup>	Large single spots (>2 cells) <sup>b</sup>	Twin spots	Total spots		Observed	Control Corrected		
<i>mwh/flr<sup>3</sup></i>										
Negative control	40	1.10 (44)	0.15 (6)	0.08 (3)	1.33 (53)	49	2.51			
Solvent control	40	1.15 (46) i	0.08 (3) i	0.13 (5)	1.35 (54)	51	2.61	0.10		
VD3 12.5	40	1.25 (50) -	0.15 (6) i	0.08 (3)	1.48 (59)	58	2.97	0.36		
VD3 25.0	40	1.10 (44) -	0.18 (7) i	0.05 (2)	1.33 (53)	53	2.72	0.10		
VD3 50.0	40	0.93 (37) -	0.08 (3) i	0.03 (1)	1.03 (41)	41	2.10	−0.51		
VD3 100.0	40	0.75 (30) -	0.15 (6) i	0.10 (4)	1.00 (40)	40	2.05	−0.56		
DXR 0.4	40	6.85 (274) +	10.20 (408) +	8.95 (358) +	26.00 (1040) +	988	50.61	48.00	98.94	
VD3 12.5 + DXR 0.4	40	5.40 (216) f+	4.73 (189) +	4.60 (184) +	14.73 (589) f+	564	28.89	26.28	95.13	45.25
VD3 25.0 + DXR 0.4	40	4.25 (170) f+	4.80 (192) +	4.65 (186) +	13.70 (548) +	524	26.84	24.23	98.10	49.52
VD3 50.0 + DXR 0.4	40	3.73 (149) +	4.90 (196) +	4.88 (195) +	13.50 (540) +	517	26.49	23.87	97.44	50.27
<i>mwh/TM3</i>										
Negative control	40	0.95 (38)	0.15 (6)	f	1.10 (44)	44	2.25			
DXR 0.4	40	0.90 (36) -	0.45 (18) +		1.35 (54)	54	2.77	0.51		
VD3 12.5 + DXR 0.4	40	1.48 (59) +	0.25 (10) i		1.73 (69)	69	3.53	1.28		
VD3 25.0 + DXR 0.4	40	1.00 (40) -	0.33 (13) i		1.33 (53)	53	2.72	0.46		
VD3 50.0 + DXR 0.4	40	1.18 (47) -	0.23 (9) i		1.40 (56)	56	2.87	0.61		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr<sup>3</sup>*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

<sup>f</sup> Balancer chromosome TM3 does not carry the *flr<sup>3</sup>* mutation and recombination is suppressed, due to the multiple inverted regions in these chromosomes.

<sup>a</sup> Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988, 1995). U test, two sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive;  $p < 0.05$  DXR vs. negative control; VD3 vs. solvent control; \*, positive;  $p \leq 0.05$  VD3 + DXR vs. DXR (0.4 mM) only.

<sup>b</sup> Including rare *flr<sup>3</sup>* single spots.

<sup>c</sup> Considering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

<sup>d</sup> Frequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction).

<sup>e</sup> Calculated as  $\{[DXR \text{ alone} - DXR + VD3]/DXR\} \times 100$ , according to Abraham (1994).

**Table 3**

Summary of results obtained with the *Drosophila melanogaster* Epithelial Tumor Test (ETT) after chronic treatment of larvae with different concentrations of vitamin D3 (VD3 - mM), ultrapure water (negative control), solvent control and doxorubicin 0.4 mM (DXR - positive control).

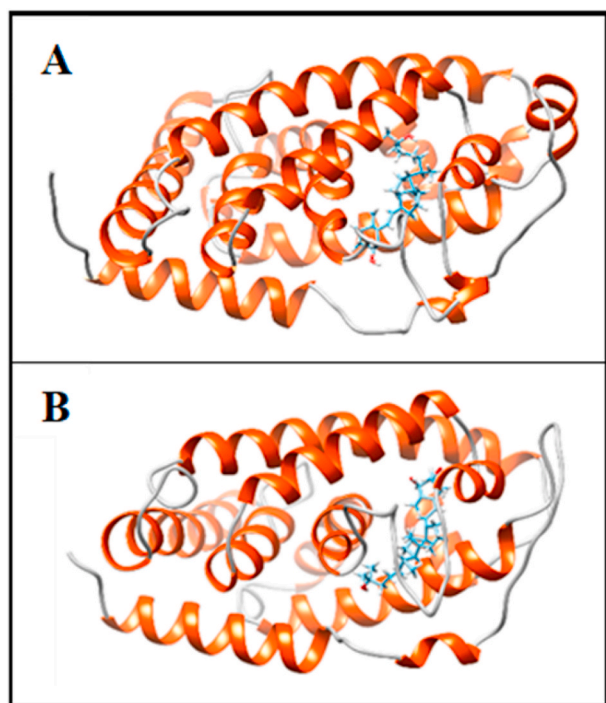
Treatment mM	Number of flies	Frequency of tumors analyzed (total of tumors)						Frequency of tumor	Reduction (%)
		Eyes	Head	Wings	Body	Legs	Halters		
Negative control	200	0.000 (00)	0.085 (17)	0.040 (08)	0.110 (22)	0.025 (05)	0.000 (00)	0.260 (52)	
Solvent control	200	0.000 (00)	0.070 (14)	0.055 (11)	0.150 (30)	0.055 (11)	0.000 (00)	0.330 (66)	
Positive control	200	0.045 (09)	0.130 (26)	1.390 (278)	0.770 (154)	0.570 (114)	0.085 (17)	2.990 (598)*	
VD3 12.5	200	0.000 (00)	0.050 (10)	0.030 (06)	0.080 (16)	0.045 (09)	0.000 (00)	0.205 (41)	
VD3 25.0	200	0.005 (01)	0.085 (17)	0.055 (11)	0.110 (22)	0.030 (06)	0.005 (01)	0.290 (58)	
VD3 50.0	200	0.000 (00)	0.050 (10)	0.030 (06)	0.130 (26)	0.010 (02)	0.015 (03)	0.235 (47)	
VD3 100.0	200	0.000 (00)	0.085 (17)	0.050 (10)	0.190 (38)	0.080 (18)	0.000 (00)	0.405 (81)	
VD3 12.5 + DXR 0.4	200	0.015 (03)	0.055 (11)	0.305 (61)	0.435 (87)	0.210 (42)	0.045 (09)	1.065 (213)**	64.4
VD3 25.0 + DXR 0.4	200	0.030 (06)	0.050 (10)	0.210 (42)	0.425 (85)	0.145 (29)	0.015 (03)	0.875 (175)**	70.7
VD3 50.0 + DXR 0.4	200	0.010 (02)	0.035 (07)	0.140 (28)	0.290 (58)	0.140 (28)	0.005 (01)	0.620 (124)**	79.3

Statistical diagnosis according to the Mann and Whitney Test. \*, Different from the negative control. Level of significance  $p \leq 0.05$ . \*\*, Different from the positive control. Level of significance  $p \leq 0.05$ .

The total frequency of tumors observed in the heterozygote descendants of *D. melanogaster* treated with different concentrations of VD3 (12.5; 25.0; 50.0 or 100.0 mM) was not statistically significant ( $p >$

0.05) when compared to the frequencies observed in the solvent control. Thus, the results reported no carcinogenic potential of VD3 in the concentrations used, in *D. melanogaster*. The frequency of tumors observed





**Fig. 4.** Molecular modeling and docking between: (A) calcitriol (active vitamin D) and its VDR receptor; (B) calcitriol and the ecdysone receptor.

in those treated with DXR (0.4 mM) was statistically significant ( $p < 0.05$ ) when compared to the frequencies in the negative control. On the other hand, the frequencies of tumors observed in the fruit flies treated with VD3 (12.5; 25.0 or 50.0 mM) in combination with DXR were significantly different ( $p < 0.05$ ) from the frequencies observed in those treated with DXR alone. Table 3 also demonstrates that the reduction occurs in the number of tumors, in a dose dependent manner. Therefore, these results revealed that VD3 has modulatory effects on the carcinogenicity induced by DXR.

### 3.3. *In silico* analysis

Fig. 4 indicates the result of molecular modeling and docking between calcitriol (active vitamin D) and its VDR receptor (Fig. 4A) and also between calcitriol and the ecdysone receptor (EcR) (Fig. 4B). Accordingly, the calcitriol in the EcR protein occupies the binding site in an inverted form compared to the VDR protein.

Fig. 5 illustrates a 2D plot of the ligand interactions with receptor proteins, in this case, between calcitriol and VDR (Fig. 5A) and also between calcitriol and EcR (Fig. 5B). In this plot, it is possible to visualize, in pink, the hydrophobic interactions; in green, hydrogen bonds and in red, unfavorable interactions. Despite the unfavorable interaction detected in the interaction between calcitriol and EcR, the diagrams evidence the presence of hydrogen bonds and hydrophobic interactions that are essential for stabilization of calcitriol in the binding site.

Fig. 6 shows the simulation of the molecular dynamics between calcitriol and VDR and EcR receptor proteins. Fig. 6A reveals the stability of the proteins, being noticeable that, for both, there is not much variation, mainly in the second half of the simulation, thus indicating that the proteins are in equilibrium with the system. Fig. 6B exhibits the hydrogen bonds made by calcitriol and proteins, with a result considered satisfactory, because during the 20 ns of simulation these bonds increased, demonstrating higher stability between calcitriol and receptors. Fig. 6C reports the measurement of the binding energy between the ligand and the protein; in both cases, there was a downward trend, highlighting an increase in the stability of both protein-ligand

complexes.

*In silico* analysis indicate that, as with VDR, the calcitriol and EcR binding, although being in an inverted position when compared to the first one, revealed strong evidence of its stability with protein, as verified by docking and MD analysis. These considerations, in accordance with experimental data, confirm the possibility, in *D. melanogaster*, of signal transduction between the active form of VD3 (calcitriol) and the ecdysone receptor, enabling the occurrence of the different events attributed to this receptor at distinct stages of the life cycle in this model organism.

## 4. Discussion

Our results demonstrated that vitamin D3 (VD3) is not mutagenic neither carcinogenic and displays antimutagenic and anticarcinogenic effects when co-administered with doxorubicin (DXR) on *Drosophila* through the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) and the Epithelial Tumor Test (ETT). Molecular modeling and molecular dynamics between VD3 and ecdysone receptor (EcR) showed a stable interaction, indicating the possibility of signal transduction between VD3 and EcR.

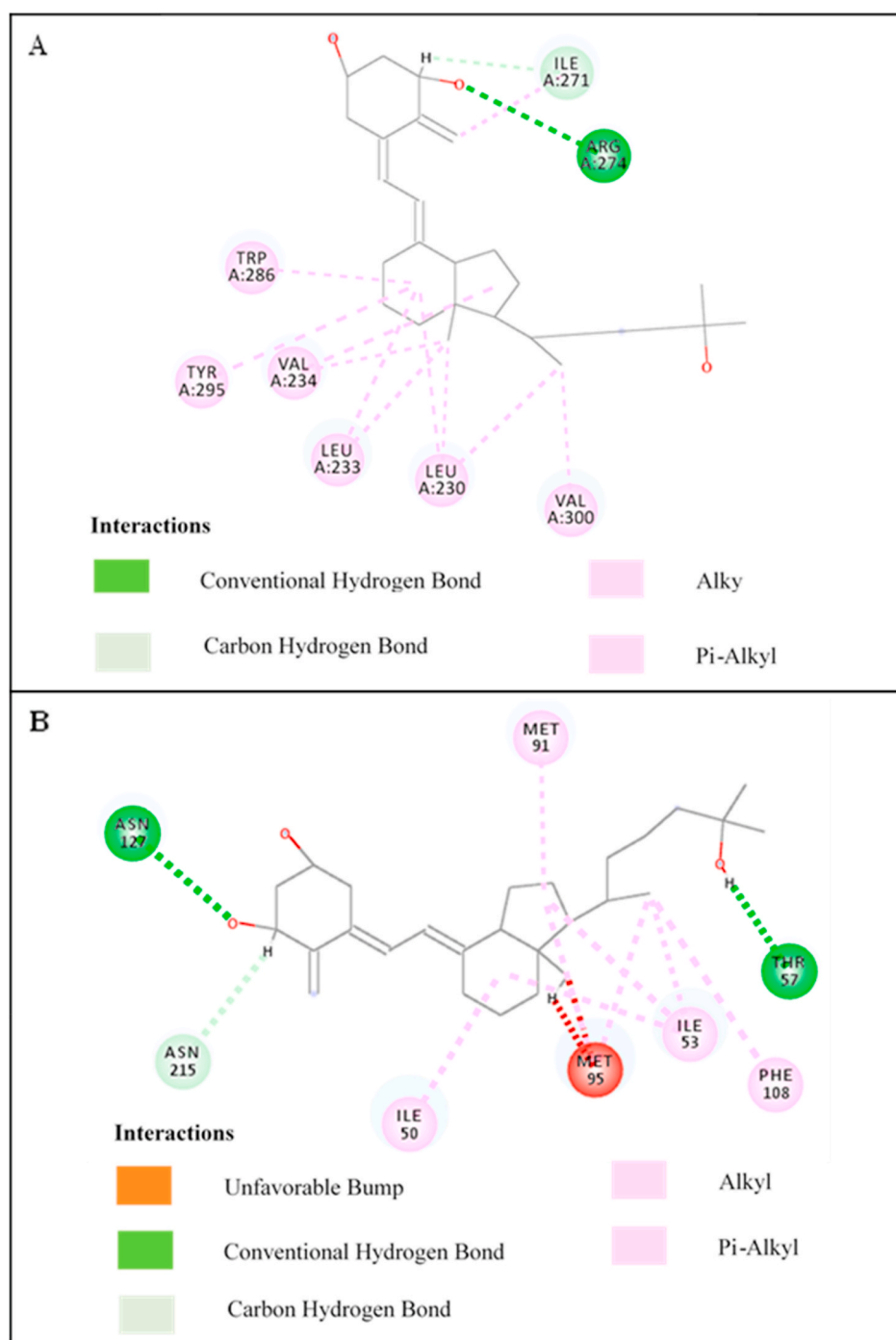
In order to carry out this work, VD3 was diluted in Tween 80 and ethanol in ultrapure water. Tween 80, also known as polysorbate 80, is a ubiquitously used solubilizing agent with hydrophilic characteristic, which enables the formation of hydrogen bonds with the water molecule. Besides that, the presence of an extensive carbon chain ( $C_{64}H_{124}O_{26}$ ) allows solubility in nonpolar compounds. The emulsifying property of Tween 80 enables a solution between VD3 (nonpolar) and water (polar) (Feng et al., 2006; Perazzo et al., 2012). Thus, the findings observed in fruit flies treated with VD3 in both tests (SMART and ETT) were compared with the results obtained in the solvent control (1% Tween 80 and 3% ethanol in water). On the other hand, DXR was dissolved in ultrapure water. The results observed in flies treated with DXR in both tests (SMART and ETT) were compared with the negative control (ultrapure water).

In the SMART, VD3 alone or in association with DXR was tested in two independent experiments with two replicates. The data were pooled after verifying that there were no significant differences between repetitions.

The results observed with VD3 alone, in both crosses (ST and HB) of the SMART, were rather similar. VD3 itself did not show genotoxicity at the doses used. Prior studies found in the literature reported the lack of mutagenicity of VD3 in different organisms and in different test systems. Remarkably, SMD-502, a VD3 analog, was not mutagenic in skin and liver of *gpt* delta transgenic mice and in GDL1 cells (Takeiri et al., 2012). Moreover, there was no overall relationship between 25(OH)D and DNA damage in human lymphocytes (Nair-Shalliker et al., 2012); and VD3 supplementation reduced oxidative stress and DNA damage in patients with type 2 diabetes (Fagundes et al., 2019). In turn, no association between VD and oxidation-induced DNA damage was observed in peripheral lymphocytes of young (18–26 years) adults, but VD deficiency was highly prevalent in the young adults studied, and the authors could not rule out an ameliorative effect of correction of VD deficit on DNA damage (Wang et al., 2016).

The positive control DXR, as expected, induced high frequencies of all types of mutant spots in both ST and HB crosses. Comparison of the frequencies of wing spots in the MH flies (*mwh/flr<sup>3</sup>* genotype) and BH flies (*mwh/TM3* genotype) from both ST and HB crosses indicated that induced recombination was the major response for the treatments with DXR alone. These findings were further supported by previous investigations with DXR in *Drosophila* wing SMART (Valadares et al., 2008; De Rezende et al., 2009; Orsolin et al., 2016; Silva-Oliveira et al., 2016; Oliveira et al., 2017).

DXR has different mechanisms that promote the onset of DNA damage, such as the binding and inhibition of the enzyme topoisomerase II, a DNA gyrase with high activity in proliferative cells (Kaiserová et al.,



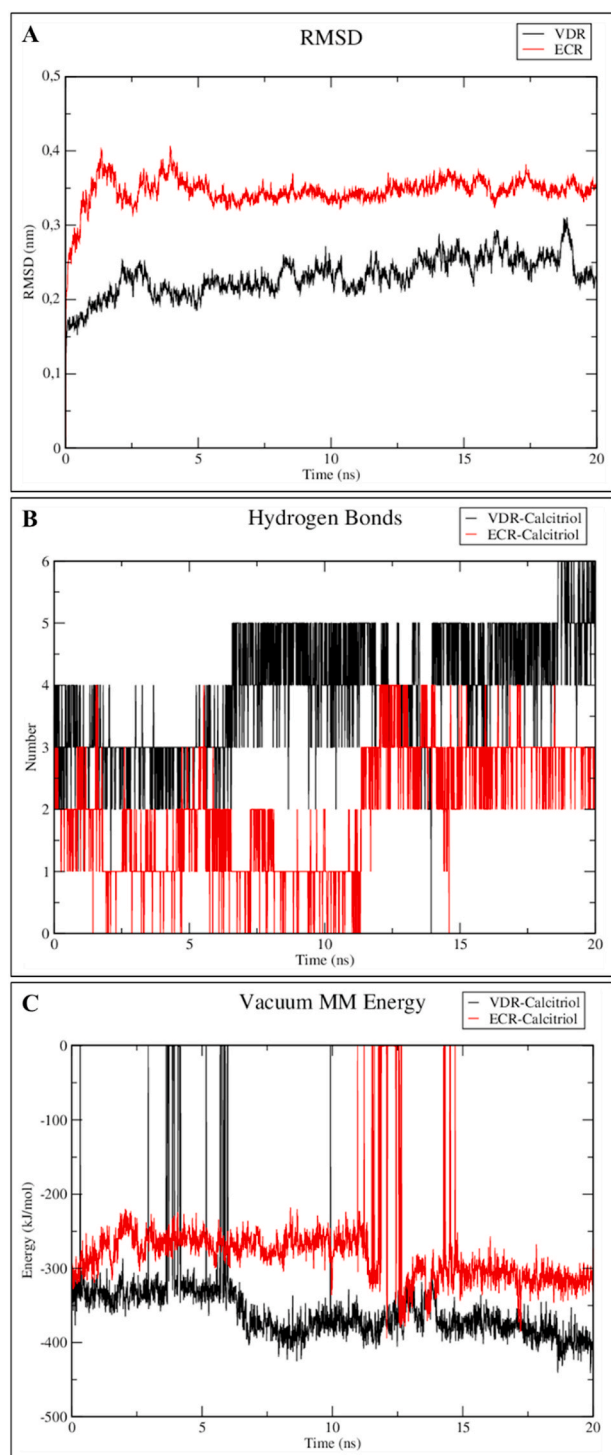
**Fig. 5.** 2D plotting of ligand-protein interactions: (A) Calcitriol and VDR receptor; (B) Calcitriol and the ecdysone receptor. Hydrophobic interactions (pink); hydrogen bonds (green) and unfavorable interactions (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2006; Marinello et al., 2018). Furthermore, the inhibition of the anti-cancer drug leads to genetic instability and causes reductive biotransformation of the quinone ring, yielding a semiquinone radical, which has a direct toxic effect or undergoes redox reactions (Ramji et al., 2003). DXR also contributes to reactive oxygen species (ROS) production, conferring secondary cytotoxicity (Gewirtz, 1999; Doroshov, 2019). In fact, Mokhtari et al. (2017) reported the pivotal role of VD3 in suppressing the NADPH oxidase enzyme complex, which acts in the formation of ROS.

The modulation of VD3 on DXR-induced mutant spots in *Drosophila* was also evaluated. Regardingly, VD3 was able to reduce the total

frequency of mutant spots induced by DXR in all concentrations in both (ST and HB) crosses. In addition, VD3 was effective in reducing the mutagenic effect of DXR, but did not interfere on the recombinogenic effects of DXR. Our findings reinforce the protective effects of VD3 on the damage generated by DXR directly and also after its metabolism.

Although previous studies have demonstrated that VD administration reportedly has lowered DNA damage in type 2 diabetic mice, and higher DNA damage was reported in mononuclear cells of severely asthmatic patients who were VD deficient (Wang et al., 2016), the current literature has shown controversial effects about the ability of VD3 to prevent or ameliorate oxidative stress biomarkers (Tagliaferri



**Fig. 6.** Simulation of molecular dynamics between calcitriol and proteins. (A) Protein stability, VDR and ECR; (B) Hydrogen bonds between calcitriol and proteins; (C) Energy between binder and proteins.

et al., 2019). The protection against DXR-induced mutagenicity observed in the present research may be due to inhibition of free radicals and increased antioxidant status. Thus, further studies are needed to elucidate the antioxidant effect of VD supplementation.

In the ETT, VD3 alone or in association with DXR was tested in two independent experiments. The data were pooled after verifying that there were no significant differences between repetitions. The results observed with VD3 alone did not show carcinogenicity at the doses used, and the vitamin was able to significantly reduce the frequency of tumors

induced by DXR in all concentrations analyzed. Pawlowska et al. (2016) described that the active form of VD3 removes DNA damage induced by ultraviolet (UV) radiation in precancerous cells via nucleotide excision repair (NER), which reduces the nitrosylation process of DNA repair enzymes.

Furthermore, prior studies demonstrated that VD3 may present oncoprotective properties through regulation of growth factor, cytokine synthesis and signaling, modulation of inflammation, cell proliferation and differentiation, angiogenesis, invasive and metastatic potential, apoptosis, miRNA expression regulation and modulation of the Hedgehog signaling pathway (Harris and Go, 2004; Merchan et al., 2017). A literature review offers an up-to-date analysis of VD and VDR roles in carcinogenesis (Merchan et al., 2017).

VD, as a prohormone, undergoes two-step metabolism in liver and kidney to produce a biologically active metabolite, calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]), which binds to the VD receptor (VDR) for the regulation of expression of diverse genes (Jeon and Shin, 2018; Almaini et al., 2019; El-Boshy et al., 2019).

Calcitriol is synthesized by a steroid precursor, cholecalciferol or pre-VD3, recognized as a molecule similar to the cell membrane antioxidants, which is bioactivated through two steps under the action of the *cyp24a1* gene, thereby resulting in the formation of calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>) and calcitriol (Wheeler and Nijhout, 2003; Sakaki et al., 2014). The *cyp24a1* gene, found in humans, has an ortholog in *D. melanogaster*, the *cyp12b2* (NCBI, 2020).

In vertebrates, it has been described the existence of a nuclear VDR with the intrinsic ability to be activated by calcitriol. Apart from this active metabolite, VDR is heterodimerized by the retinoid X receptor (RXR) and its ultraspicle homolog (USP), found in *D. melanogaster* (Yao et al., 1992). Dela Cruz et al. (2000) relate a remarkable activation of VDR when associated with USP, with no requirement that this receptor always be linked to the active metabolite of VD3. Laudet et al. (1992) mentioned a close evolutionary relationship of VDR and the Ecdysone Receptor (ECR) found in *D. melanogaster*, owing to the similarity in the ligand binding domain present in these two receptors. ECR has three isoforms that, when activated by USP and the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (20E), induce cell proliferation during the larval period and maturation during the pupal period (Dela Cruz et al., 2000; Delanoue et al., 2010). Signaling by the ECR complex for cell proliferation occurs until the end of the larval period, due to the gradual increase of 20E and, upon reaching ecdysone peak, novel genes will be activated for the purpose of maturation during the pupal period (Dela-noue et al., 2010; Tsao et al., 2016).

In the present study, for better understanding of the molecular interactions of VD3 and receptors, we performed *in silico* analysis with molecular docking and molecular dynamics, which allowed us to verify a stable interaction between calcitriol and ECR. Thus, when VD3 was tested at ETT, it was verified that the larval and pupal periods occurred in regular time, which can be explained by the favorable interaction between calcitriol and ECR. In this sense, we suggest that the VD3 active metabolite, at the end of the larval period, stopped inducing cell proliferation, as previously described by Sakaki et al. (2014), hence inhibiting the carcinogenesis process.

## 5. Conclusion

The results obtained in this study allow us to conclude that, under the experimental conditions, VD3 is not toxic, mutagenic neither carcinogenic and has modulatory effects on the mutagenicity and carcinogenicity induced by DXR in *D. melanogaster*. *In silico* analysis with molecular modeling and molecular dynamics between calcitriol and Ecdysone Receptor (ECR) showed a stable interaction, indicating the possibility of signal transduction between VD3 and ECR. In this context, based on literature data, our findings suggest that the modulatory effects of VD3 can be explained by its antioxidant and apoptotic properties.



## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## CRediT authorship contribution statement

**Mirley Alves Vasconcelos:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **Priscila Capelari Orsolin:** Writing - original draft. **Victor Constante Oliveira:** Writing - original draft. **Paula Marynella Alves Pereira Lima:** Writing - original draft. **Maria Paula Carvalho Naves:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **Nilson Nicolau-Júnior:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. **Ana Maria Bonetti:** Writing - original draft. **Mário Antônio Spanó:** Writing - original draft.

## Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Universidade Federal de Uberlândia (UFU) and Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

## References

- Abdelghany, A.H., BaSalamah, M.A., Idris, S., Ahmad, J., Refaat, B., 2016. The fibrolytic potentials of vitamin D and thymoquinone remedial therapies: insights from liver fibrosis established by CCl<sub>4</sub> in rats. *J. Transl. Med.* 14, 1–15.
- Abolaji, A.O., Kamdem, J.P., Farombi, E.O., Rocha, J.B.T., 2013. *Drosophila melanogaster* as a promising model organism in toxicological studies. *Arch. Bas. App. Med.* 1, 33–38.
- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25.
- Abraham, S.K., 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9, 383–386.
- Agrawal, P., Singh, H., Srivastava, H.K., Singh, S., Kishore, G., Raghava, G.P.S., 2019. Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC Bioinfo.* 19, 105–242.
- Almairani, R.A., Almasmoum, H., Ghaith, M.M., El-Boshy, M., Idris, S., Ahmad, J., Abdelghany, A.H., BaSalamah, M.A., Mahbub, A., Refaat, B., 2019. Enhanced remedial effects for vitamin D3 and calcium co-supplementation against pre-existing lead nephrotoxicity in mice: the roles of renal calcium homeostatic molecules. *BBA-Mol. Basis Dis.* 1865, 512–524.
- Bunch, B.L., Ma, Y., Attwood, K., Amable, L., Luo, W., Morrison, C., Guru, K.A., Woloszyńska-Read, A., Hershberger, P.A., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2019. Vitamin D3 enhances the response to cisplatin in bladder cancer through VDR and TAp73 signaling crosstalk. *Canc. Med-Us* 8, 2449–2461.
- Colovos, C., Yeates, T.O., 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2, 1511–1519.
- De Andrade, H.H.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2003. Wing somatic mutation and recombination test (Org.). In: Daryl, S. Henderson (Ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols - Methods in Molecular Biology*, vol. 247. Humana Press Inc., Totowa, pp. 389–412.
- De Rezende, A.A.A., Graf, U., Guterres, Z.R., Kerr, W.E., Spanó, M.A., 2009. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1466–1472.
- De Rezende, A.A.A., Munari, C.C., Oliveira, P.F., Ferreira, N.H., Tavares, D.C., Silva, M.L.A., Rezende, K.C.S., Spanó, M.A., 2013. A comparative study of the 21 modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem. Toxicol.* 55, 645–652.
- Dela Cruz, F.E., Kirsch, D.R., Heinrich, J.N., 2000. Transcriptional activity of *Drosophila melanogaster* ecdysone receptor isoforms and ultraspiracle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 183–191.
- Delanoue, R., Slaidina, M., Léopold, P., 2010. The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing *dMyc* function in *Drosophila* fat cells. *Dev. Cell* 18, 1012–1021.
- DeSantis, K.A., Robilotto, S.L., Matson, M., Kotb, N.M., Lapierre, C.M., Minhas, Z., Leder, A.A., Abdul, K., Facticeau, E.M., Welsh, J., 2020. VDR in salivary gland homeostasis and cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 199, 1–10.
- Doroshov, J.H., 2019. Mechanisms of anthracycline-enhanced reactive oxygen metabolism in tumor cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019, 9474823. <https://doi.org/10.1155/2019/9474823>.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., Bowie, J.U., 1997. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol.* 277, 396–404.
- El-Boshy, M., BaSalamah, M.A., Ahmad, J., Idris, S., Mahbub, A., Abdelghany, A.H., Almairani, R.A., Almasmoum, H., Ghaith, M.M., Elzubier, M., Refaat, B., 2019. Vitamin D protects against oxidative stress, inflammation and hepatorenal damage induced by acute paracetamol toxicity in rat. *Free Radic. Biol. Med.* 141, 310–321.
- Elhusseini, H., Elkafas, H., Abdelaziz, M., Halder, S., Atabekov, I., Eziba, N., Ismail, N., El Andaloussi, A., Al-Hendy, A., 2018. Diet-induced vitamin D deficiency triggers inflammation and DNA damage profile in murine myometrium. *Int. J. Womens Health* 10, 503–514.
- Fagundes, G.E., Macan, T.P., Rohr, P., Damiani, A.P., da Rocha, F.R., Pereira, M., Longaretti, L.M., Vilela, T.C., Ceretta, L.B., Mendes, C., Silveira, P.C.L., Teixeira, J.P.F., de Andrade, V.M., 2019. Vitamin D3 as adjuvant in the treatment of type 2 diabetes mellitus: modulation of genomic and biochemical instability. *Mutagenesis* 34, 135–145.
- Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., 2019. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed. Pharmacother.* 109, 391–401.
- Feng, J., Zeng, Y., Ma, C., Cai, X., Zhang, Q., Tong, M., Yu, B., Xu, P., 2006. The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7390–7393.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203, 297–308.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334, 247–258.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11, 315–325.
- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthracycline antibiotics andriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57, 727–741.
- Gharbaran, R., Zhang, B., Valerio, L., Onwumere, O., Wong, M., Mighty, J., Redenti, S., 2019. Effects of vitamin D3 and its chemical analogs on the growth of Hodgkin's lymphoma, *in vitro*. *BMC Res. Notes* 12, 1–6.
- Gombart, A.F., Pierre, A., Maggini, S., 2020. A Review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients* 12, 1–40.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würigler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222, 359–373.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivity cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59–67.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188.
- Grant, W.B., Lahore, H., McDonnell, S.L., Baggerly, C.A., French, C.B., Aliano, J.L., Bhattoa, H.P., 2020. Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and Covid-19 infections and deaths. *Nutrients* 12, 988.
- Grzesiak, M., Waszkiewicz, E., Wojtas, M., Kowalik, K., Franczak, A., 2019. Expression of vitamin D receptor in the porcine uterus and effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on progesterone and estradiol-17 $\beta$  secretion by uterine tissues *in vitro*. *Theriogenology* 125, 102–108.
- Halhali, A., Figueras, A.G., Díaz, L., Avila, E., Barrera, D., Hernández, G., Larrea, F., 2010. Effects of calcitriol on calbindins gene expression and lipid peroxidation in human placenta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121, 448–451.
- Harris, D.M., Go, V.L., 2004. Vitamin D and colon carcinogenesis. *J. Nutr.* 134, 3463S–3471S.
- Huss, L., Butt, S.T., Borgquist, S., Elebro, K., Sandsvedn, M., Rosendahl, A., Manjer, J., 2019. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast Cancer Res.* 21, 1–13.
- Ilie, P.C., Stefanescu, S., Smith, L., 2020. The Role of Vitamin D in the Prevention of Coronavirus Disease 2019 Infection and Mortality. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-21211/v1>.
- Irving, A.A., Plum, L.A., Blaser, W.J., Ford, M.R., Weng, C., Clipson, L., DeLuca, H.F., Dove, W.F., 2015. Cholecalciferol or 25-Hydroxycholecalciferol neither prevents nor treats adenomas in a rat model of familial colon cancer. *J. Nutr.* 145, 291–298.
- Jeon, S.-M., Shin, E.-A., 2018. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp. Mol. Med.* 50, 20.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., Leach, A.R., Taylor, R., 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 267, 727–748.
- Kaiserová, H., den Hartog, G.J.M., Šimůnek, T., Schröterová, L., Kvasnicková, E., Bast, A., 2006. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *Br. J. Pharmacol.* 149, 920–930.
- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549.
- Koon, A.C., Chan, H.Y.E., 2017. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study RNA toxicity of repeat expansion-associated neurodegenerative and neuromuscular diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 70.
- Koren, R., Hadari-Naor, I., Zuck, E., Rotem, C., Liberman, U.A., Ravid, A., 2001. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Canc. Res.* 61, 1439–1444.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., Stéhelin, D., 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003–1013.
- Luccock, M., Jones, P., Martin, C., Beckett, E., Yates, Z., Furst, J., Veysey, M., 2015. Vitamin D: beyond metabolism. *J. Evid. Based Compl. Altern. Med.* 20, 310–322.
- Marinello, J., Delcuratolo, M., Capranico, G., 2018. Anthracyclines as topoisomerase II poisons: from early studies to new perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3480.

- Merchan, B.B., Morcillo, S., Martin-Núñez, G., Tinahones, F.J., Macías-González, M., 2017. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: through epidemiology and basic sciences. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 167, 203–218.
- Mokhtari, Z., Hekmatdoost, A., Nourian, M., 2017. Antioxidant efficacy of vitamin D. *J. Parathy. Dis.* 5, 11–16.
- Morais, C.R., Bonetti, A.M., Mota, A.A., Campos, C.F., Souto, H.N., Naves, M.P.C., Santos, V.S.V., Campos-Júnior, E.O., Pavanin, L.A., de Rezende, A.A.A., Spanó, M.A., Pereira, B.B., 2018. Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage. *Chemosphere* 201, 342–350.
- Morais, C.R., Carvalho, S.M., Naves, M.P.C., Araújo, G., de Rezende, A.A.A., Bonetti, A.M., Spanó, M.A., 2017. Mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of thiametoxam insecticide and formulated product in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 187, 163–172.
- Nair-Shalliker, V., Fenech, M., Forder, P.M., Clements, M.S., Armstrong, B.K., 2012. Sunlight and vitamin D affect DNA damage, cell division and cell death in human lymphocytes: a cross-sectional study in South Australia. *Mutagenesis* 27, 609–614.
- Namba, A.M., da Silva, V.B., da Silva, C.H.T.P., 2008. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclét. Quím.* 33, 13–24.
- Naves, M.P.C., de Morais, C.R., Spanó, M.A., de Rezende, A.A.A., 2019. Mutagenicity and recombinogenicity evaluation of bupropion hydrochloride and trazodone hydrochloride in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 131, 110557.
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. Gene: genes identified as putative homologs of one another during the construction of HomoloGene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=cyp24a1>. (Accessed 26 March 2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/37906>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/38092>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2768677>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/?term=Drosophila+melanogaster+p38b>.
- Nepomuceno, J.C., 2015. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents thought the test for detection of epithelial tumor clones (warts). *Adv. Tech. Biol. Med.* 3, 2–8.
- Nishiyama, Y., Hirota, T., Morisaki, T., Hara, T., Marumoto, T., Iada, S., Makino, K., Yamamoto, H., Hiraoka, T., Kitamura, N., Saya, H., 1999. A human homolog *Drosophila* warts suppressor, *h-warts*, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. *FEBS Lett.* 459, 159–165.
- Oliveira, V.C., Constante, S.A.R., Orsolin, P.C., Nepomuceno, J.C., de Rezende, A.A.A., Spanó, M.A., 2017. Modulatory effects of metformin on mutagenicity and epithelial tumor incidence in doxorubicin-treated *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 106, 283–291.
- Oliveira, V.C., Naves, M.P.C., de Morais, C.R., Constante, S.A.R., Orsolin, P.C., Alves, B. S., Rinaldi Neto, F., da Silva, L.H.D., de Oliveira, L.T.S., Ferreira, N.H., Esperandim, T.R., Cunha, W.R., Tavares, D.C., Spanó, M.A., 2020. Betulinic acid modulates urethane-induced genotoxicity and mutagenicity in mice and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 138, 111228.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2012. Assessment of the mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2598–2604.
- Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., 2016. Modulating effect of simvastatin on the DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 90, 10–17.
- Owens, D.J., Tang, J.C.Y., Bradley, W.J., Sparks, A.S., Fraser, W.D., Morton, J.P., Close, G.L., 2017. Efficacy of high-dose vitamin D supplements for elite athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 49, 349–356.
- Pandey, U.B., Nichols, C.D., 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, 411–436.
- Pawlowska, E., Wysokinski, D., Blasiak, J., 2016. Nucleotide excision repair and vitamin D - Relevance for skin cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 372.
- Perazzo, M.de F., da Costa Neta, M.C., Cavalcanti, Y.W., Xavier, A.F.C., Cavalcanti, A.L., 2012. Efeito antimicrobiano do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* sobre bactérias formadoras do biofilme dentário. *Rev. Bras. Ciências Saúde* 16, 553–558.
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V., 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7, 95–99.
- Ramji, S., Lee, C., Inaba, T., Patterson, A.V., Riddick, D.S., 2003. Human NADPH-cytochrome P450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of doxorubicin in human breast cancer cell lines. *Canc. Res.* 63, 6914–6919.
- Sakaki, T., Yasuda, K., Kittaka, A., Yamamoto, K., Chen, T.C., 2014. CYP24A1 as a potential target for cancer therapy. *Anti-Canc. Agent. Me.* 14, 97–108.
- Saul, L., Mair, I., Ivens, A., Brown, P., Samuel, K., Campbell, J.D.M., Soong, D.Y., Kamenjarin, N., Mellanby, R.J., 2019. 1,25-dihydroxyvitamin D3 restrains CD4<sup>+</sup> T cell priming ability of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells by upregulating expression of CD31. *Front. Immunol.* 10, 1–13.
- Shaker, O.G., Senousy, M.A., 2019. Association of SNP-SNP interactions between *RANKL*, *OPG*, *CH3L1* and *VDR* genes with breast cancer risk in Egyptian women. *Clin. Breast Canc.* 19, 220–238.
- Shen, M.Y., Sali, A., 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 15, 2507–2524.
- Silva-Oliveira, R.G., Orsolin, P.C., Nepomuceno, J.C., 2016. Modulating effect of losartan potassium on the mutagenicity and recombinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 95, 211–218.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würzler, F.E., Graf, U., 2001. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16, 385–394.
- Tagliaferri, S., Porri, D., De Giuseppe, R., Manuelli, M., 2019. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutr. Res. Rev.* 32, 99–105.
- Takeiri, A., Tanaka, K., Shioda, A., Harada, A., Yano, M., Kawase, A., Yamaguchi, K., Mitsui, T., Mishima, M., 2012. Lack of mutagenicity of SMD-502, a new vitamin D3 analog for topical application, in skin and liver of *gpt* delta transgenic mice and in GDLI cells. *Gene Environ.* 34, 107–114.
- Tsao, C.K., Ku, H.Y., Lee, Y.M., Huang, Y.F., Sun, Y.H., 2016. Long term *ex vivo* culture and live imaging of *Drosophila* larval imaginal discs. *PLoS One* 11, e0163744.
- Valadares, B.L.B., Graf, U., Spanó, M.A., 2008. Inhibitory effect of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1103–1110.
- Vasconcelos, M.A., Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C., Spanó, M.A., 2017. Assessment of the carcinogenic potential of high intense sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 101, 1–7.
- Wang, E.W., Collins, A.R., Pang, M.Y.C., Siu, P.P.M., Lai, C.K.Y., Woo, J., Benzie, I.F.F., 2016. Vitamin D and oxidation-induced DNA damage: is there a connection? *Mutagenesis* 31, 655–659.
- Wang, L.S., Wang, Y.R., Ye, D.W., Liu, Q.Q., 2020. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int. J. Antimicrob. Agents* 105948.
- Webb, B., Sali, A., 2017. Comparative protein structure modeling using modeller. *Curr. Protoc. Bioinfo.* 54, 1–55.
- Wheeler, D.E., Nijhout, H.F., 2003. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *Bioessays* 25, 994–1001.
- Woo, D.K., Eide, M.J., 2010. Tanning beds, skin cancer, and vitamin D: an examination of the scientific evidence and public health implications. *Dermatol. Ther.* 23, 61–67.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., Yu, W., 1995. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 121, 1053–1063.
- Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., Evans, R.M., 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63–72.
- Zhang, L., Liu, Y., 2020. Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review. *J. Med. Virol.* 92, 479–490.
- Zoete, V., Cuendet, M.A., Grosdidier, A., Michielin, O., 2011. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* 32, 2359–2368.