

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LAUANDER SILVA CAMPOS

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA A AVALIAÇÃO DA**
ANTICARCINOGENICIDADE DO GCMAF

PATOS DE MINAS- MG
OUTUBRO DE 2021

LAUANDER SILVA CAMPOS

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA A AVALIAÇÃO DA
ANTICARCINOGENICIDADE DO GCMAF**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves
de Araújo**

**Co-orientadora: MSc. Paula Marynella
Alves Pereira Lima**

PATOS DE MINAS – MG

OUTUBRO DE 2021

LAUANDER SILVA CAMPOS

***Drosophila melanogaster* COMO MODELO PARA A AVALIAÇÃO DA
ANTICARCINOGENICIDADE DO GCMAF**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU (Presidente)

Profa. Dra. Priscila Capelari Orsolin – Unipam (Membro)

Profa. Dra. Nayane Moreira Machado – Unipam (Membro)

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

Thaise Gonçalves de Araújo

Patos de Minas – MG, 28 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

A utilização de nossas faculdades intelectuais pode ser entendida como estudo, que nada mais é do que o acumulo de informações que deverão ser empregadas com a intenção de confirmar o que se foi pensado com o que se é possível viver, e então teremos a experiência. A experiência retrata uma das características mais nobres do ser humano, a falha, o erro, a possibilidade de errar diante expectativas, planejamentos, trabalhos e sentimentos. A experiência pode ser compartilhada, assim como as informações, ela evidencia a falha ou o êxito daquilo que se foi pensado. Essa mistura de informações acumuladas, testadas, reaplicadas e o ganho de experiência junto ao tempo caracteriza o aprendizado. Percebe-se que o processo de aprender exige não apenas a aplicação do conhecimento, mas também da compreensão das experiências acumuladas e, principalmente, o compartilhamento delas.

Nesse contexto, sinto a necessidade de agradecer a algumas pessoas que foram fundamentais na elaboração deste trabalho, por compartilharem comigo de seus conhecimentos, experiências e aprendizados.

Em primeiro lugar, quero agradecer a “alguém” com muitos nomes e atribuições, que talvez pelas limitações das faculdades intelectuais humanas, não tenhamos real compreensão daquilo que denominamos de Deus, mas inequivocamente ao falarmos sobre ele falamos sobre amor, algo que sentimos e é mais próximo da nossa compreensão, portanto, obrigado pela vida com amor e amor pela vida.

A Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araujo, por sua paixão pela ciência, pelo carinho em acolher, amparar e orientar uma alma que busca novas informações, experiências e aprendizados científicos.

A Profa. Me. Paula Marynella Alves Pereira Lima, por me acolher, orientar e amparar na prática aquilo que precisei trabalhar.

A Dra. Clarissa Aires de Oliveira, pela nova vida que a mim me possibilitaste receber. Seus cuidados além da saúde física, alcançam e modulam a alma. Obrigado por acender em mim a curiosidade de compreender a nossa natureza biológica, por confiar e acreditar em mim.

Ao meu PAI, MÃE e IRMÃ, que se dedicaram a sustentar um propósito ressignificante, que incondicionalmente depositaram amor, confiança e esperança.

A minha esposa Bruna, que se manteve sempre ao meu lado em todas as circunstâncias, trabalhando juntos com propósitos alinhados. Por me reerguer em momentos complexos de um

jeito impetuoso, mas também com muito amor e carinho, me lembrando diariamente aquilo que um dia pretendo alcançar.

E por fim, mas a peça fundamental que me possibilitou acumular mais e melhores experiências e aprendizados, meu filho, Miguel. Nunca senti tanto o que podemos chamar de pertencimento, hoje pertencço a alguém, que espera de mim nada mais que o amor. Sou espelho para suas decisões e com isso percebo que nada daquilo que eu disser, ele irá fazer, mas tudo aquilo que eu fizer, ele verá como uma verdade, repetindo as minhas ações. Obrigado meu filho, por ser meu modelo inspirador, diante tantas adversidades que você vivência em tão pouco tempo e ainda se mantém com vigor e alegria, percebo que tenho muito a melhorar, para que juntos eu possa ser a ponte mais extensa de sua vida, te sustentando e amparando em seus propósitos de vida. Tua força e alegria me inspiram, seu amor me movimenta.

RESUMO

Os dados epidemiológicos relacionados ao câncer são alarmantes. Em 2018, foram diagnosticados, mundialmente, 18 milhões de novos casos, sendo que 52% destes pacientes vieram a óbito. No Brasil, os números são igualmente preocupantes, sendo esperados 627 mil novos diagnósticos para o triênio de 2020-2022. O principal tratamento sistêmico é a quimioterapia, capaz de conter, na maioria dos casos, a progressão da doença, contudo associada a efeitos colaterais debilitantes. Nesse cenário, a imunoterapia tem se mostrado promissora e revolucionária, ao estimular os próprios mecanismos de defesa na contenção de tumores. O fator de ativação de macrófagos derivado da proteína Gc (GcMAF) é assim classificado e capaz de inibir a imunossupressão mediada pelas células transformadas. No presente estudo avaliamos os efeitos moduladores do GcMAF em *Drosophila melanogaster* utilizando o teste de tumores epiteliais (ETT) para predizer sua anticarcinogenicidade em um modelo experimental que apresenta elevada homologia genética com mamíferos. GcMAF isolado nas concentrações (25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml), Vitamina D (VD-1mM), Doxorrubicina (DOX-0,4mM) e as combinações, GcMAF + VD, GcMAF + DOX, GcMAF + VD + DOX também não apresentaram toxicidade a *D. melanogaster*, sendo estas as condições avaliadas no ETT. GcMAF isolado não foi carcinogênico em nenhuma das concentrações avaliadas e nem quando associado a VD. As combinações GcMAF + DOX e GcMAF + DOX + VD apresentaram significativo efeito modulador sobre a carcinogenicidade da DOX, com redução na frequência de tumores quando comparado ao controle positivo (DOX – 0,4mM). Nosso estudo auxiliará na compreensão do papel do GcMAF no controle de tumores, permitindo melhor caracterizá-lo enquanto estratégia de tratamento oncológico.

Palavras-chave: GcMAF. *Drosophila melanogaster*. Carcinogênese. Imunoterapia.

ABSTRACT

*Cancer-related epidemiological data are alarming. In 2018, 18 million new cases were diagnosed worldwide, with 52% of these patients dying. In Brazil, the numbers are equally worrying, with 627,000 new diagnoses expected for the 2020-2022 triennium. The main systemic treatment is chemotherapy, capable of, in most cases, a progression of the disease, associated with effects associated with debilitating effects. In this scenario, immunotherapy has to define the promise and the revolutionary, by stimulating its own defense mechanisms in the containment of tumors. The Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) is thus evaluated and capable of inhibiting immunosuppression mediated by transformed cells. In the present study, we evaluated the modulatory effects of GcMAF in *Drosophila melanogaster* using the epithelial tumor test (ETT) to predict its anticarcinogenicity in an experimental model that has high genetic homology with mammals. GcMAF isolated in the configurations (25pg / ml, 50pg / ml and 100pg / ml), Vitamin D (VD-1mM), Doxorubicin (DOX-0.4mM) and as flats, GcMAF + VD, GcMAF + DOX, GcMAF + VD + DOX is also not a toxicity for *D. melanogaster*, these being the conditions evaluated in the ETT. Isolated GcMAF was not carcinogenic in any of the evaluated recommendations, nor when associated with VD. How to join GcMAF + DOX and GcMAF + DOX + VD dissipating modulatory effect on the carcinogenicity of DOX, with a reduction in the frequency of tumors when compared to the positive control (DOX - 0.4mM). Our study helps to understand the role of GcMAF in tumor control, allowing us to better characterize it as a cancer treatment strategy.*

Keywords: GcMAF. *Drosophila melanogaster*. Carcinogenesis. Immunotherapy.

SUMÁRIO

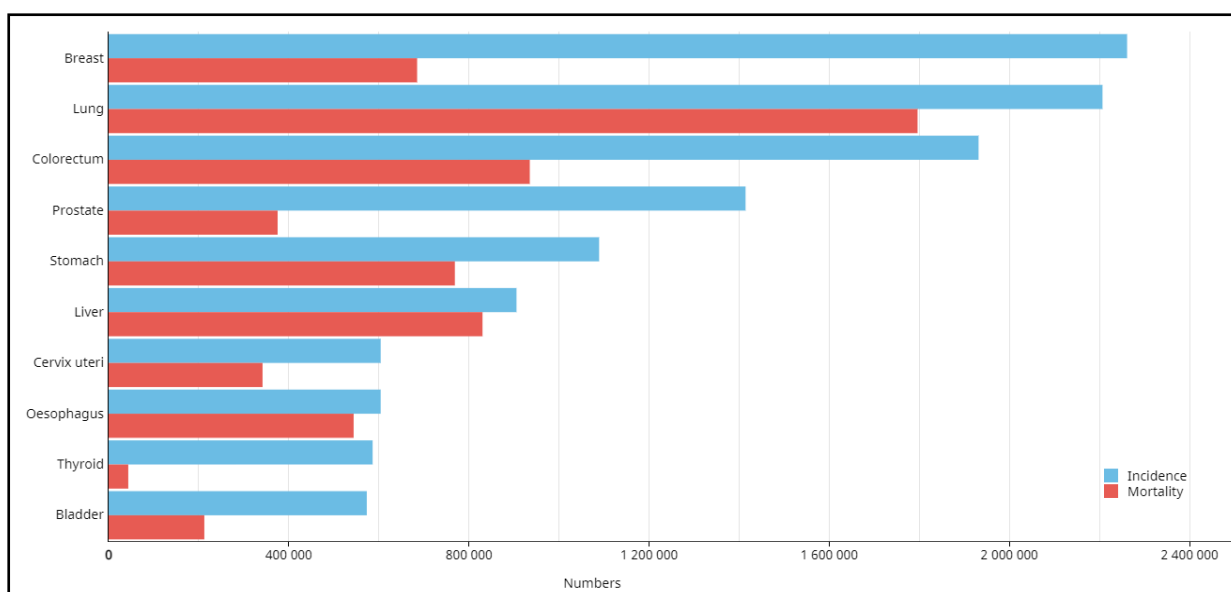
1. INTRODUÇÃO COM FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
1.1. Câncer e suas estratégias de tratamento	8
1.2. A revolução da imunoterapia	15
1.3. GcMAF	18
1.4. Vitamina D	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Manutenção das linhagens de <i>D. melanogaster</i>	24
3.2. Compostos químicos utilizados	24
3.3. Protocolo de tratamento	25
3.4. Teste de toxicidade em <i>D. melanogaster</i>	25
3.5. Teste de tumores epiteliais em <i>D. melanogaster</i>	26
3.6. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	32

1. INTRODUÇÃO COM FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Câncer e suas estratégias de tratamento

O câncer é um problema de saúde pública e, mundialmente, é a segunda maior causa de mortes, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares. A mais recente estimativa da *Global Cancer Observatory*, registrou, em 2020, mais de 19 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo. Os mais incidentes foram o de mama (11,7%), pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%) (Figura 1). No Brasil, de acordo com os dados do INCA (2020), são esperados 627 mil novos diagnósticos para o triênio de 2020-2022.

Figura 1. Número estimado de novos casos e mortes por tipos de câncer em todo o mundo, para ambos os sexos e todas as idades.

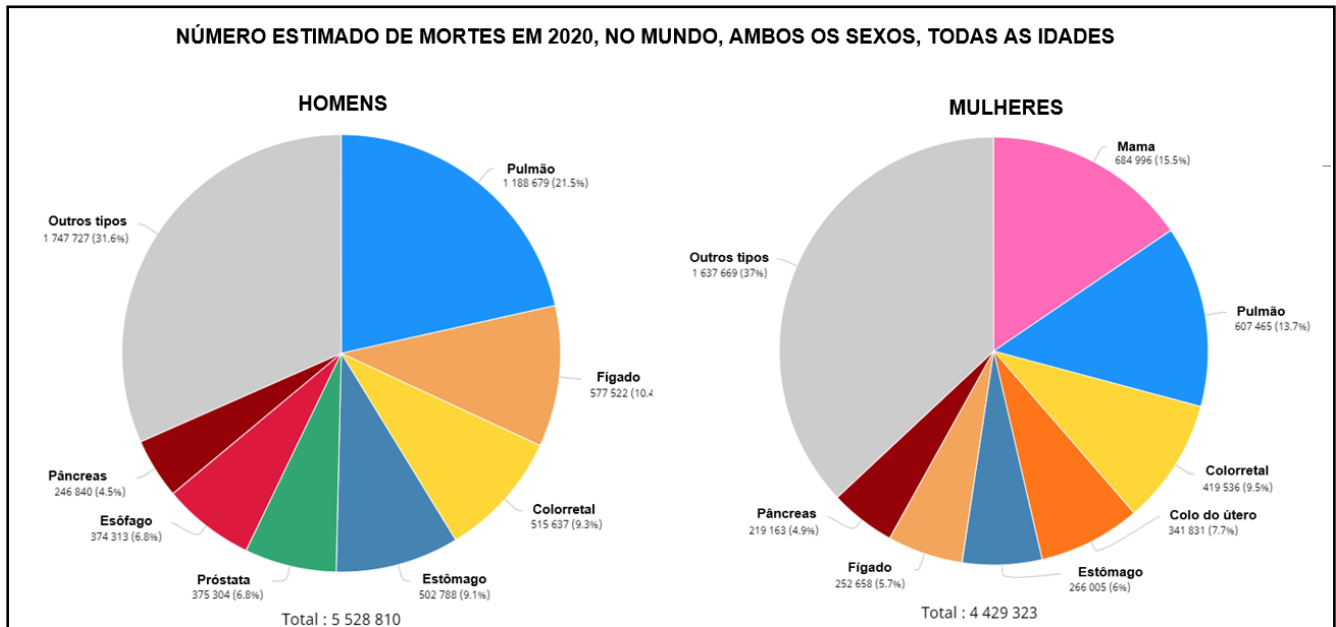


Fonte: FERLAY et al., 2020. Adaptado.

Globalmente, dos novos casos registrados, aproximadamente 51% vieram a óbito, sendo que destes 55% foram homens e 45% mulheres. Nos primeiros, o câncer de pulmão foi responsável por 21,5% das mortes, seguido pelo de fígado (10,4%), colorretal (9,3%), estômago (9,1%), próstata (6,8%), esôfago (6,8%) e pâncreas (4,5%). Já nas mulheres, o câncer de mama se destacou com 15,5% das mortes, seguido pelo de pulmão (13,7%), colo do útero (7,7%), estômago (6%), fígado (5,7%), pâncreas (4,9%) e outros tipos com 37% (FERLAY et al., 2020) (Figura 2). Dados epidemiológicos tão alarmantes evidenciam a necessidade de se desvendar

os mecanismos tumorigênicos e, sobretudo, de desenvolver métodos efetivos de diagnóstico e tratamento.

Figura 2. Número estimado de mortes em 2020, no mundo, em ambos os sexos e todas as idades.



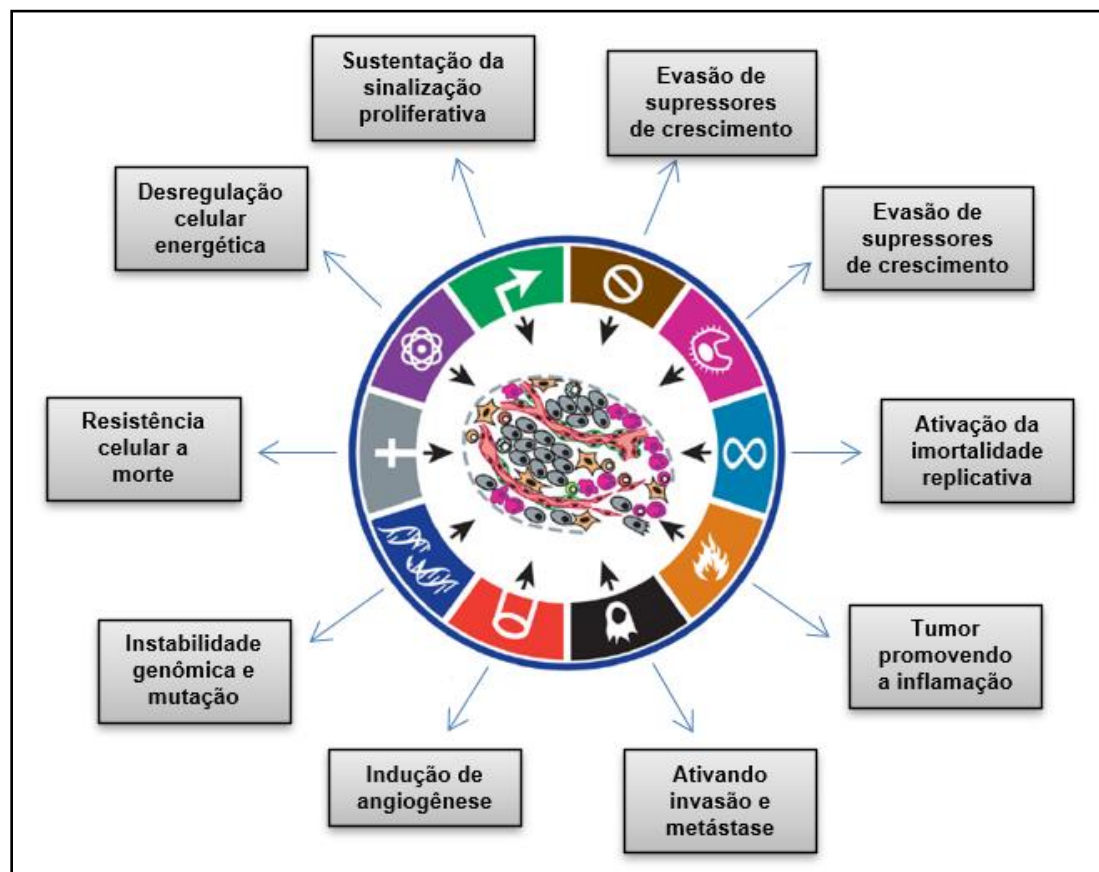
Fonte: FERLAY et al., 2020. Adaptado

O termo câncer engloba mais de 100 doenças. As malignas apresentam como característica comum o crescimento acelerado, desordenado e invasivo das células, as quais se espalham por todo o organismo. Esse evento é definido como metástase, a principal causa de óbito nos pacientes acometidos pela doença. Importante ressaltar que tumores benignos não possuem essa característica e, portanto, permanecem confinados em seu local de origem. O câncer pode ser classificado como carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, mieloma, tumor de células germinativas, melanoma, glioma e neuroblastoma, conforme o tecido em que se desenvolve o tumor primário (ALMEIDA et al., 2005).

A carcinogênese é relativamente lenta, compreendendo três etapas principais: iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, as células são submetidas a agentes carcinogênicos, os quais conduzem a mutações no DNA. Nesse estágio não é possível a identificação clínica do tumor, pois não são verificadas alterações fisiológicas ou morfológicas. A etapa de promoção acontece quando a célula tumoral “iniciada” é continuamente submetida a condições moleculares adversas, induzindo-a a um perfil maligno. Na progressão, células já transformadas proliferam-se descontroladamente. Essas etapas resultam, portanto, de diferentes mutações no DNA que, quando acumuladas, culminam no descontrole do ciclo celular, da replicação, da transcrição e da tradução (VINCENT; GATENBY, 2008).

Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram uma estrutura lógica para a compreensão do desenvolvimento neoplásico, apontando seis capacidades biológicas (*Hallmarks*) que essas células adquirem como auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade à inibição, evasão à morte celular programada, angiogênese sustentada, invasão tecidual e potencial replicativo ilimitado (HANAHAAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, ainda pelos mesmos pesquisadores, foram apontadas como características adicionais, a reprogramação do metabolismo energético, o escape imunológico e a inflamação, conforme o avanço das pesquisas na área (HANAHAAN; WEINBERG, 2011) (Figura 3).

Figura 3. Hallmarks do Câncer.



Fonte: HANAHAAN; WEINBERG, 2011. Adaptado.

De forma geral, os *Hallmarks* compartilham vias de sinalização que servem como gatilhos para a ocorrência de outras características e, portanto, encontram-se interconectados. De fato, a instabilidade genômica, considerada essencial para o desenvolvimento de tumores,

pode decorrer de erros no ciclo celular, como em suas proteínas regulatórias e em pontos de checagem.

Esse cenário conduz a um crescimento desordenado das células afetadas, o que recruta sinais adicionais para a sua sobrevivência, como os angiogênicos, de evasão ao sistema imunológico e de reprogramação metabólica, com o desequilíbrio na respiração aeróbica. A capacidade de crescimento e autorregulação da célula tumoral, um dos *Hallmarks* mais evidentes, encontra-se diretamente correlacionada à insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, à evasão à apoptose e à alteração do metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer é uma doença que acompanha a história humana. Relatos históricos mencionam sua primeira identificação como um caroço rígido que expelia fluidos, há 4.600 aC pelo médico egípcio Imhotep. Herodoto, um historiador grego, registrou a história de Atossa, uma rainha Persa que viveu em meados de 440 aC. Nela, foi descrito o primeiro tumor mamário, extirpado por Demasitis, como forma de tratamento. A partir do século XIX algumas técnicas cirúrgicas foram desenvolvidas com o intuito de não apenas remover o tumor, como também prevenir sua progressão (MUKHERJEE, 2011).

Dentre as estratégias terapêuticas, a cirurgia ainda é a mais empregada no tratamento de neoplasias. Estima-se que mais de 80% dos tumores, em algum estágio do seu desenvolvimento, serão submetidos a métodos cirúrgicos) com duas abordagens existentes, a curativa e a paliativa (SULLIVAN et al., 2015). Na grande maioria dos casos, a cirurgia é associada a um aumento da sobrevida, como no caso de câncer de esôfago (FERREIRA et al., 2021) e câncer de mama (THOMAS et al., 2016). Contudo, algumas complicações ainda são associadas a esta técnica, como a perda da função muscular pós-operatória em cirurgias de grande porte, com agravamento para aqueles pacientes com risco nutricional (SIERRA et al., 2020). Além disso, o trauma cirúrgico pode ser acompanhado de uma resposta inflamatória local e sistêmica, além de supressão do sistema imunológico, o que pode contribuir para a progressão tumoral residual (TOHME; SIMMONS; TSUNG, 2017). Na radioterapia, também definida como estratégia de tratamento local, há a emissão controlada de radiações ionizantes na região afetada pelo tumor visando a destruição das células transformadas (WONG; DELNEY; BARTON, 2016).

Sabe-se que hormônios contribuem para o processo da carcinogênese, o que evidencia a importância da hormonioterapia como uma abordagem sistêmica eficaz que conta com uma ampla diversidade farmacológica e com um perfil de toxicidade satisfatório (BURSTEIN et al., 2010). Segundo o *National Cancer Institute*, os principais cânceres sensíveis a hormônios são os de mama e os de próstata. Na terapia hormonal há a caracterização inicial do tumor quanto

à sua sensibilidade ao hormônio e a posterior escolha da melhor medicação a ser adotada. Podem ser utilizados agonistas do Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH), antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), inibidores da síntese hormonal e bloqueadores dos receptores (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Já na terapia celular há a administração autóloga ou alogênica de células específicas, modificadas ou não, visando restabelecer a funcionalidade de um órgão ou conjunto de células. O primeiro registro de terapia celular foi em 1956 por, Morre Donnal Thomas, que realizou o primeiro transplante de medula óssea (THOMAS et al., 1957). No câncer, pacientes com neoplasias hematológicas ou com funcionamento comprometido da medula óssea, como leucemia mieloide aguda, podem receber indicações de transplante de células tronco hematopoéticas. Ainda que essa estratégia apresente um resultado clínico significativo, existem complicações associadas e sua indicação é geralmente adotada quando a expectativa de sobrevida é maior em relação as outras abordagens padrão, como a quimioterapia (TAKAMI, 2018). Ainda, em casos de leucemia mieloide aguda de baixo risco, o transplante de células-tronco alogênicas mieloablativas apresenta um bom resultado, trazendo uma melhora significativa na sobrevida global e livre de recidiva, após primeira remissão completa da doença (KORETH et al., 2009).

Outra abordagem que vem ganhando notoriedade é a terapia-alvo. Nessa, proteínas e genes específicos de células tumorais são alvos de agentes químicos como anticorpos ou antagonistas. Portanto, a compreensão molecular dos tumores é fundamental. O receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) é um receptor tirosina quinase que, quando ativado, afeta mecanismos de crescimento, migração, proliferação, adesão e sobrevivência celulares. Este receptor é reconhecido como alvo terapêutico para câncer de mama HER2 positivo, uma vez que é superexpresso em 20 a 30% dos casos e associado a um pior prognóstico (MERIC-BERNSTAM; HUNG, 2006). Também é utilizado no tratamento de câncer gástrico, no qual também há relatos de sua amplificação em 13% a 23% dos pacientes (GRAVALOS; JIMENO, 2008). Neste cenário, Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal, humanizado, foi desenvolvido e já rotineiramente utilizado no tratamento desses tumores (VOGEL et al., 2002; BANG et al., 2010).

Os conceitos de terapia celular, terapia alvo e imunoterapia estão reunidos na inovadora terapia com utilização de células T modificadas com receptor de antígeno quimérico (CAR), também adotada na oncologia. Em 2014, um ensaio clínico demonstrou, pela primeira vez, o sucesso da terapia CAR T anti-CD19 para o tratamento de Linfoma difuso de células B refratário à quimioterapia (KOCHENDERFER et al., 2015). O procedimento, de forma geral,

consiste na manipulação, por engenharia genética, de linfócitos T, induzindo a expressão de receptores de antígenos de interesse, retomando a capacidade dessas células de defesa de reconhecer as células tumorais, eliminando-as. Após a ativação dos linfócitos T *in vitro*, essas células são, então, inseridas na circulação sanguínea do paciente, promovendo uma ação antitumoral. Contudo, é necessário um amplo estudo e caracterização de um antígeno alvo adequado, além do conhecimento acerca de sinais coestimuladores, do tráfego das células CART, da carga tumoral, do fenótipo das células T e das citocinas necessárias para o suporte da resposta desejada (HAJI-FATAHALIHA et al., 2016).

A terapia por ablação é empregada para tumores sólidos pequenos quando a abordagem cirúrgica não é recomendada. Consiste em um estímulo químico ou eletromagnético que conduz à morte celular. As técnicas mais empregadas são ablação por radiofrequência, ablação por micro-ondas e crioablação. Existem registros de que a terapia de ablação por radiofrequência em carcinoma hepatocelular precoce é uma abordagem efetiva no controle dessa lesão (KIKUCHI et al., 2014).

Em 1866, o cirurgião Carl D. E. Busch (1826 – 1881) fez um relato clínico de uma paciente de 43 anos com sarcoma avançado no rosto. Após a remoção do tumor, a paciente adoeceu com erisipela acompanhada de um estado febril. Posteriormente, foi possível observar a regressão do tumor. Este fato revelou a capacidade de altas temperaturas matarem seletivamente células tumorais. Nesse contexto, a hipertermia vem sendo empregada na oncologia e pode ser induzida por radiofrequência, agentes biológicos e químicos. É uma abordagem adotada como terapia adjuvante, combinada com gencitabina e cisplatina para pacientes com câncer pancreático avançado refratário, com resultados promissores (TSCHOEP-LECHNER et al., 2013).

É importante citar também a terapia fotodinâmica. Esta é uma técnica que utiliza radiações ultravioletas artificiais, capazes de induzir efeitos anti-inflamatórios, imunossupressão e inibição da atividade celular. Segundo a *American Cancer Society*, 2018, esse método pode induzir queimaduras na pele e, inclusive melanomas após exposição prolongada. Contudo, a descoberta de novos agentes fotoativos e novas fontes de luz trazem melhores perspectivas desse tratamento no controle do câncer. Atualmente, consiste na excitação de fotossensibilizadores pela luz, gerando radicais citotóxicos os quais conduzem à morte das células tumorais (SHI; SADLER, 2020).

A quimioterapia é o principal regime terapêutico sistêmico adotado. Rudolf Ludwig Carl Virchow foi o primeiro médico a observar um câncer em células sanguíneas, posteriormente localizado por Franz Ernst Christian Neumann na medula óssea. A dependência

de neoplasias líquidas à enzima diidrofolato redutase conduziu às primeiras intervenções quimioterápicas. Yellapragada Subbarow, um bioquímico indiano, desenvolveu a molécula “methotrexate” (MTX) para o tratamento de leucemia, bloqueando a enzima diidrofolato redutase, conduzindo a uma remissão temporária da doença (MUKHERJEE, 2011).

Existem diferentes tipos de quimioterápicos, os quais podem ser agrupados conforme seus mecanismos de ação. São definidos dois grandes grupos, os citotóxicos e os citostáticos. Os primeiros induzem danos celulares estruturais, promovendo a morte das células transformadas, já os últimos são caracterizados por induzirem efeitos celulares relacionados ao metabolismo, inviabilizando o crescimento e reprodução celulares. Para ambos os grupos é necessário conhecer e definir os limiares entre eficácia e toxicidade, as doses aceitáveis e a susceptibilidade dos tumores, além de compreender os mecanismos pelos quais a droga atinge o seu objetivo, ou seja, sua farmacodinâmica (GARCÍA et al., 2009).

A grande maioria das drogas alveja moléculas relacionados ao ciclo celular, cliva o DNA ou altera o metabolismo celular (XI et al., 2013). Alquilantes são capazes de adicionar grupos alquila em bases nitrogenadas, alterando a capacidade replicativa do DNA. Ciclofosfamida e temozolomida são alguns exemplos. Antimetabólitos inibem a divisão celular através do bloqueio competitivo de análogos estruturais do DNA. Os mais utilizados incluem os análogos a pirimidinas, como o 5-fluorouracil e citarabina, e os análogos de purina, como a fludarabina, cladribina e tioguanina. Antracíclicos bloqueiam a topoisomerase II, causando quebras no DNA e interferindo nos mecanismos de replicação e transcrição. Destacam-se Mitoxantrona, Idarrubicina e Doxorrubicina (DOX). A essa classe em específico são atribuídos efeitos colaterais não reversíveis ao miocárdio, portanto, com elevada cardiotoxicidade. Inibidores mitóticos, originalmente isolados de produtos naturais, estabilizam os microtúbulos, interrompem a divisão celular e induzem a apoptose, como Paclitaxel, Vinorelbina e Docetaxel. Os antibióticos antitumorais, dentre estes as antraciclinas, possuem múltiplos mecanismos de ação, como alteração da fluidez e transporte de íons através da membrana celular e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (CRUZ; DUARTE-RODRIGUES; CAMPELO, 2016).

Os agentes antineoplásicos administrados de forma sistêmica agem indiscriminadamente em todas as células do organismo, principalmente as de rápida proliferação. Contudo os efeitos colaterais associados a esses agentes citotóxicos são desastrosos, debilitando a saúde funcional do paciente e, em alguns casos, podendo até impossibilitar a continuidade do ciclo terapêutico, por agravamento do estado de saúde ou por desistência do paciente. No câncer de mama, por exemplo, existem relatos de perda na

densidade mineral óssea (CHRISTENSEN et al., 2016), náuseas, vômitos (SALIHAH; MAZLAN; LUA, 2016) e neutropenia febril (GOZZO et al., 2011). Há ainda casos de tumores resistentes à quimioterapia, o que dificulta o tratamento. Molecularmente há a alteração no padrão de expressão de diferentes genes e amplificação de outros como MCL1, JAK2, CDK6, CCND1, CCND2 e CCND3, além de deleções e ativação de mecanismos de efluxo de drogas (WEIN; LOI, 2017).

Com todas as dificuldades e adversidades demonstradas, novas estratégias são necessárias. Considerando a importância do sistema imunológico no combate de diferentes doenças e a evasão das células transformadas a esse intrincado mecanismo de defesa, modular o padrão de expressão de moléculas regulatórias relacionadas ao sistema imune tem se mostrado revolucionário. Em 1796, Edward Jenner foi o pioneiro ao utilizar uma vacina de varíola bovina para prevenir infecções subsequentes, abrindo caminho para as pesquisas na área. Em 1982, foi utilizado o primeiro anticorpo monoclonal para o tratamento de linfoma de células B e, entre 1986 e 2000 foi aprovado o uso de interleucina-2 (IL-2), interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β) e interferon gama (IFN- γ) para o tratamento de neoplasias, hepatites e esclerose múltipla (WALDMANN, 2003).

1.2. A revolução da imunoterapia

O sistema imunológico é crucial para a manutenção da homeostase, defendendo o organismo contra agentes químicos e biológicos. Uma interação complexa e extensa entre moléculas, células e órgãos especializados formam o nosso sistema imune. Células tronco hematopoiéticas originam todas as células sanguíneas e, principalmente, os leucócitos, conhecidos como efetores desse sistema (GUNSILIUS; GASTIL; PETZER, 2001). Os leucócitos podem ser divididos em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B, células *natural killer* (NK), entre outros. Na resposta imune também se encontram envolvidos moléculas de adesão, receptores e sinais extracelulares constituídos por citocinas e quimiocinas. Estas são produzidas e liberadas na circulação e modulam a resposta, recrutando células adicionais e regulando uma intrincada rede de comunicação autócrina, parácrina e endócrina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

A resposta imunológica é dividida, primariamente, em duas categorias, quais sejam a resposta de primeira linha ou então resposta imune inata e a resposta de segunda linha ou resposta imune adquirida. A resposta imunológica de primeira linha é composta por monócitos, macrófagos, neutrófilos, NKs, eosinófilos, basófilos e mastócitos e é caracterizada por

reconhecer padrões moleculares antigênicos conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), típicos de células tumorais (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Já a resposta imune adaptativa envolve linfócitos T (CD4 e CD8) e B e é associada à memória imunológica após uma primeira infecção. Na presença de um patógeno, macrófagos e células dendríticas são ativadas fagocitando o organismo, fragmentando-o e gerando pequenas moléculas que representam uma configuração estrutural do antígeno, conhecido como epítomos. Estes podem se ligar a imunoglobulinas correspondentes e a receptores celulares específicos sendo apresentados aos linfócitos T e B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Os linfócitos T (LT) apresentam diferentes subtipos. Os dois principais são os auxiliares e os citotóxicos. Ambos apresentam um receptor de célula T (TCR) e moléculas correceptoras, CD4 ou CD8. Antígenos apresentados por células apresentadoras de antígeno (APC), após fagocitose, interagem com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II e se ligam ao TCR de LT CD4. Estes são responsáveis por sinalizar para outras células da resposta imune, sendo também importantes na ativação dos LB, macrófagos ou mesmo LT CD8. Já a subpopulação de LT CD8 reconhece antígenos intracitoplasmáticos apresentados por APCs através da interação com moléculas MHC de classe I. Este subtipo está envolvido em respostas antivirais e antitumorais. Já os linfócitos B são responsáveis pela resposta humoral com a produção e liberação de imunoglobulinas, capazes de neutralizar ou até eliminar o antígeno-alvo. Esses linfócitos também funcionam como células apresentadoras de antígeno ao processarem o antígeno ligado ao receptor de superfície. Os peptídeos gerados são expressos na membrana celular ligados a moléculas MHC de classe II, com posterior interação com os LT CD4 (PARKIN; COHEN, 2001).

Na resposta antitumoral, alguns tipos celulares se destacam, como os macrófagos, uma vez que possuem uma significativa capacidade de infiltração no microambiente tumoral. Contudo, existem subconjuntos de macrófagos com atividades distintas e que se diferenciam quando submetidos a estímulos diferentes. Os macrófagos do tipo M1 são relacionados a uma ação pró-inflamatória, produzindo as citocinas IL-12, IL-23, IFN- γ , IL-18, TNF- α . Agem contra agentes microbianos e células tumorais. Já os macrófagos do tipo M2 são ativados por citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, atuando no reparo, manutenção, remodelagem tecidual e angiogênese. Acredita-se que tumores possuem a capacidade de reprogramação do fenótipo dos macrófagos infiltrados de M1 para M2, favorecendo a progressão tumoral. Receptores transmembranares denominados Receptores *Toll-like* (TLR's) são comuns em macrófagos, células dendríticas, subconjuntos de células T e B, assim como em células epiteliais e fibroblastos. Estes receptores

são sensíveis a ação de patógenos e, quando sensibilizados, ativam outros fatores, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) que, por sua vez, é um importante mediador na produção de citocinas inflamatórias (SRINIVASAN; RAVISHANKAR; MOORE, 2017). O quimioterápico Paclitaxel é capaz de ativar TLR4 e induzir macrófagos *naive* M0 para se diferenciarem no perfil M1 ou ainda reprogramar macrófagos M2 em M1 (WANDERLEY, 2018). Macrófagos também são ativados por um outro mecanismo envolvendo a Globulina Gc (Gc), também conhecida como Proteína Ligante de Vitamina D (DBP). Uma modificação em sua estrutura, decorrente do processo de deglicosilação, gera um fator ativador de macrófago (MAF), essencial à resposta imunológica (YAMAMOTO; HOMMA, 1991).

Contudo, tumores evadem ao sistema imune, ao modular seu sistema de checagem. De fato, as células imunes possuem um controle refinado de seu mecanismo efetor, prevenindo doenças autoimunes ou combatendo células tumorais. Estas, por exemplo, controlam a via PD-1 / PDL-1. PD-1 é uma glicoproteína transmembrana, denominada proteína de morte celular programada 1, altamente expressa em células T ativadas (KEIR et al., 2008). PDL-1 é seu ligante, estando aumentado no microambiente tumoral já que, quando se liga a PD-1, inibe a ativação de linfócitos T. Portanto, com essa estratégia, as células tumorais evadem ao sistema imunológico por silenciarem e induzirem apoptose em células T (JIANG et al., 2019). Outros mecanismos descritos incluem a perda de expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), falha em manter as glicoproteínas B7 coestimulatórias de linfócitos T e produção do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (BERZOFSKY; AHLERS; BELYAKOV, 2001; PARDOLL, 2002).

A α -Nacetylgalactosaminidase (α -NaGalase) também se encontra associada ao escape imunológico. É uma enzima expressa em dois compartimentos, um intracelular, lisossomal, vital para o bom funcionamento das células hepáticas, e outra extracelular, ainda pouco compreendida. Já foi relatado que α -NaGalase se acumula no soro de pacientes com câncer e é responsável pelo bloqueio de MAF, comprometendo a ativação dos macrófagos (YAMAMOTO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1997). Em um estudo bioquímico da α -NaGalase em duas linhagens de células tumorais humanas (HCT116 e HepG2) e uma não tumoral foi demonstrado que o lisado de células tumorais apresentou maior atividade de α -NaGalase, sugerindo seu papel na carcinogênese. Portanto, níveis séricos de α -NaGalase podem ser considerados um marcador tumoral (MOHAMAD et al., 2002) e a administração exógena do fator de ativação de macrófagos derivado da proteína Gc (GcMAF), uma possível estratégia de tratamento.

De fato, com o avanço do conhecimento científico, inúmeros esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de medicações capazes de modular o sistema imunológico de pacientes oncológicos, impedindo a evasão ao sistema imune por parte das células transformadas. Esses imunoterápicos têm apresentado resultados promissores, como os destinados, justamente, a bloquear o eixo PD1/PDL1. Têm sido utilizados no tratamento de câncer de pulmão não escamoso de células não pequenas e câncer de mama triplo-negativo, com significativo aumento da sobrevida global dos pacientes (BORGHAEI et al., 2015).

Portanto, imunoterápicos têm se apresentado como o futuro no tratamento de tumores. O mecanismo de ação de macrófagos também tem sido explorado. Essa é uma estratégia de tratamento de intervenção farmacológica direcional, com efeitos clínicos positivos associados a menor toxicidade e que, evidentemente, necessita ser amplamente estudada.

1.3. GcMAF

Macrófagos são reconhecidos pelo seu potencial de fagocitose e de secreção de diferentes moléculas que incluem citocinas, proteoglicanos, EROS, espécies reativas de nitrogênio e superóxidos, atuando no reparo tecidual até na morte celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). O processo de geração de EROS ocorre após a ativação da fagocitose e subsequente aumento da atividade do ciclo da hexose monofosfato produzindo nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). Os elétrons do NADPH reduzem o oxigênio molecular para o ânion superóxido através do citocromo de membrana cit b 558. Este intermediário pode sofrer atividade da enzima superóxido dismutase, convertendo-o em peróxido de hidrogênio, que, posteriormente, pode ser transformado em radical hidroxila. Essa resposta celular dos macrófagos é fundamental na resposta imune contra microrganismos e células tumorais (SILVEIRA, 2006).

Recentemente, a proteína Gc tem se destacado por afetar a suscetibilidade a endometriose (SAYEGH; FULEIHAN GEL; NASSAR, 2014), doença pulmonar obstrutiva crônica (WANG et al., 2015), osteoporose (FANG et al., 2009), autismo, lúpus sistêmicos (BRADSTREET et al., 2012) e a alguns tumores como melanoma (GRECO et al., 2009), carcinoma de células escamosas (REDDI et al., 2000) e câncer oral (YAMAMOTO et al., 1997). A proteína Gc é uma proteína sérica multifuncional e polimórfica, ou seja, com diferentes conformações estruturais determinadas por seus respectivos genótipos. Estruturalmente, contém três domínios, sendo que o domínio 1 N-terminal é a região de ligação a metabólitos da VD. Já o domínio 3 C-terminal corresponde a região de glicosilação, ou seja,

de ligação dos açúcares, galactose (Gal), N-acetylgalactosamine (GalNAc), sialic acid (AS), α -mannose (α -Man) (NAGASAWA et al., 2005). O gene que codifica para a proteína Gc se encontra no cromossomo 4 humano, posição 4q11-q13 e possui três alelos comuns (Gc * 2, Gc * 1F e Gc * 1S), com mais de 120 variações do sistema Gc nos seres humanos (CLEVE; CONSTANS, 1988). Dessas variações existe uma divisão com seis genótipos principais, dos quais três são homozigotos, Gc1F-1F, Gc1S-1S e Gc2-2, e três heterozigotos, Gc1F-1S, Gc2-1F e Gc2-1S. O fenótipo Gc humano é dividido em dois tipos, Gc1, que ainda pode ser subdividido em Gc1F e Gc1S, e o segundo tipo Gc2. A diferença reside em quatro aminoácidos como mostrado na Tabela 1 (BRAUN; BICHLMAIER; CLEVE, 1992). Estruturalmente, nos seres humanos, existem três principais frações de açúcar nas proteínas Gc. Em Gc1F há um trissacarídeo ramificado com N-acetilgalactosamina (GalNAc) ligado à Treonina (Thr) 418 ou 420, uma fração de galactose e um ácido siálico. Em Gc1S existe uma fração de N-acetilgalactosamina (GalNAc) ligado a Thr 418 ou 420, uma fração de galactose e uma fração de manose. Em Gc2, observa-se um padrão de glicosilação simples com um núcleo GalNAc ligado a Thr 418 e a uma porção de galactose terminal (YAMAMOTO, 1994). Contudo, já foi observado que em humanos a proteína Gc2 se encontra em mais de 90% na forma não glicosilada (YAMAMOTO; HOMMA, 1991).

Tabela 1. Genótipos e fenótipos da Proteína Gc. Também são apresentadas suas estruturas de carboidratos.

Alelo	Posição do aminoácido				Estrutura
	152	311	416	420	
Gc*1F	GAA	AGA	GAT	ACG	418 or 420 Gal-GalNAc SA
Gc*1S	GAA	AGA	GAG	ACG	
Gc*2	GGA	GAG	GAT	AAG	
Fenótipo	Posição do aminoácido				Estrutura
	152	311	416	420	
Gc1F	Glu	Arg	Asp	Thr	418 or 420 Gal-GalNAc SA
Gc1S	Glu	Arg	Glu	Thr	418 or 420 Gal-GalNAc α-Man
Gc2	Gly	Glu	Asp	Lys	418 Gal-GalNAc

Legenda: Gal: galactose; GalNAc: N-acetylgalactosamine; SA: ácido siálico; α -Man: α -mannose; Glu: Glutamato; Arg: Arginina; Asp: Aspartato; Thr: Treonina; Lys: Lisina; Gly: Glicina.

Fonte: NAGASAWA et al., 2005. Adaptado.

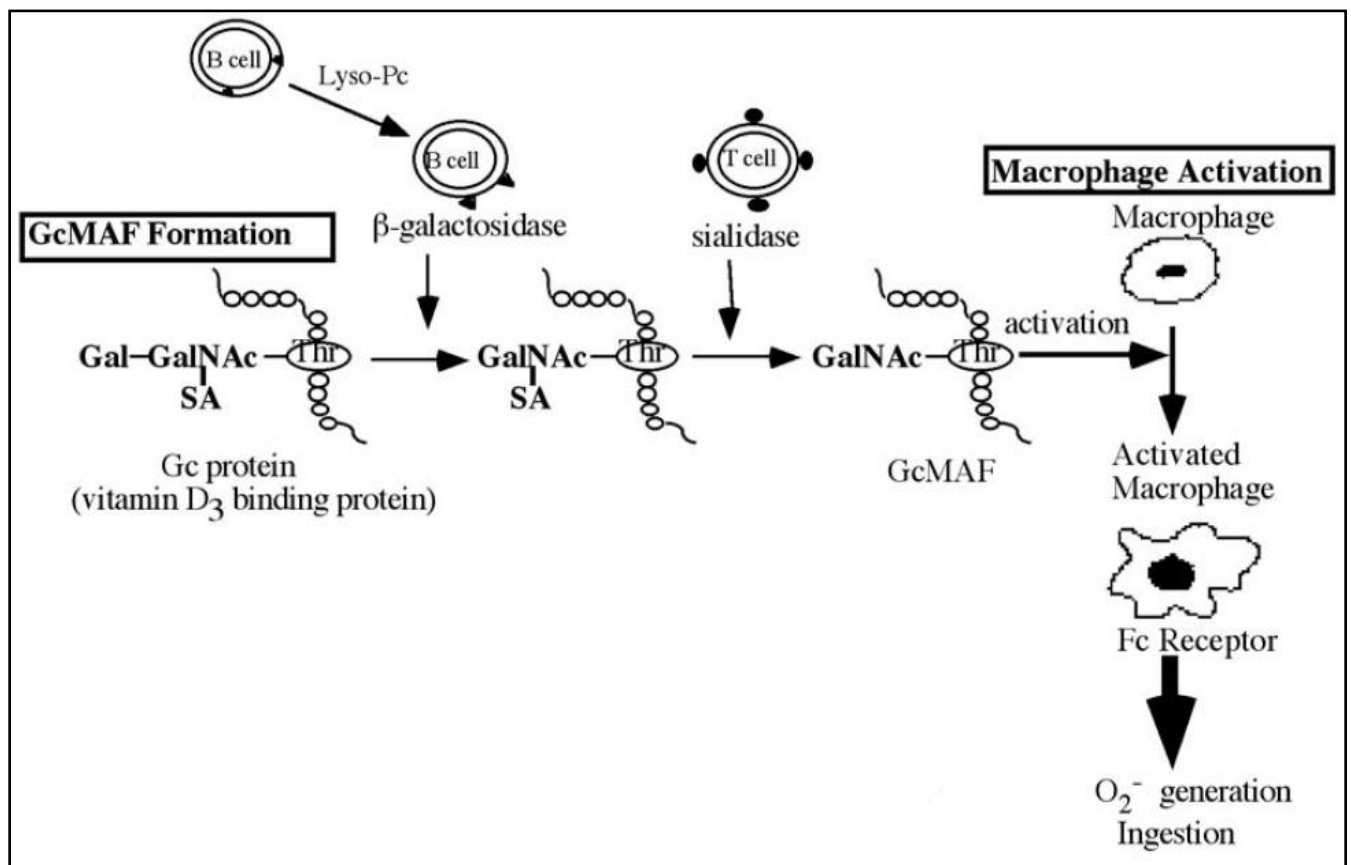
A proteína Gc é encontrada no plasma/soro em concentrações de 300-600 mg/L (KAWAKAMI et al., 1981). É sintetizada e secretada principalmente pelo fígado, sendo posteriormente convertida em GcMAF, o qual possui propriedades biológicas interessantes, como a capacidade de aumentar os níveis de superóxido nas células fagocíticas (YAMAMOTO; KUMASHIRO, 1993). O GcMAF também induz a translocação dos receptores de membrana FcγR1 e FcγR2 que se ligam a IgGs e estimulam a liberação de citocinas, intermediários metabólicos reativos, a secreção de enzimas lisossomais, além de regular a produção de anticorpos e fagocitose (ONO et al., 1995; DAËRON, 1997). Possui propriedades antiangiogênicas, efeitos adjuvantes, capacidade de ativar osteoclastos e de facilitar a quimiotaxia juntamente com o peptídeo derivado da citocina - C5. A glicoproteína C5 pertence ao sistema complemento e é importante no processo de defesa contra patógenos e células tumorais (ALEGRETTI et al., 2009).

O GcMAF também auxilia na eliminação de actina G circulante. Os filamentos de actina desempenham diversas funções como movimentação, sustentação estrutural, adesão e divisão celulares, além de contração muscular. Nesse contexto, a desorganização desses filamentos com a liberação de seus monômeros pode estar associada a um aumento da motilidade das células tumorais e a um aumento do potencial metastático. (EVERS et al., 2000; EITZEN, 2003). Em tumores já foi descrita a degradação de GcMAF pela ação de alfa-NaGalase. Portanto, o GcMAF surgiu como uma alternativa para o tratamento de pacientes com câncer, uma vez que modula o sistema imunológico ao ativar macrófagos. Já existem estudos com utilização do GcMAF em casos de esclerose múltipla (INUI et al., 2016), e câncer de mama (INUI et al., 2014), bloqueando a angiogênese e inibindo a progressão tumoral (KISKER et al., 2003).

A conversão de Gc em GcMAF foi proposta, inicialmente, por Yamamoto et al, o qual evidenciou o papel importante da inflamação, em especial da lisofosfatidilcolina (liso-PC), nesse processo (Figura 4). Yamamoto propôs que em Gc1F, GalNAc é covalentemente ligado ao resíduo Thr 418 ou 420. Já galactose e ácido siálico são ligados a GalNAc em um arranjo Y-ramificado. Logo, com a remoção sequencial de galactose e ácido siálico há a exposição do componente GalNAc, levando então à formação de GcMAF ativado (YAMAMOTO; KUMASHIRO, 1993). Portanto, com a inflamação iniciada, a beta-galactosidase presente na membrana de linfócitos B remove uma fração de galactose da proteína Gc. Em sequência, a enzima sialidase, ligada à membrana de linfócitos T, remove uma porção de ácido siálico. Ao final, uma porção de N-acetyl-galactosamine (GalNAC)-Thr 420 interage com uma proteína receptora na superfície macrófagos iniciando a formação do complexo entre a proteína Gc1F e o receptor, ativando os macrófagos (YAMAMOTO; HOMMA, 1991).

Contudo, recentemente, foi proposto um modelo diferente com base em estudos de espectrometria de massa, apontando uma nova estrutura linear dos açúcares ligantes em Thr 420 para as proteínas Gc1F e Gc1S. Também foi apontado que em Gc2 há uma substituição de um resíduo de lisina na posição correspondente a Thr 420, explicando a isoforma não glicosilada de Gc2 (RAVNSBORG et al., 2010). Em 2020, foi demonstrado que Gc2 sintetizado em células ExpiCHO-S foram capazes de ativar macrófagos por meio de um mecanismo que não envolve GalNAc, sugerindo que o sacarídeo GalNAc em Thr420 não é fundamental na ativação de macrófagos, ao menos *in vitro*. Contudo, não está claro o mecanismo de reconhecimento do receptor dos macrófagos sem o componente GalNAc em Thr420, em como o papel de cada uma dessas isoformas no controle de células malignas (NABESHIMA et al., 2020).

Figura 4. Formação do GcMAF a partir da proteína Gc.



Fonte: NAGASAWA et al., 2005. Adaptado.

O GcMAF tem se mostrado um promissor imunoterápico no tratamento de tumores. Contudo, ensaios clínicos e estudos biológicos anteriores apresentaram resultados controversos.

Portanto, ensaios dedicados à compreensão de seus efeitos antitumorais, assim como à compreensão de suas isoformas ainda são necessários.

1.4. Vitamina D

A Vitamina D (VD) é um pró-hormônio imunomodulador responsável por regular a síntese de diferentes interleucinas e a função de células imunes como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e linfócitos B (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). Além disso, controla o metabolismo do cálcio e fosfato, mantém a homeostase ósseo-mineral, regula a pressão arterial e interfere nos processos de multiplicação e diferenciação celulares (LI et al., 2004; CANTORNA; MAHON, 2005; DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007; PRIETL et al., 2013). Sua forma ativa, o calcitriol, se liga ao receptor de VD (VDR) no núcleo das células quando, então, reconhece elementos específicos no genoma responsivos a esse hormônio (VDREs ou VD/RXREs) ativando a transcrição de genes alvo (CARLBERG et al., 1993).

Em estudo prévio, o calcitriol apresentou efeitos antineoplásicos interessantes com a supressão do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a inibição fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) e a inibição da expressão da telomerase, Bcl-2 e Myc (DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007). Nesse contexto, a suplementação de VD é uma abordagem terapêutica interessante por inibir a proliferação celular, aumentar a expressão de marcadores de apoptose e modificar os parâmetros do metabolismo de glicose intracelular (KRISHNAN et al., 2010; YUAN et al., 2012; WAHLER et al., 2015; SHAN et al., 2017).

De fato, a VD é reconhecida por desempenhar funções importantes em nosso organismo. A 25-Hidroxivitamina D [25(OH)D], precursora da forma ativa da vitamina D, é comumente ligada à albumina e à proteína Gc, sendo que esta é predominante (YING et al., 2015). A VD, além de regular a proliferação, diferenciação, autofagia e atividade antioxidante, também modula a inflamação e o sistema imune (FELDMAN et al., 2014; GIAMMANCO et al., 2015). Estudos anteriores apontaram a expressão de VDR em LT, LB, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, coordenando suas atividades. A VD potencializa a ação de monócitos e macrófagos modulando a expressão de genes relacionados à defesa inata como catelicidina humana (CAMP) e β defensina-1 (DEFB1) (WANG et al., 2004; HEWISON, 2011). Nesse contexto acreditamos que a VD possa desempenhar funções regulatórias no GcMAF, uma vez que seu domínio de ligação a VD não é modificado após processamento.

1.4 *Drosophila melanogaster* como modelo experimental

O modelo experimental in vivo *Drosophila melanogaster* é um organismo eucarioto que possui 80% de homologia genética com mamíferos (GRAF; VAN SCHAIK, 1992; MIKLOS; RUBIN, 1996), o que o torna particularmente interessante para a avaliação de efeitos fenotípicos adversos causados por medicamentos. *D. melanogaster*, popularmente conhecida como a mosca da fruta, foi um dos organismos pioneiros para estudos genéticos, logo após a redescoberta de trabalhos de Mendel pelo Dr. T. H. Morgan em 1909 (GRAF; VAN SCHAIK, 1992; MIKLOS; RUBIN, 1996). Seu pequeno tamanho (3 a 4 mm), fácil diferenciação do macho da fêmea, baixo custo de manutenção em laboratório, ciclo de vida curto, número elevado de progênie e reduzido número de cromossomos oferecem resultados rápidos e confiáveis (GRAF; VAN SCHAIK, 1992). Além disso, é capaz de ativar enzimaticamente pró-mutágenos e pró-carcinógenos (NEPOMUCENO, 2015). Ensaio com *D. melanogaster* auxiliam na melhor compreensão da resposta terapêutica, oferecendo subsídios para o desenho de novas combinações farmacológicas, incluindo aquelas com compostos promissores como o GcMAF.

O teste de tumores epiteliais (ETT) realizado em *D. melanogaster* consiste na exposição de um único composto de interesse ou misturas complexas às larvas da mosca (ORSOLIN, 2011; NEPOMUCENO, 2015). O câncer desenvolve-se por meio de mutações sequenciais, especialmente relacionadas a ativação de oncogenes e inativação de supressores tumorais (ENOMOTO et al., 2018). O marcador *wts* corresponde a um gene supressor tumoral, que quando em homozigose é letal. Portanto, nos estoques de manutenção da linhagem é mantido moscas heterozigotas com o balanceador cromossômico *TM3, Sb1*. A perda da heterozigose do gene *wts* em células dos discos imaginais de *D. melanogaster* leva a formação de clones celulares com aspecto de verruga que se desenvolvem por todo corpo da mosca (JUSTICE et al., 1995). Dessa forma, já na fase adulta, o fenótipo é analisado nos indivíduos e a indução ou inibição de tumores é avaliada. Portanto, é uma metodologia simples e eficaz no estudo do potencial carcinogênico ou anticarcinogênico de diferentes moléculas.

O gene *LATS1* em humanos codifica uma serina/treonina quinase e é homólogo ao gene *wts* de *D. melanogaster*. Este gene se localiza no aparato mitótico e está envolvido no controle do ciclo celular. Dados bioquímicos e genéticos apontam sua função como supressor tumoral (YU; BACHMAN; LAI, 2015). Logo, estudos como o nosso contribuem para o desenvolvimento de terapias anticâncer.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

-Avaliar o potencial anticarcinogênico do GcMAF em *D. melanogaster*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial do GcMAF em não gerar tumores epiteliais em *D. melanogaster*;
- Avaliar os efeitos modulatórios do GcMAF associado a Doxorrubicina em reduzir tumores em *D. melanogaster*;
- Avaliar os efeitos modulatórios do GcMAF associado a Vitamina D e Doxorrubicina em *D. melanogaster*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Manutenção das linhagens de *D. melanogaster*

As linhagens mutantes de *D. melanogaster* foram mantidas e cultivadas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM em frascos de 250mL contendo meio de cultura adequado. Este foi preparado a partir do processamento e cozimento de uma solução contendo 820 mL de água, 25g de fermento biológico fresco (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de ágar, 156g de banana madura e 1g de metilparabeno. Os frascos com as linhagens permaneceram guardados em uma incubadora B.O.D à temperatura de 25°C, com umidade relativa de 67% e um fotoperíodo de 12 horas alternadas entre claro e escuro.

3.2. Compostos químicos utilizados

Quanto aos agentes químicos utilizados, o GcMAF foi produzido pela empresa SAISEI Mirai em conjunto com a Universidade de Tokushima no Japão, INUI-X, LOTE: 520118060. As concentrações utilizadas foram calculadas com base em testes prévios *in-vivo* em camundongos realizados por KOGA et al. (1999). A VD (CAS 67-97-0) foi fornecida pela

Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis (GO), Brazil, e utilizada na concentração de 1mM. A DOX (CAS 25316-40-9), comercialmente conhecida como Adriblastina® RD, foi produzida pela WYETH® indústria farmacêutica Ltda. Na concentração de 0,4mM, a DOX já foi utilizada como controle positivo em estudos prévios e apresenta-se como agente indutor de tumores em *D. melanogaster* (LIMA et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2020)

As larvas foram mantidas em tratamento crônico por 48 horas. Após cerca de 120 horas (término do desenvolvimento), as moscas que emergiram foram coletadas em frascos com álcool 70% e contadas em lupa estereoscópica. A partir do número de moscas sobreviventes foi construída uma curva de toxicidade para determinar as concentrações a serem utilizadas no teste ETT.

3.3. Protocolo de tratamento

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e em cada repetição foram utilizados 16 tubos de tratamento (um para cada concentração). Os tubos foram divididos em cinco grupos independentes, sendo:

- (I) 3 tubos, um para cada concentração, contendo GcMAF a 25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml;
- (II) 3 tubos, um para cada concentração, de GcMAF (25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml) associado a VD (1mM);
- (III) 3 tubos, um para cada concentração, de GcMAF (25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml) associado à DOX (0.4mM);
- (IV) 3 tubos, um para cada concentração, de GcMAF (25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml) associado a VD (1mM) e a DOX (0,4mM);
- (V) 4 tubos sendo, 1 tubo contendo apenas VD 1mM, 1 para o controle positivo (DOX – 0.4mM), 1 para o controle negativo (água de osmose reversa) e 1 para controle solvente (Etanol 5%).

3.4. Teste de toxicidade em *D. melanogaster*

Antes do ensaio de ETT foi conduzido um teste de toxicidade do GcMAF, VD e DOX a *D. melanogaster*. Para isto, foi realizado um cruzamento entre fêmeas virgens de genótipo

wts/TM3, *Sb1* e machos de genótipo *mwh/mwh*, resultando em larvas heterozigotas com genótipo *wts +/+ mwh*. As larvas foram coletadas, contadas em grupos de 50 indivíduos e mantidas em tubos de tratamento, contendo meio alternativo de cultura para *D. melanogaster*, purê de batatas, (SPANÓ et al., 2001) e as substâncias a serem testadas, seguindo o esquema de tratamento. Após a metamorfose, os indivíduos sobreviventes foram contados e foi construído a curva de sobrevivência, considerando apenas 1 repetição de cada tratamento para a análise estatística.

3.5. Teste de tumores epiteliais em *D. melanogaster*

O teste de tumores epiteliais em *D. melanogaster* (ETT), foi realizado conforme as recomendações de Costa, Oliveira e Nepomuceno (2012). Larvas heterozigotas *wts +/+ mwh*, obtidas do cruzamento entre fêmeas virgens de *wts/TM3*, *Sb1* e machos *mwh/mwh*, foram selecionadas para o ensaio. As larvas de terceiro estágio foram distribuídas em tubos contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batatas), acrescido de 5 mL de cada composto, seguindo o esquema de tratamento mencionados anteriormente. Após se alimentarem do meio teste por 48 horas e terem completado as etapas de desenvolvimento (+/- 120 horas), as moscas adultas foram coletadas e preservadas em etanol (C₂H₆O) 70% e analisadas em lupa estereoscópica.

Apenas as moscas adultas que não apresentaram o balanceador cromossômico (*TM3*, *Sb1*), portadoras do genótipo *wts+/+mhw*, e identificadas por possuírem pelos finos e longos, foram consideradas no estudo.

3.6. Análise estatística

As comparações estatísticas do teste de toxicidade foram realizadas usando o teste Qui-quadrado para proporções em amostras independentes ($p < 0,05$). A significância estatística para o ETT foi calculada de acordo com o teste U, não paramétrico, de Mann-Whitney. Foram comparadas as frequências de tumores observadas nos indivíduos tratados e nos controles positivo, negativo e solvente. Foi utilizado o software Prophet 5.0 e considerados significantes valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

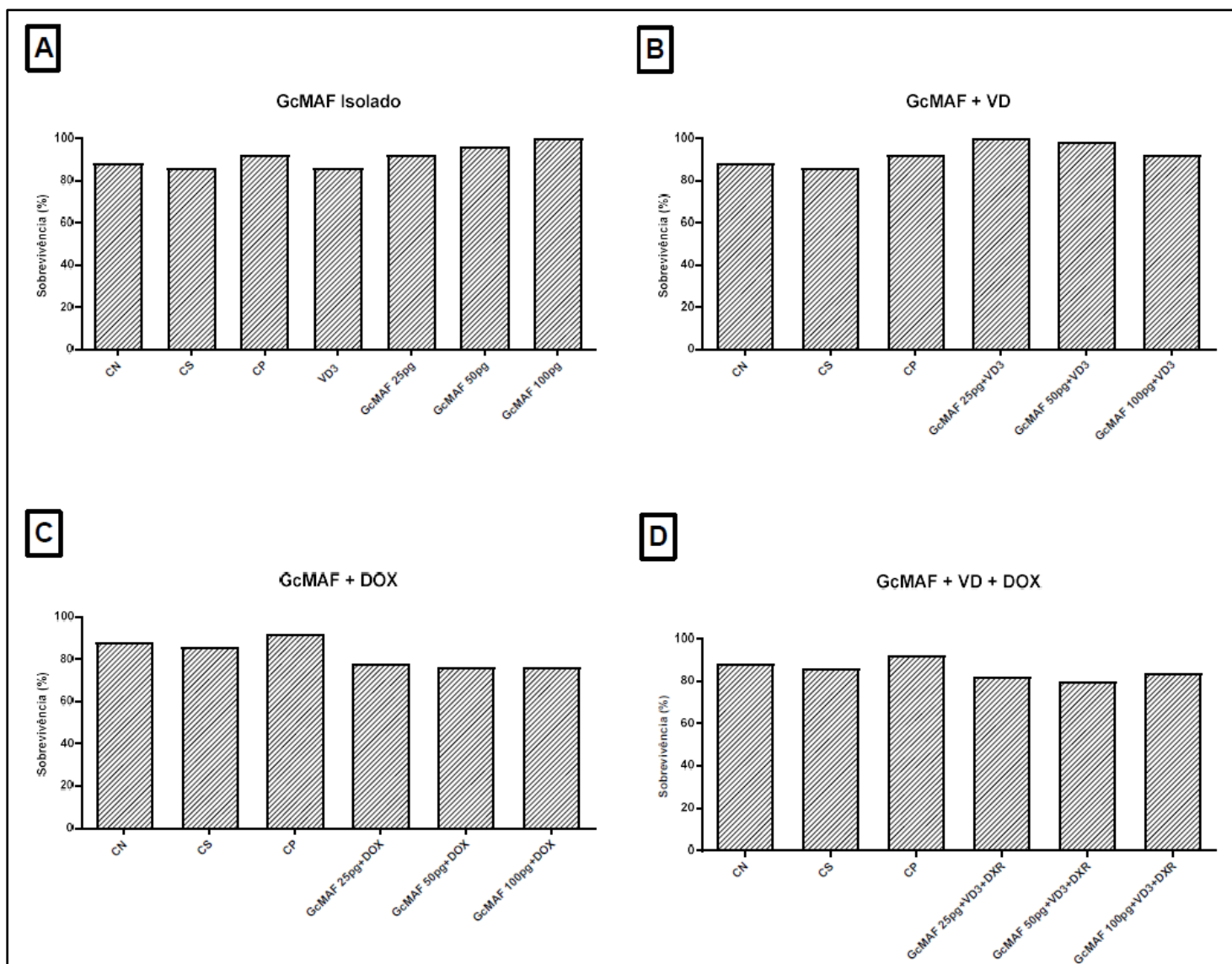
Métodos terapêuticos convencionais, especialmente a quimioterapia, são limitados, especialmente devido aos seus efeitos adversos, o que justifica a busca por novas formulações e estratégias terapêuticas. Nesse contexto, a imunomodulação tem ganhado notoriedade ao incluir componentes imunológicos, combinações farmacológicas e nanotecnologia, com elevada especificidade (RILEY et al., 2019). Identificado inicialmente em 1991 (YAMAMOTO; HOMMA; MILLMAN, 1991), o GcMAF tem se mostrado promissor e, desde então, diferentes estudos têm sido dedicados a compreender suas isoformas e os seus mecanismos de ativação de macrófagos. Aqui optamos pelo modelo experimental *D.melanogaster*, o qual já é empregado há mais de 50 anos, com biologia bem documentada incluindo alta homologia genética com humanos para avaliar sua carcinogenicidade (GRAF; VAN SCHAIK, 1992; MIKLOS; RUBIN, 1996). Nesse contexto, nosso estudo é pioneiro ao elucidar os efeitos do imunoterápico GcMAF em *D.melanogaster*.

O teste de toxicidade prévio ao ETT foi realizado para definir as concentrações subtóxicas dos compostos às moscas. A Figura 5 evidencia que nenhum tratamento interferiu na viabilidade dos indivíduos, com 75% de sobrevivência em cada condição testada, sem diferenças estatísticas. Não há relatos de concentrações tóxicas a humanos de GcMAF. Já para a VD efeitos danosos já foram descritos quando seus níveis séricos chegam a 150ng/mL (LIM; THADHANI, 2020). Em *D. melanogaster* já foi demonstrado que mesmo em concentrações de 100mM não houve diminuição da viabilidade das moscas (VASCONCELOS et al., 2020) o que justifica a concentração segura de VD utilizada no presente estudo.

Após a validação das concentrações subtóxicas, o teste ETT foi realizado objetivando avaliar a carcinogenicidade dos tratamentos. A Figura 6 sumariza a frequência total de tumores em todas as condições testadas. Como esperado, os controles, negativo (CN) e solvente (CS) apresentaram frequências de tumores significativamente baixas, (CN = 0,30), (CS = 0,33), ao passo que, no controle positivo (CP), tratado com DOX 0,4mM, os tumores foram evidentemente mais frequentes (CP = 4,43). A DOX possui um amplo histórico de utilização na oncologia clínica e seus mecanismos de ação incluem, principalmente, a intercalação com o DNA impossibilitando a replicação, a inibição da Topoisomerase II e a produção de EROS. Contudo, a utilização da DOX está limitada a seus efeitos tóxicos, em particular os cardiotoxicos (RIVANKAR, 2014). Em *D. melanogaster* a DOX é rotineiramente utilizada para a indução de tumores, como controle positivo, na concentração utilizada em nossos

experimentos (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015; VASCONCELOS et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2020; TEIXEIRA DA SILVA et al., 2021).

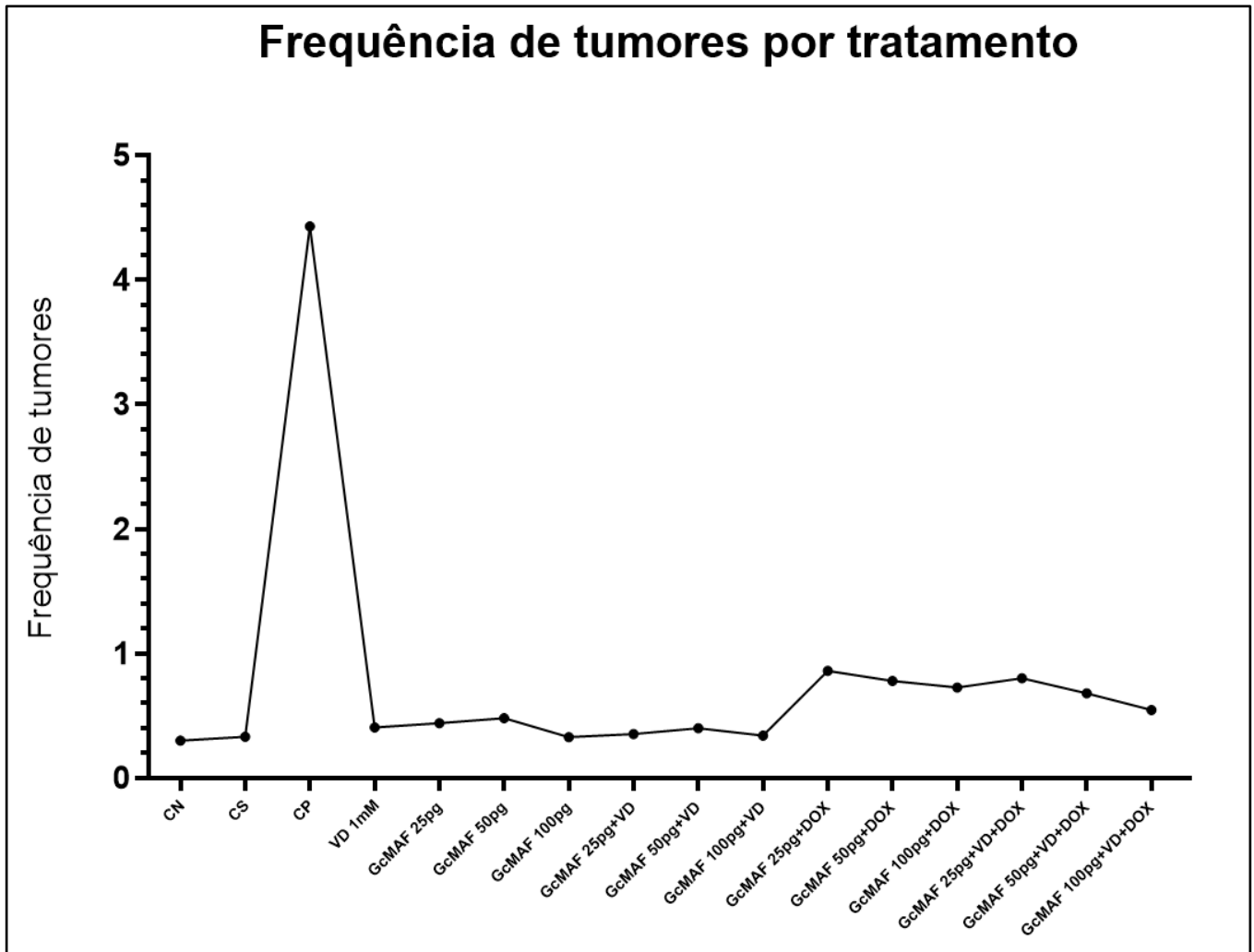
Figura 5. Percentual de sobrevivência de larvas de *D. melanogaster* expostas a diferentes compostos em diferentes concentrações. (A) GcMAF isolado nas concentrações de 25/50/100 pg/ml. (B) GcMAF nas concentrações de 25/50/100 pg/ml associado à VD (1mM). (C) GcMAF nas concentrações de 25/50/100 pg/ml associado à DOX (0,4mM). (D) GcMAF nas concentrações de 25/50/100 pg/ml associado à VD (1mM) e DOX (0,4mM). CN: Controle negativo (água de osmose reversa). CS: Controle solvente (etanol 5%). CP: Controle Positivo (DOX 0,4mM).



Para os tratamentos com o GcMAF isolado e associado à VD o número de tumores foi semelhante ao controle negativo, não sendo diferente estatisticamente, (GcMAF 25/50/100pg = 0,44/0,48/0,32; GcMAF 25/50/100pg + VD = 0,35/0,40/0,34). A inclusão da DOX desviou o

gráfico, com um nítido aumento no número de tumores (GcMAF 25/50/100pg + DOX = 0,86/0,78/0,73). Contudo, a adição de VD diminuiu essa frequência (GcMAF 25/50/100pg + DOX + VD = 0,80/0,68/0,55), sugerindo efeito modulador de GcMAF e de GcMAF + VD sobre os efeitos deletérios da DOX.

Figura 6. Frequência total de tumores por tratamento avaliadas por meio do Teste de Tumores Epiteliais em *Drosophila melanogaster* (ETT). CN: Controle negativo; CS: Controle solvente; CP: Controle positivo; VD: Vitamina D3.



A Tabela 2 apresenta a distribuição total de tumores analisados por segmento da mosca e suas respectivas frequências relativas. Também é descrito o percentual de inibição dos efeitos carcinogênicos da DOX pelo GcMAF, inclusive quando associado à VD. Como esperado, ao compararmos estatisticamente com o controle negativo, o GcMAF não apresentou potencial carcinogênico em nenhuma das concentrações testadas, tampouco quando as moscas foram co-tratadas com VD.

Tabela 2. Resumo dos resultados obtidos no Teste de Tumores Epiteliais em *D. melanogaster* (ETT) após o tratamento crônico das larvas com GcMAF isolado; GcMAF + VD; GcMAF + VD + DOX e os controles negativo (CN) solvente (CS) e positivo (CP). Número de tumores por segmento, frequência de tumores e percentual de inibição.

Tratamento	Número de moscas	Número de tumores analisados						Frequência de tumores	Inibição (%)
		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halter		
CN	150	0,00	0,04 (07)	0,02 (03)	0,21 (31)	0,02 (03)	0,01 (01)	45 (0,30)	
CS	150	0,00	0,05 (08)	0,02 (04)	0,22 (33)	0,02 (04)	0,01 (01)	50 (0,33)	
CP	150	0,13 (20)	0,50 (75)	1,29 (194)	1,60 (241)	0,80 (120)	0,10 (15)	665 (4,43) *	
VD 1mM	150	0,00	0,10 (15)	0,02 (04)	0,18 (28)	0,09 (14)	00	61 (0,41)	
GcMAF 25pg	150	00	0,05 (7)	0,05 (7)	0,29 (44)	0,05 (08)	00	66 (0,44)	
GcMAF 50pg	150	0,01 (1)	0,07 (11)	0,02 (3)	0,29 (43)	0,08 (12)	0,01 (2)	72 (0,48)	
GcMAF 100pg	150	0,01 (1)	0,07 (11)	0,09 (14)	0,13 (19)	0,03 (4)	00	49 (0,32)	
GcMAF 25pg + VD 1mM	150	00	0,05 (08)	0,01 (2)	0,27 (41)	0,01 (2)	00	53 (0,35)	
GcMAF 50pg + VD 1mM	150	0,01 (1)	0,09 (13)	0,03 (4)	0,24 (36)	0,04 (6)	00	60 (0,40)	
GcMAF 100pg + VD 1mM	150	00	0,04 (6)	0,02 (3)	0,23 (35)	0,04 (6)	0,01 (1)	51 (0,34)	
GcMAF 25pg + DOX 0,4mM	150	0,03 (5)	0,15 (23)	0,19 (29)	0,38 (57)	0,09 (14)	0,01 (1)	129 (0,86) **	80,6%
GcMAF 50pg + DOX 0,4mM	150	0,01 (1)	0,14 (21)	0,23 (35)	0,29 (44)	0,09 (14)	0,01 (2)	117 (0,78) **	82,4%
GcMAF 100pg + DOX 0,4mM	150	0,01 (2)	0,09 (13)	0,25 (38)	0,29 (43)	0,07 (11)	0,01 (2)	109 (0,73) **	83,6%
GcMAF 25pg + VD 1mM + DOX 0,4mM	150	0,01 (1)	0,09 (14)	0,19 (28)	0,36 (54)	0,13 (20)	0,02 (3)	120 (0,80) **	81,9%
GcMAF 50pg + VD 1mM + DOX 0,4mM	150	0,01 (2)	0,11 (17)	0,17 (25)	0,27 (40)	0,11 (16)	0,01 (2)	102 (0,68) **	84,7%
GcMAF 100pg + VD 1mM + DOX 0,4mM	150	00	0,11 (16)	0,09 (14)	0,25 (37)	0,09 (13)	0,01 (2)	82 (0,55) **	87,7%

Análise estatística de acordo com o teste de Mann-Whitney com significância $p \leq 0,05$. * Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$). ** Valores considerados significativos quando comparados ao controle positivo (DOX 0,4mM). Frequência: número de tumores / mosca. CN: Controle negativo; CS: Controle solvente; CP: Controle positivo; VD: Vitamina D3.

Seguindo a análise da Tabela 2, ao comparar estatisticamente com o controle positivo, o imunoterápico também apresentou efeitos moduladores, em todas as concentrações testadas nas condições em que houve exposição à DOX, inibindo os seus efeitos carcinogênicos em 80,6%, 82,4% e 83,6%, da menor concentração de GcMAF para a maior, respectivamente. Os tratamentos contendo GcMAF + VD + DOX também apresentaram diferenças significativas em relação ao CP, com inibição de 81,9%, 84,7% e 87,7%. Pode-se observar que a frequência de tumores do tratamento GcMAF + VD + DOX foi menor e com percentual de inibição maior quando comparada ao tratamento GcMAF + DOX, contudo, ao compararmos estatisticamente estes 2 últimos grupos, não houve diferenças significantes

Em uma revisão publicada em 2015, na *Seminars in Immunology* por Gold e Brückner (2015) foi demonstrado que o sistema imunológico de *D. melanogaster* é constituído, principalmente, por um sistema imune inato, com sistemas celulares de fagocitose. Uma resposta imune humoral também foi descrita, com a expressão de peptídeos antimicrobianos. Plasmócitos, durante todo o desenvolvimento da *D. melanogaster*, exceto a fase embrionária inicial, constituem em mais de 90% dos hemócitos. Os plasmócitos são considerados correspondentes dos macrófagos nos vertebrados, sendo fundamentais na resposta à infecção, dano tecidual e crescimento tumoral (GOLD; BRÜCKNER, 2015). Ao utilizarmos a DOX como controle positivo, esperávamos uma alta frequência de tumores. Os resultados confirmaram seu papel carcinogênico em células somáticas de *D. melanogaster*, com uma contagem média de aproximadamente quatro tumores por indivíduo. Notavelmente o sistema imune das moscas não foi capaz de contornar os efeitos deletérios da DOX. Nesse contexto, acreditamos que os efeitos do GcMAF quando associados à DOX aqui demonstrados, possivelmente podem ter sido regulados pela interação com os plasmócitos ativados por GcMAF, conduzindo-os à fagocitose de células danificadas. Estudos complementares podem elucidar os mecanismos de ligação das diferentes isoformas de GcMAF com os plasmócitos e suas diferentes subpopulações, trazendo novas perspectivas na identificação de receptores e vias associadas aos efeitos desse imunoterápico.

Em 2016, foi apresentado por Klokol e Teppone um relato de caso sobre o manejo de um Carcinoma Colorretal Metastático com GcMAF combinado com HNW-HA (ácido hialurônico de alto peso molecular) e peptídeos do timo, resultando em um controle da progressão tumoral por meio da ativação direta da fagocitose e estimulação da liberação de TNF- α , levando à necrose tumoral (KLOKOL; TEPPONE, 2016). Portanto, o GcMAF pode ser utilizado em estratégias terapêuticas multifacetadas em diferentes combinações farmacológicas para potencializar seus efeitos anticarcinogênicos. Alguns pesquisadores já relataram os efeitos

isolados da VD e associados à DOX em *D. melanogaster*. Segundo esses autores, a VD foi capaz de modular os efeitos da DOX (0,4mM) em até 79,3% quando o hormônio foi utilizado a 50mM (VASCONCELOS et al., 2020). No nosso estudo observou-se o ganho de inibição dos efeitos da DOX em 4,1% na maior concentração de GcMAF, quando administrado GcMAF+DOX. Quando a VD foi incluída observou-se também uma diminuição na frequência de tumores. Nesse contexto, acreditamos que, quando combinado à VD, o GcMAF adquira uma conformação otimizada com melhor ativação dos macrófagos ou plasmócitos, no caso do modelo utilizado nesse estudo. Isso pode explicar a diminuição da frequência de tumores no tratamento de GcMAF+VD+DOX quando comparado com GcMAF+DOX.

Portanto, a suplementação de VD é uma abordagem terapêutica interessante e a sua associação com outras medicações a torna ainda mais relevante. Sugerimos a necessidade de níveis séricos ideais de VD para a ação do GcMAF, o que sinaliza a necessidade de suplementação desse hormônio para as ações ideais do medicamento utilizado. Contudo, estudos adicionais são necessários para a comprovação de nossas hipóteses.

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que o GcMAF, nas concentrações testadas, não é tóxico e, tampouco carcinogênico, inclusive quando associado à VD em *D. melanogaster*. Os efeitos carcinogênicos induzidos por DOX foram inibidos pelo GcMAF, inclusive quando este foi associado à VD. Os mecanismos de modulação do GcMAF sobre os danos celulares provocados pela DOX devem ser mais bem elucidados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 6a ed, Saunders, 2007. ISBN 9781416031222.

ALEGRETTI, A. P.; MUCENIC, T.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 49, n. 3, p. 276-287, 2009.

ALMEIDA, V. L. d.; LEITÃO, A.; REINA, L. d. C. B.; MONTANARI, C. A. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

BANG, Y. J.; VAN CUTSEM, E.; FEYEREISLOVA, A.; CHUNG, H. C. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. **Lancet**, 376, n. 9742, p. 687-697, Aug 28 2010.

BERZOFISKY, J. A.; AHLERS, J. D.; BELYAKOV, I. M. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nat Rev Immunol**, 1, n. 3, p. 209-219, Dec 2001.

BORGHAEI, H.; PAZ-ARES, L.; HORN, L.; SPIGEL, D. R. et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. **N Engl J Med**, 373, n. 17, p. 1627-1639, Oct 22 2015.

BRADSTREET; JAMES JEFFREY, B.; EMAR, V.; LYNDIA, T. Initial Observations of Elevated Alpha-N-Acetylgalactosaminidase Activity Associated with Autism and Observed Reductions from GC Protein—Macrophage Activating Factor Injections. **Autism Insights**, 2012.

BRAUN, A.; BICHLMAIER, R.; CLEVE, H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. **Hum Genet**, 89, n. 4, p. 401-406, Jun 1992.

BURSTEIN, H. J.; GRIGGS, J. J.; PRESTRUD, A. A.; TEMIN, S. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. **J Oncol Pract**, 6, n. 5, p. 243-246, Sep 2010.

CANTORNA, M. T.; MAHON, B. D. D-hormone and the immune system. **J Rheumatol Suppl**, 76, p. 11-20, Sep 2005.

CARLBERG, C.; BENDIK, I.; WYSS, A.; MEIER, E. et al. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. **Nature**, 361, n. 6413, p. 657-660, Feb 18 1993.

CHRISTENSEN, C.; CRONIN-FENTON, D.; FRØSLEV, T.; HERMANN, A. P. et al. Change in bone mineral density during adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. **Support Care Cancer**, 24, n. 10, p. 4229-4236, Oct 2016.

CLEVE, H.; CONSTANS, J. The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. **Vox Sang**, 54, n. 4, p. 215-225, 1988.

COSTA, W. F., OLIVEIRA, A. B.; NEPOMUCENO, J. C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor gene wts. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 3236-3245, 2012.

CRUZ, M.; DUARTE-RODRIGUES, J.; CAMPELO, M. Cardiotoxicity in anthracycline therapy: Prevention strategies. **Rev Port Cardiol**, 35, n. 6, p. 359-371, Jun 2016.

DAËRON, M. Structural bases of Fc gamma R functions. **Int Rev Immunol**, 16, n. 1-2, p. 1-27, 1997.

DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, 7, n. 9, p. 684-700, Sep 2007.

EITZEN, G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. **Biochim Biophys Acta**, 1641, n. 2-3, p. 175-181, Aug 18 2003.

ENOMOTO, M.; SIOW, C.; IGAKI, T. *Drosophila* As a Cancer Model. **Adv Exp Med Biol**, 1076, p. 173-194, 2018.

EVERS, E. E.; ZONDAG, G. C.; MALLIRI, A.; PRICE, L. S. et al. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. **Eur J Cancer**, 36, n. 10, p. 1269-1274, Jun 2000.

FANG, Y.; VAN MEURS, J. B.; ARP, P.; VAN LEEUWEN, J. P. et al. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. **Calcif Tissue Int**, 85, n. 2, p. 85-93, Aug 2009.

FELDMAN, D.; KRISHNAN, A. V.; SWAMI, S.; GIOVANNUCCI, E. et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat Rev Cancer**, 14, n. 5, p. 342-357, May 2014.

FERLAY, J.; ERVIK, M.; LAM, F.; COLOMBET, M.; MERY, L.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN): Cancer Today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em 15 agosto 2021.

FERREIRA, R. P.; BUSSYGUIN, D. S.; TROMBETTA, H.; MELO, V. J. D. et al. Treatment of esophageal cancer: surgical outcomes of 335 cases operated in a single center. **Rev Col Bras Cir**, 48, p. e20202723, 2021.

GARCÍA, M. J.; GARCÍA-PALOMO, P. A.; GARCÍA, G. J. Quimioterapia antineoplásica. In: CORTÉS, F. H.; COLOMER, B. R. Principios del tratamiento oncológico. **Permanyer**, Barcelona, 2009, p. 219-259. ISBN 9788492620173.

GIAMMANCO, M.; DI MAJO, D.; LA GUARDIA, M.; AIELLO, S. et al. Vitamin D in cancer chemoprevention. **Pharm Biol**, 53, n. 10, p. 1399-1434, 2015.

GIL, Á.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Ann Nutr Metab**, 72, n. 2, p. 87-95, 2018.

GOLD, K. S.; BRÜCKNER, K. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. **Semin Immunol**, 27, n. 6, p. 357-368, Dec 2015.

GOZZO, T. d. O.; NASCIMENTO, T. G. d.; PANOBIANCO, M. S.; ALMEIDA, A. M. d. Ocorrência de neutropenia em mulheres com câncer de mama durante tratamento quimioterápico. **Acta Paulista de Enfermagem**, 24, n. 6, p. 810-814, 2011.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**, 271, n. 1, p. 59-67, Feb 1992.

GRAVALOS, C.; JIMENO, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. **Ann Oncol**, 19, n. 9, p. 1523-1529, Sep 2008.

GRECO, M.; MITRI, M. D.; CHIRIACÒ, F.; LEO, G. et al. Serum proteomic profile of cutaneous malignant melanoma and relation to cancer progression: association to tumor derived alpha-N-acetylgalactosaminidase activity. **Cancer Lett**, 283, n. 2, p. 222-229, Oct 8 2009.

GUNSILIUS, E.; GASTL, G.; PETZER, A. L. Hematopoietic stem cells. **Biomed Pharmacother**, 55, n. 4, p. 186-194, May 2001.

HAJI-FATAHALIHA, M.; HOSSEINI, M.; AKBARIAN, A.; SADREDDINI, S. et al. CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, 44, n. 6, p. 1339-1349, Sep 2016.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HEWISON, M. Vitamin D and innate and adaptive immunity. **Vitam Horm**, 86, p. 23-62, 2011.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. – Rio de Janeiro, 2020.

INUI, T.; MAKITA, K.; MIURA, H.; MATSUDA, A. et al. Case report: A breast cancer patient treated with GcMAF, sonodynamic therapy and hormone therapy. **Anticancer Res**, 34, n. 8, p. 4589-4593, Aug 2014.

JIANG, Y.; CHEN, M.; NIE, H.; YUAN, Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. **Hum Vaccin Immunother**, 15, n. 5, p. 1111-1122, 2019.

JUSTICE, R. W.; ZILIAN, O.; WOODS, D. F.; NOLL, M. et al. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes Dev**, 9, n. 5, p. 534-546, Mar 1 1995.

KAWAKAMI, M.; BLUM, C. B.; RAMAKRISHNAN, R.; DELL, R. B. et al. Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and its metabolites in normal human subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, 53, n. 6, p. 1110-1116, Dec 1981.

KEIR, M. E.; BUTTE, M. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, 26, p. 677-704, 2008.

KIKUCHI, L.; MENEZES, M.; CHAGAS, A. L.; TANI, C. M. et al. Percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma: risk factors for survival. **World J Gastroenterol**, 20, n. 6, p. 1585-1593, Feb 14 2014.

KISKER, O.; ONIZUKA, S.; BECKER, C. M.; FANNON, M. et al. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. **Neoplasia**, 5, n. 1, p. 32-40, Jan-Feb 2003.

KLOKOL, D.; TEPPONE, M. Management of Metastatic Colorectal Carcinoma with GcMAF Forte and Thymus Peptides: A Case Report. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, 7, n. 4, 2016.

KOCHENDERFER, J. N.; DUDLEY, M. E.; KASSIM, S. H.; SOMERVILLE, R. P. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. **J Clin Oncol**, 33, n. 6, p. 540-549, Feb 20 2015.

KORETH, J.; SCHLENK, R.; KOPECKY, K. J.; HONDA, S. et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. **Jama**, 301, n. 22, p. 2349-2361, Jun 10 2009.

KRISHNAN, A. V.; SWAMI, S.; PENG, L.; WANG, J. et al. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. **Endocrinology**, 151, n. 1, p. 32-42, Jan 2010.

LI, Y. C.; QIAO, G.; USKOKOVIC, M.; XIANG, W. et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 89-90, n. 1-5, p. 387-392, May 2004.

LIM, K.; THADHANI, R. Vitamin D Toxicity. **J Bras Nefrol**, 42, n. 2, p. 238-244, Apr 3 2020.

LIMA, P. M. A. P. et al. Effects of a carbonated soft drink on epithelial tumor incidence in *Drosophila melanogaster*. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 6, p. 240-247, 2018.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, 388, n. 6640, p. 394-397, Jul 24 1997.

MERIC-BERNSTAM, F.; HUNG, M. C. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, 12, n. 21, p. 6326-6330, Nov 1 2006.

MIKLOS, G. L.; RUBIN, G. M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. **Cell**, 86, n. 4, p. 521-529, Aug 23 1996.

MOHAMAD, S. B.; NAGASAWA, H.; UTO, Y.; HORI, H. Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 132, n. 1, p. 1-8, May 2002.

MUKHERJEE, S. The emperor of all maladies: A biography of cancer. New York: **Scribner**, 2011. 608 p. ISBN 1439170916.

NABESHIMA, Y.; ABE, C.; KAWAUCHI, T.; HIROI, T. et al. Simple method for large-scale production of macrophage activating factor GcMAF. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 19122, Nov 5 2020.

NAGASAWA, H.; UTO, Y.; SASAKI, H.; OKAMURA, N. et al. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. **Anticancer Res**, 25, n. 6a, p. 3689-3695, Nov-Dec 2005.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, Hormone Therapy for Breast Cancer. 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet>>. Acesso em 02 setembro 2021.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, 03, n. 03, 2015.

ONO, T.; ICHIKAWA, H.; ASAMI, R.; YAMAMOTO, I. Enzymatically modified GC globulin induces the translocation of FcγRI and FcγRII from intracellular storage compartments to the cell surface in murine peritoneal macrophage. **Jpn J Inflammation**, 15, p. 293-299, 1995.

ORSOLIN, P. C. **Avaliação do potencial mutagênico, recombinagênico e carcinogênico do orlistat em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal De Uberlândia, 2011.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem Toxicol**, 81, p. 111-119, Jul 2015.

PARDOLL, D. M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 4, p. 227-238, Apr 2002.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PRIETL, B.; TREIBER, G.; PIEBER, T. R.; AMREIN, K. Vitamin D and immune function. **Nutrients**, 5, n. 7, p. 2502-2521, Jul 5 2013.

RAVNSBORG, T.; OLSEN, D. T.; THYSEN, A. H.; CHRISTIANSEN, M. et al. The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor. **Biochim Biophys Acta**, 1804, n. 4, p. 909-917, Apr 2010.

REDDI, A. L.; SANKARANARAYANAN, K.; ARULRAJ, H. S.; DEVARAJ, N. et al. Serum alpha-N-acetylgalactosaminidase is associated with diagnosis/prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Cancer Lett**, 158, n. 1, p. 61-64, Sep 29 2000.

RILEY, R. S.; JUNE, C. H.; LANGER, R.; MITCHELL, M. J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nat Rev Drug Discov**, 18, n. 3, p. 175-196, Mar 2019.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **J Cancer Res Ther**, 10, n. 4, p. 853-858, Oct-Dec 2014.

SALIHAN, N.; MAZLAN, N.; LUA, P. L. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: exploring patients' subjective experience. **J Multidiscip Healthc**, 9, p. 145-151, 2016.

SAYEGH, L.; FULEIHAN GEL, H.; NASSAR, A. H. Vitamin D in endometriosis: a causative or confounding factor? **Metabolism**, 63, n. 1, p. 32-41, Jan 2014.

SHAN, N. L.; WAHLER, J.; LEE, H. J.; BAK, M. J. et al. Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 173, p. 122-129, Oct 2017.

SHI, H.; SADLER, P. J. How promising is phototherapy for cancer? **Br J Cancer**, 123, n. 6, p. 871-873, Sep 2020.

SIERRA, J. C.; DOCK-NASCIMENTO, D. B.; BEHNE, T. E. G.; THÉ, M. B. S. et al. Major oncological surgery reduces muscular function in patients with or without nutritional risk. **Rev Col Bras Cir**, 47, p. e20202470, 2020.

SILVEIRA, E. M. SANTOS DA. **O exercício físico aeróbio agudo (natação) estimula a funcionalidade imunológica e inflamatória de monócitos circulantes em ratos**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas: Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SRINIVASAN, S.; SU, M.; RAVISHANKAR, S.; MOORE, J. et al. TLR-exosomes exhibit distinct kinetics and effector function. **Sci Rep**, 7, p. 41623, Mar 14 2017.

SULLIVAN, R.; ALATISE, O. I.; ANDERSON, B. O.; AUDISIO, R. et al. Global cancer surgery: delivering safe, affordable, and timely cancer surgery. **Lancet Oncol**, 16, n. 11, p. 1193-1224, Sep 2015.

TAKAMI, A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**, 107, n. 5, p. 513-518, May 2018.

TEIXEIRA DA SILVA, T.; BRAGA MARTINS, J.; DO SOCORRO DE BRITO LOPES, M.; DE ALMEIDA, P. M. et al. Modulating effect of DL-kavain on the mutagenicity and carcinogenicity induced by doxorubicin in *Drosophila melanogaster*. **J Toxicol Environ Health A**, 84, n. 19, p. 769-782, Oct 2 2021.

THOMAS, A.; KHAN, S. A.; CHRISCHILLES, E. A.; SCHROEDER, M. C. Initial Surgery and Survival in Stage IV Breast Cancer in the United States, 1988-2011. **JAMA Surg**, 151, n. 5, p. 424-431, May 1 2016.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L., Jr.; LU, W. C.; FERREBEE, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N Engl J Med**, 257, n. 11, p. 491-496, Sep 12 1957.

TOHME, S.; SIMMONS, R. L.; TSUNG, A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. **Cancer Res**, 77, n. 7, p. 1548-1552, Apr 1 2017.

TSCHOEP-LECHNER, K. E.; MILANI, V.; BERGER, F.; DIETERLE, N. et al. Gemcitabine and cisplatin combined with regional hyperthermia as second-line treatment in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer. **Int J Hyperthermia**, 29, n. 1, p. 8-16, 2013.

VASCONCELOS, M. A.; ORSOLIN, P. C.; OLIVEIRA, V. C.; LIMA, P. et al. Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. **Food Chem Toxicol**, 143, p. 111549, Sep 2020.

VASCONCELOS, M. A.; ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. et al. 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, p. 1-7, Mar 2017.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J Oncol**, 32, n. 4, p. 729-737, Apr 2008.

VOGEL, C. L.; COBLEIGH, M. A.; TRIPATHY, D.; GUTHEIL, J. C. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, 20, n. 3, p. 719-726, Feb 1 2002.

WAHLER, J.; SO, J. Y.; CHENG, L. C.; MAEHR, H. et al. Vitamin D compounds reduce mammosphere formation and decrease expression of putative stem cell markers in breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 148, p. 148-155, Apr 2015.

WALDMANN, T. A. Immunotherapy: past, present and future. **Nat Med**, 9, n. 3, p. 269-277, Mar 2003.

WANDERLEY, C. W. S. **Paclitaxel reduz o crescimento tumoral através da reprogramação de macrófagos associados ao tumor para o perfil M1 via TLR4**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

WANG, T. T.; NESTEL, F. P.; BOURDEAU, V.; NAGAI, Y. et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **J Immunol**, 173, n. 5, p. 2909-2912, Sep 1 2004.

WANG, Y. L.; KONG, H.; XIE, W. P.; WANG, H. Association of vitamin D-binding protein variants with chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. **Genet Mol Res**, 14, n. 3, p. 10774-10785, Sep 9 2015.

WEIN, L.; LOI, S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). **Breast**, 34 Suppl 1, p. S27-s30, Aug 2017.

WONG, K.; DELANEY, G. P.; BARTON, M. B. Evidence-based optimal number of radiotherapy fractions for cancer: A useful tool to estimate radiotherapy demand. **Radiother Oncol**, 119, n. 1, p. 145-149, Apr 2016.

XI, J.; ZHU, X.; FENG, Y.; HUANG, N. et al. Development of a novel class of tubulin inhibitors with promising anticancer activities. **Mol Cancer Res**, 11, n. 8, p. 856-864, Aug 2013.

YAMAMOTO N. Macrophage activating factor from vitamin D binding protein. **US Patent** 5,326,749, July 5, 1994.

YAMAMOTO, N.; HOMMA, S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88, n. 19, p. 8539-8543, Oct 1 1991.

YAMAMOTO, N.; HOMMA, S.; MILLMAN, I. Identification of the serum factor required for in vitro activation of macrophages. Role of vitamin D3-binding protein (group specific component, Gc) in lysophospholipid activation of mouse peritoneal macrophages. **J Immunol**, 147, n. 1, p. 273-280, Jul 1 1991.

YAMAMOTO, N.; KUMASHIRO, R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. **J Immunol**, 151, n. 5, p. 2794-2802, Sep 1 1993.

YAMAMOTO, N.; NARAPARAJU, V. R.; ASBELL, S. O. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. **Cancer Res**, 56, n. 12, p. 2827-2831, Jun 15 1996.

YAMAMOTO, N.; NARAPARAJU, V. R.; MOORE, M.; BRENT, L. H. Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein by alpha-N-acetylgalactosaminidase detected in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol Immunopathol**, 82, n. 3, p. 290-298, Mar 1997.

YING, H. Q.; SUN, H. L.; HE, B. S.; PAN, Y. Q. et al. Circulating vitamin D binding protein, total, free and bioavailable 25-hydroxyvitamin D and risk of colorectal cancer. **Sci Rep**, 5, p. 7956, Jan 22 2015.

YU, T.; BACHMAN, J.; LAI, Z. C. Mutation analysis of large tumor suppressor genes LATS1 and LATS2 supports a tumor suppressor role in human cancer. **Protein Cell**, 6, n. 1, p. 6-11, Jan 2015.

YUAN, L.; JIANG, R.; YANG, Y.; DING, S. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits growth of the breast cancer cell line MCF-7 and downregulates cytochrome P4501B1 through the COX-2/PGE2 pathway. **Oncol Rep**, 28, n. 6, p. 2131-2137, Dec 2012.