

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

VITÓRIA PEREIRA DE CASTRO

ESTUDO DOS EFEITOS ANTIMUTAGÊNICO E RECOMBINOGÊNICO DE UM
IMUNOTERÁPICO EM *Drosophila melanogaster*

PATOS DE MINAS
JUNHO, 2023

VITÓRIA PEREIRA DE CASTRO

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTIMUTAGÊNICO E RECOMBINOGÊNICO DE UM
IMUNOTERÁPICO EM *Drosophila melanogaster***

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**

PATOS DE MINAS

JUNHO, 2023

VITÓRIA PEREIRA DE CASTRO

Estudo dos efeitos antimutagênico e recombinogênico de um imunoterápico em *Drosophila melanogaster*

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 – Instituto de Biotecnologia - UFU
Presidente

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas - Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Profa. Dra. Priscila Capelari Orsolin – Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas – MG, 14 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me guiado e sustentado desde sempre, iluminando o meu caminho e me permitindo sonhar e realizar.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe, que sempre esteve ao meu lado torcendo, apoiando e acreditando em mim. Sem vocês eu não teria conseguido!

Agradeço à Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo pela orientação e por todas as oportunidades de crescimento e desenvolvimento ao longo desses anos.

Agradeço também à minha coorientadora Profa. Me. Paula Marynella, querida Paulinha, pelos ensinamentos teóricos e orientações práticas durante o trabalho. Gratidão pela paciência, acolhimento e amizade!

Agradecimento muito especial aos meus amigos, que tornaram tudo mais leve. Sem dúvidas, a caminhada foi melhor com vocês. Obrigada pelo apoio e companhia de sempre.

Agradecimento muito especial ao meu namorado e amigo, Leonado, que esteve ao meu lado desde o começo, me apoiando e motivando. Você foi e é essencial nas minhas conquistas, obrigada por tudo!

Aos docentes e técnicos da UFU, pelos preciosos ensinamentos acadêmicos e profissionais.

Ao Lauander, por ter iniciado os estudos com GcMAF, permitindo que eu continuasse os testes experimentais.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Priscila Capelari Orsolin e Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas, pela disponibilidade em participar da minha defesa e enriquecerem o meu trabalho.

Agradecimento a todos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM/UNIPAM) pelo espaço e condições necessárias para a realização do trabalho. E aos

amigos e colegas que lá fiz (Amanda, Layon, Raiane, Giovane, Gabriel), pela companhia e pelo ambiente de amizade.

Agradecimento à equipe dos Laboratórios de Genética e Biotecnologia (GBio/UFU) e de Cultura de Células Animais (LACCA/UFU), pelos aprendizados de todos esses anos.

À Dra. Clarissa Aires de Oliveira, pelo fornecimento do composto (GcMAF) estudado nesse trabalho.

Ao Dr. Ulrich Graf do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desse sonho!

“Tudo o que pode fazer ou sonha que pode, comece.

A audácia contém gênio, poder e magia”

William Hutchison Murray

RESUMO

O número de mortes por câncer no mundo permanece ascendente, exigindo novas estratégias de tratamento. A imunoterapia tem se mostrado promissora, especialmente por apresentar menos efeitos adversos aos pacientes. O imunoterápico GcMAF ativa macrófagos e, apesar de alguns efeitos já elucidados, não há estudos dedicados à sua possível ação sobre o DNA em *Drosophila melanogaster*. O presente estudo avaliou o efeito mutagênico e ou recombinogênico de GcMAF por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster* (SMART). O GcMAF (25 pg/ml; 50 pg/ml; 100 pg/ml) foi avaliado em quatro diferentes condições experimentais: i) GcMAF individualmente; ii) GcMAF associado à Doxorubicina (DXR-0,4 mM); iii) GcMAF associado à vitamina D (VD - 1 mM); e iv) GcMAF associado a DXR e VD. VD e DXR também foram avaliados individualmente como parâmetro de controle. No ensaio foram observados os danos diretos dos tratamentos por meio do cruzamento padrão (*ST* – *Standart cross*) obtido do acasalamento de fêmeas *flr*³ e machos *mwh*. O GcMAF reduziu a ação recombinogênica da DXR em 18,16%, 12,87%, 19,11%, nas respectivas concentrações de 25 pg/ml; 50 pg/ml; 100 pg/ml. Já no tratamento de GcMAF combinado com DXR e VD, na maior concentração de GcMAF, houve uma diminuição significativa do total de manchas (17,67%). Tanto o GcMAF individualmente, quanto GcMAF associado a VD, não apresentaram ação mutagênica e / ou recombinogênica. Portanto, podemos sugerir que GcMAF seja capaz de modular os efeitos mutagênicos / recombinogênicos da DXR, reduzindo a expressão do fenótipo mutante avaliado pelo teste SMART. Tais resultados apresentam-se promissores, uma vez que, pacientes oncológicos são tratados em esquemas terapêuticos combinados. Contudo, mais estudos experimentais são necessários para avaliar os mecanismos inerentes ao efeito modulador de GcMAF sob a DXR.

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

ABSTRACT

*The number of cancer-related deaths worldwide continues to rise, demanding the development of new treatment strategies. Immunotherapy has shown promising results, particularly due to its potential to induce fewer adverse effects on patients. The immunotherapeutic agent GcMAF, which activates macrophages, has shown some elucidated effects. However, there is currently a lack of dedicated studies investigating its potential impact on DNA in Drosophila melanogaster. The present study assessed the mutagenic and/or recombinogenic effects of GcMAF using the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in D. melanogaster. GcMAF (25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml) was evaluated under four different experimental conditions: i) GcMAF alone; ii) GcMAF combined with Doxorubicin (DXR - 0.4 mM); iii) GcMAF combined with Vitamin D (VD - 1 mM); and iv) GcMAF combined with DXR and VD. VD and DXR were also individually evaluated as control parameters. The test assessed the direct damages of the treatments through the standard cross (ST) obtained by mating *flr*³ females with *mwh* males. GcMAF decreased the recombinogenic action of DXR by 18.16%, 12.87%, and 19.11% at the respective concentrations of 25 pg/ml, 50 pg/ml, and 100 pg/ml. In the treatment with the combination of GcMAF with DXR and VD, at the highest concentration of GcMAF, there was a significant decrease in the total number of spots (17.67%). Both GcMAF alone and GcMAF combined with VD did not exhibit mutagenic and/or recombinogenic effects. Therefore, we can suggest that GcMAF modulates the mutagenic/recombinogenic effects of DXR, reducing the expression of the mutant phenotype evaluated by the SMART test. These results are promising, as cancer patients are often treated with combined therapeutic regimens. However, further experimental investigations are needed to evaluate the underlying mechanisms of GcMAF's modulatory effect on DXR.*

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS: Ácido siálico
B7: Molécula da célula apresentadora de antígeno
BH: Progênie trans-heterozigotos balanceados de *Drosophila melanogaster*
BRCA1: *Breast Cancer 1*
BRCA2: *Breast Cancer 2*
CA 19-9: Proteína tumoral
CAR-T: Terapia de células receptoras de antígeno quimérico T
CD28: Fator coestimulador presente na superfície do linfócito T
CTLA4: Antígeno 4 relacionado ao linfócito T citotóxico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DXR: Doxorrubicina
EM: Esclerose múltipla
flr: Pêlo *flare*
flr3: Alelo *flare-3* de *Drosophila melanogaster*
Gal: galactose
GalNAC: N-acetil-galactosamina
Gc: Proteína precursora do GcMAF
Gc1F: um dos fenótipos da proteína Gc
Gc2: Isoforma não glicosilada da proteína Gc
GLOBOCAN: Global Cancer Observatory
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina
HB: cruzamento de alta bioativação, do inglês *High bioactivation cross*
HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida
IL-1: Interleucina 1
IL-12: Interleucina 12
IL-2: Interleucina 2
INCA: Instituto Nacional do Câncer
LB: Linfócito B
LHRH: Hormônio liberador do hormônio luteinizante
LT: Linfócito T
MAF: Fator Ativador de Macrófagos
MCF-7: Linhagem celular representativas de câncer de mama
MG: Mancha gêmea
MH: Progênie trans-heterozigotos marcados de *Drosophila melanogaster*
MIT: Microambiente imune tumoral
Mwh: Pêlo *multiple wing hair*
mwh/mwh: Linhagem *multiple wing hairs* de *Drosophila melanogaster*
MSG: Mancha simples grande
MSP: Mancha simples pequena
M1: fenótipo de macrófago pró-inflamatório (tipo 1)
M2: fenótipo de macrófago anti-inflamatório (tipo 2)
ORR: Linhagem *Oregon R, flr3* de *Drosophila melanogaster*
P450: Citocromo
PD-1: Proteína de morte celular programada 1
PD-L1: Proteína ligante 1 de morte celular
SFC: Síndrome da fadiga crônica
SMART: *Somatic Mutation and Recombination Test*

ST: Cruzamento padrão, do inglês *Standard cross*

TAA: Antígenos associados ao tumor

TSA: Antígenos específicos do tumor

TCRs: Receptores de membrana de células T

TME: Microambiente tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral

TP53: Gene supressor tumoral

UV: Ultravioleta

VD: Vitamina D

VDR: Receptor de Vitamina D

α -Man: α -manose

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF de forma isolado.	30
Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e trans-heterozigotos balanceados (BH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado a Doxorubicina.	32
Tabela 3 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado a Vitamina D (VD) 0,1 mM.	34
Tabela 4 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e trans-heterozigotos balanceados (BH) de <i>Drosophila melanogaster</i> , do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado a Vitamina D (VD) e à DXR (0,4 mM).	36

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Processo de carcinogênese evidenciando seus três estágios principais: iniciação, promoção e progressão.	14
Figura 2: Formação do GcMAF a partir da proteína Gc.	21
Figura 3: Fases do ciclo de vida da <i>Drosophila melanogaster</i> , com duração aproximada de 10 a 12 dias, dividido em: embrionária, larval (primeiro, segundo e terceiro estádios) pupa e fase adulta.	24
Figura 4: Representação do cruzamento padrão (ST) entre as linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i> , o aspecto fenotípico das asas dos descendentes gerados e os tipos de eventos mutacionais relacionados.	26
Figura 5: Imagem representativa dos setores analisados na asa de <i>Drosophila melanogaster</i>	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Aspectos gerais e dados epidemiológicos	12
1.2	Mutações	14
1.3	Estratégias de tratamento	15
1.4	Imunoterápicos no controle de tumores	17
1.5	GcMAF	20
1.6	Vitamina D no tratamento do câncer	22
1.7	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo experimental	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Agentes químicos	27
3.2	Teste para detecção de mutação e recombinação somática (<i>SMART</i>) em células de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
3.2.1	Análise microscópica do teste <i>SMART</i>	28
3.3	Análises estatísticas	29
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e dados epidemiológicos

O câncer abrange mais de 100 doenças, as quais apresentam como uma de suas principais características a incapacidade das células de responderem aos sinais de controle de proliferação e morte, acometendo diferentes tecidos do organismo. De forma geral, os tumores são classificados em benignos e malignos. Os benignos se assemelham à sua origem e apresentam comportamento menos agressivo e crescimento limitado, podendo ser removidos cirurgicamente. Por outro lado, células neoplásicas malignas se multiplicam descontroladamente, com estruturas irregulares e capacidade de invasão e geração de metástases (PRADO, 2014).

Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer, em 2020 foram registrados 20 milhões de casos da doença no mundo, sendo que os continentes asiático e europeu contabilizaram 77,9% dos diagnósticos. O câncer de mama (11,7%) e o de pulmão (11,4%) foram os mais incidentes e, quanto aos 10 milhões de óbitos, o câncer de pulmão foi responsável por 18% e o colorretal, por 9,4% (GLOBOCAN, 2020). Somente nos Estados Unidos, em 2020, ocorreram 1.806.590 novos casos de câncer e 606.520 mortes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

No Brasil, de acordo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foram registrados 232.030 novos casos de câncer em 2019, 52,44% dos quais diagnosticados em homens e 47,56% em mulheres. Já em 2020, com exceção do câncer de pele não melanoma - neoplasia mais recorrente com 30% dos casos (INCA, 2021) -, foram realizados 309.750 novos diagnósticos em homens, destacando-se o câncer de próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), traqueia brônquio e pulmão (7,9%), estômago (5,9%), cavidade oral (5%), esôfago (3,9%) e bexiga (3,4%). Em mulheres foram 316.280 novos diagnósticos sendo 29,7% tumores de mama; 9,2% de cólon e reto, 7,5% de colo do útero, 5,6% de traqueia, brônquio e pulmão, 5,4% da glândula tireoide e 3,5% de estômago. Esses dados evidenciam um aumento de 33,5% de novos casos entre os anos de 2019 e 2020, com previsão de 704 mil novos casos de câncer a cada ano no Brasil até 2025 (INCA, 2020; INCA, 2022).

Conforme sua origem, os cânceres podem ser assim nomeados: (i) linfoma, leucemia e mieloma quando atingem células linfáticas e sanguíneas; (ii) carcinomas quando acometem células epiteliais; (iii) adenocarcinomas quando envolvem tecido glandular e (iv) sarcomas

quando originados em tecidos conjuntivos ou mesenquimais. Já tumores em células blásticas apresentam o sufixo “blastoma” como, por exemplo, nefroblastoma (ONCOGUIA, 2015).

Diferentes fatores, modificáveis ou não, podem expor os indivíduos ao risco de desenvolverem tumores malignos. A idade, hereditariedade, predisposição genética e etnia são preponderantes na etiologia da doença. A maioria dos cânceres acomete indivíduos com mais de 60 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018) e, por isso, é mencionada como uma doença do envelhecimento. De fato, a idade é importante na promoção da progressão tumoral devido ao acúmulo de danos celulares drásticos, incluindo alterações no microambiente (FANE; MITCHELL, 2020), em processos epigenéticos, na comunicação celular, na expressão de proteínas, na função mitocondrial e na sobrevivência celular (HSU, 2016). O envelhecimento é um processo de perda gradual das funções a nível molecular, tecidual e sistêmico (CAMPISI, 2013).

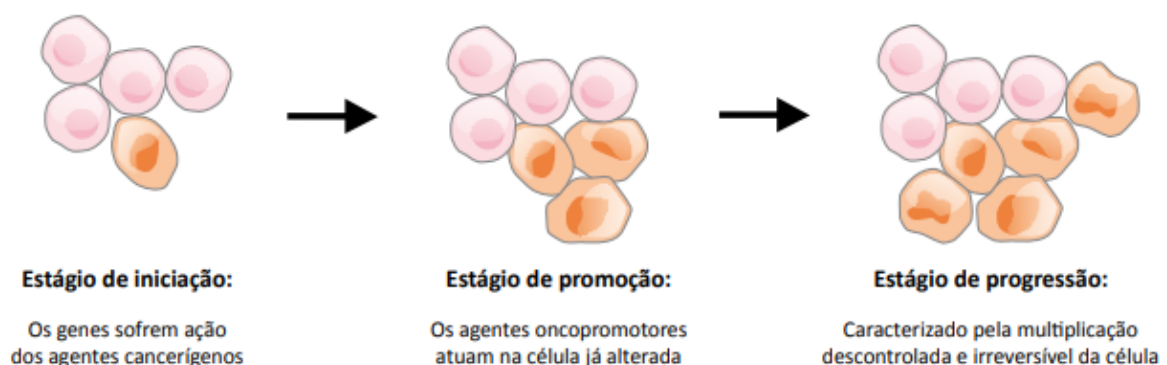
A hereditariedade também é um fator importante na carcinogênese, sendo responsável por cerca de 5 a 10% dos casos, com mais de 200 síndromes suscetíveis a serem herdadas de forma autossômica dominante. A suspeita de câncer hereditário ocorre no cenário em que há famílias com várias gerações afetadas, acometendo pessoas com idade precoce. Também é associado à ocorrência de múltiplos tumores primários ou lesões que carregam mutações herdáveis em genes-chave (NAGY; SWEET; ENG, 2004; ROBSON *et al.*, 2010). No entanto, a suscetibilidade genética pode ser variável devido à penetrância de certos genes, a qual se refere à estimativa de ocorrência do câncer na presença de um genótipo específico (MAHDAVI, 2018). Tumores com incidência hereditária mais comuns são os cânceres de mama e ovário e a síndrome de Lynch (SAAM, 2015). Em mamíferos, os genes *BRCA* (*BRCA1/ BRCA2*) são responsáveis por reparar danos no DNA evitando a instabilidade cromossômica e reduzindo a probabilidade de ocorrência de neoplasias malignas (DENG; BRODIE, 2000). Portanto, a presença desses genes mutados está relacionada a um pior prognóstico, além de um risco cinco vezes maior de desenvolver câncer de mama (SEAL *et al.*, 2006).

A etnia também é um aspecto importante e tem sido correlacionada a alterações genéticas transmitidas entre gerações. Por exemplo, em indivíduos cuja etnia é de ascendência irlandesa, sueca e húngara, foi descrita a presença do gene *BRCA* selvagem; enquanto populações hispânicas apresentaram o mesmo gene com mutações identificadas (WEITZEL *et al.*, 2005). Contudo, cerca de 90% dos cânceres são esporádicos (INCA, 2019) e maus hábitos alimentares, sedentarismo, obesidade, consumo de bebidas alcóolicas, tabagismo, exposição excessiva a agentes químicos, físicos (como radiação solar) e biológicos (infecções) são aspectos que podem ser controlados (TORRE *et al.*, 2016; INCA, 2018). Em geral são

responsáveis pela produção exacerbada de radicais livres e por danos no DNA (POULSEN *et al.*, 1998).

A carcinogênese, ou oncogênese, ocorre em três fases principais: iniciação, promoção e progressão (INCA, 2019; PANIGRAHY *et al.*, 2021) (Figura 1). Na primeira, as células foram expostas a agentes externos/internos, com alterações em seu genoma. Podem não progredir, mas, caso o estímulo permaneça, essas células alteradas continuam a se dividir caminhando para a segunda etapa. Assim, na promoção, há a multiplicação e a aquisição gradual da malignidade. Já na progressão, o câncer está instalado, sendo uma etapa irreversível (INCA, 2019). Células transformadas, por sua vez, adquirem características moleculares, bioquímicas e celulares. Destacam-se a autossuficiência em sinais estimuladores de crescimento; invasão de outros tecidos e capacidade de metastatização; potencial ilimitado de multiplicação; angiogênese, bloqueio dos mecanismos naturais de morte celular; reprogramação metabólica; escape imunológico; instabilidade genômica; desbloqueio da plasticidade fenotípica; reprogramação epigenética não mutacional; microbiomas polimórficos e senescência celular (TEIXEIRA, 2007; HANAHAN; WEINGERB, 2011; HANAHAN, 2022). De fato, a presença de alterações no material genético, ou mutações, contribui para um microambiente tumoral (TME) dinâmico e de difícil controle, com diferentes estímulos, presença de novos vasos sanguíneos, hipóxia e alterações no perfil de células imunes (NABI; LEE, 2018).

Figura 1: Processo de carcinogênese evidenciando seus três estágios principais: iniciação, promoção e progressão.



Fonte: INCA, 2011, p. 22.

1.2 Mutações

Mutações alteram as sequências de bases do DNA e podem conferir vantagens seletivas às células tornando-as não responsivas a mecanismos de controle, o que pode conduzir a uma

proliferação desenfreada e sobrevivência sustentada (MARTINCORENA *et al.*, 2017). Estruturalmente, também podem gerar quebras e perdas cromossômicas, comprometendo a integridade do genoma (WARD, 2002). Essas mudanças alteram genes codificantes e não codificantes e interferem diretamente no funcionamento molecular. É um processo lento e silencioso, que pode levar anos até que a massa tumoral seja formada (INCA, 2019; PANIGRAHY *et al.*, 2021).

Mutações em proto-oncogenes e genes supressores tumorais estão intimamente relacionadas ao processo de tumorigênese. Os proto-oncogenes controlam o processo de divisão celular e as mutações os transformam em oncogenes por diferentes eventos como translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral e mutação pontual (WARD, 2002). Os supressores tumorais são reguladores do ciclo celular e envolvidos com o reparo do DNA (RIVOIRE *et al.*, 2001; LEE; MULLER, 2010). Quando mutados há o acúmulo de danos e a inibição do processo apoptótico, favorecendo o surgimento de tumores (SEGAL *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2020). Nesse grupo destaca-se o gene *TP53*, frequentemente mutado em diferentes tumores como colorretal, pancreático, endometrial, rim, mama, tireoide, cerebrais e leucemia mieloide aguda (IRANZO *et al.*, 2018). Logo, caracterizar e compreender os processos e vias de sinalização, bem como o padrão de mutação de células transformadas, fornece importantes informações sobre possíveis alvos terapêuticos (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

1.3 Estratégias de tratamento

Cirurgia, radioterapia, transplantes de medula óssea, hormonioterapia, terapias alvo, quimioterapia e imunoterapia são estratégias adotadas para o controle de neoplasias malignas. Na oncologia, os procedimentos cirúrgicos são utilizados como tratamentos paliativos ou curativos, mas também empregados na prevenção e em reconstruções (SULLIVAN *et al.*, 2015). De fato, a cirurgia oncológica é um componente central no tratamento da doença, responsável pelo controle da progressão do câncer em 65% dos casos. No entanto, é mais eficaz se realizada quando a doença se encontra em estágio inicial ou localmente avançada (DARE *et al.*, 2015).

Na radioterapia, radiações ionizantes são empregadas no sítio comprometido com o objetivo de destruir as células transformadas (INCA, 2019). Aplicada como terapia anticâncer de linha de frente, é a terapia citotóxica mais eficaz para tumores sólidos, proporcionando melhor controle local e efeitos colaterais menos agressivos, quando comparada à quimioterapia (SCHAUE; MCBRIDE, 2015; JAROSZ-BIE, 2019). Induz apoptose, necrose, autofagia ou

senescência replicativa, controlando o crescimento da massa tumoral (JAROSZ-BIEJ *et al.*, 2019) por meio de danos induzidos na fita dupla do DNA e de quebras de fitas simples (BASKAR *et al.*, 2014; CHAJON *et al.*, 2017; MA Y *et al.*, 2017; TOULANY, 2019).

O transplante de células precursoras da medula óssea é o tratamento indicado para os cânceres que atingem as células sanguíneas, visando reconstituir uma medula saudável. Pode ser realizado de duas maneiras: a primeira, denominada autóloga, ocorre quando a medula a ser transplantada provém do próprio paciente; e a segunda, conhecida como alogênica, é caracterizada pelo fato de a medula a ser transplantada provir de um doador externo. Nesse caso busca-se a cura da doença, diferentemente do que ocorre nos tratamentos paliativos, os quais objetivam a prevenção ou o alívio do sofrimento (INCA, 2018). Em 1957, o primeiro transplante alogênico de medula óssea foi realizado em um paciente diagnosticado com síndrome de imunodeficiência combinada grave, o qual foi premiado com Nobel de Fisiologia e Medicina (GATTI *et al.*, 1968). Desde então, o número de transplantes de medula, autólogos e alogênicos, se expandiu em todo o mundo (KHADDOUR; HANA; MEWAWALLA, 2022).

A hormonioterapia, ou terapia endócrina, por sua vez, bloqueia a ação de hormônios que contribuem com o crescimento de células cancerosas. Destaca-se no tratamento dos cânceres de próstata e mama. Nesses, a supressão do hormônio ocorre por meio da administração de substâncias químicas, tais como agonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), inibidores da síntese hormonal e bloqueadores dos receptores. Também pode ser retirado, cirurgicamente, o órgão responsável pela síntese hormonal, como os testículos, em um procedimento denominado orquiectomia (POMPEO, 2002; NACIONAL CANCER INSTITUTE, 2021)

Outra abordagem é a terapia alvo, em que um alvo molecular específico é almejado utilizando, em geral, anticorpos monoclonais ou inibidores químicos (GERBER, 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA, 2016). É um método muito promissor no tratamento de tumores e tem sido priorizado no desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos. Para o sucesso dessa terapia, a caracterização molecular das células transformadas é essencial, o que permite a individualização do tratamento. Proteínas reguladoras do ciclo celular, fatores de crescimento, promotores de angiogênese e moduladores apoptóticos, são alguns dos alvos de drogas utilizadas na rotina clínica (CHABNER; ROBERTS, 2005).

Já na quimioterapia são utilizadas substâncias químicas isoladas ou combinadas para matar as células tumorais e inibir micrometástases clinicamente indetectáveis. É amplamente utilizada e importante para a sobrevivência dos pacientes. Contudo, é associada a efeitos adversos

graves e limitada frente à resistência desenvolvida pelas células tumorais (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Os quimioterápicos são administrados de acordo com o tumor e o estágio da doença, em sistemas, em geral, polifarmacológicos. São exemplos de quimioterápicos rotineiramente utilizados os agentes alquilantes, antimetabólitos, antraciclinas, inibidores mitóticos e os corticosteroides (ONCOGUIA, 2021).

Os alquilantes interagem diretamente com o DNA, formando ligações e impedindo a replicação do material genético (ALMEIDA *et al.*, 2005; LAJOUS *et al.*, 2019). Os antimetabólitos, por sua vez, visam desestabilizar enzimas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos (LUENGO; GUI; HEIDEN, 2017). Já as antraciclinas estão indiretamente associadas à formação de espécies reativas que conduzem à alquilação de proteínas, peroxidação de lipídios e danos diretos no DNA, induzindo a processo de morte celular (MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2020). A Doxorubicina (DXR) é um quimioterápico da família das antraciclinas com amplo espectro de ação contra tumores. Tem como principal mecanismo de ação a inibição da Topoisomerase II, uma importante enzima associada às atividades de clivagem, manipulação e rearranjo da fita de DNA, diretamente envolvidas no processo de replicação e proliferação celular (RANG *et al.*, 2007; KARIM *et al.*, 2023). Já os inibidores mitóticos impedem a divisão de células cancerosas ao desestabilizar os microtúbulos ou inibir proteínas de *checkpoint* (ANNE; TSAO, 2011). A instabilidade do fuso mitótico e a consequente desregulação cromossômica ativam o mecanismo de apoptose (JOSHI *et al.*, 2021). Por fim, os corticosteróides são introduzidos para minimizar os efeitos colaterais relacionados ao tratamento (LEPPERT; BUSS, 2012).

Finalmente, a imunoterapia visa estimular o sistema imunológico do paciente no combate às células transformadas (FREIRE, 2019; HUDSON *et al.*, 2020). A sua aplicação contra a doença teve início em 1983, quando o cirurgião e pesquisador William Coley utilizou bactérias para ativar o sistema imunológico no combate ao câncer (DRAKE; JAFFEE; PARDOLL, 2006). A imunoterapia tem sido priorizada em investigações científicas, sendo responsável por significativos avanços na oncologia (COUZIN-FRANKEL, 2013).

1.4 Imunoterápicos no controle de tumores

A resposta imunológica de um organismo é, de forma geral, definida como inata e adquirida. O sistema imune inato é composto por barreiras físicas e químicas, por fagócitos (macrófagos e neutrófilos), mastócitos, células dendríticas e células *natural killer*, além de outras proteínas plasmáticas e citocinas. Já a resposta imune adquirida é constituída por

linfócitos B (produtores de anticorpos) e linfócitos T, sendo caracterizada pela especificidade e capacidade de memória (SMITH, 2012; LEFRANC, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015). Ambas estão envolvidas não somente em processos infecciosos, mas também no controle de células transformadas (SADELAIN; RIVIÈRI; RIDDELL, 2017).

Linfócitos T auxiliares e Linfócitos T citotóxicos são essenciais no combate a tumores de modo que os perfis dessas células podem contribuir para um pior prognóstico da doença. Nesse contexto, estudos associam a superexpressão de marcadores de subpopulações de células aos diferentes estágios da carcinogênese (BINDEA *et al.*, 2013). Portanto, a capacidade replicativa (expansão clonal) e de diferenciação das células T efetoras são importantes na ação antitumoral. Essas células possuem receptores de membrana (TCRs) que permitem o reconhecimento de antígenos específicos decorrentes de mutações em células malignas (KLEBANOFF; ROSENBERG; RESTIFO, 2016; KISHTON; SUKUMAR; RESTIFO, 2017).

Em tumores, a resposta imunológica envolve o microambiente imune tumoral (MIT), constituído pela interação entre células de defesa, fatores extracelulares e receptores. O MIT está imerso no microambiente tumoral, caracterizado por uma ampla heterogeneidade de sinais, em que coabitam resposta antitumoral e imunoedição (FU *et al.*, 2021). Esta regula a resposta de modo a promover o desenvolvimento e progressão da doença (YANG, 2015). A imunoedição consiste nas etapas de eliminação, equilíbrio e escape. Na eliminação as células são capazes de, sistemicamente, detectar a presença da massa tumoral e destruí-la antes mesmo de ser clinicamente detectável. Esse processo envolve diferentes citocinas capazes de ativar células dendríticas que, por sua vez, promovem a resposta imune. Já na etapa de equilíbrio, células tumorais sobreviventes à eliminação são mantidas em estado de dormência pela imunidade adaptativa, ou seja, a resposta imunológica restringe o crescimento do tumor. Tumores podem permanecer nessa fase por longos períodos antes de serem identificados ou de promoverem o surgimento de metástases. Por fim, o escape é a fase na qual as células cancerosas surgem como tumores estabelecidos, com a perda de antígenos tumorais ou resistência ao efeito citotóxico da resposta imune (DUNN *et al.*, 2002; KHONG; RESTIFO, 2002; AGUIRRE-GHISO, 2007; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

As terapias de células receptoras de antígeno quimérico T (CAR-T), a terapia de bloqueio de *checkpoint* imunológico e as vacinas de neoantígenos tumorais são estratégias imunoterapêuticas. Na tecnologia CAR-T, os linfócitos T são modificados geneticamente a fim de direcionar sua ação à antígenos associados ao tumor. Essa terapia consiste na ativação e potencialização de linfócitos T autólogos *in vitro*, o que restabelece sua capacidade de combater células transformadas após sua introdução no organismo (KIM; CHO, 2020). Já o bloqueio de

checkpoint imunológico age removendo sinais inibitórios emitidos por células tumorais que bloqueiam a ação de linfócitos T. Logo, ao remover esses sinais de inibição, os linfócitos recuperam sua atividade e impedem que células do tumor escapem da resposta imune. Esses *checkpoints* regulam negativamente a resposta imunológica e resguardam o hospedeiro de possíveis danos gerados pela autoimunidade e por processos inflamatórios exacerbados. Alguns dos principais *checkpoints* são a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e o antígeno 4, relacionado ao linfócito T citotóxico (CTLA4) (GITA; UMA; STEPHEN, 2016).

A imunoterapia envolvendo PD-1 age inibindo sua interação com a proteína ligante 1 de morte celular (PD-L1) presente em células normais do organismo. O complexo PD-1-PDL-1 induz anergia do linfócito, controlando a resposta imune. No entanto, células cancerosas utilizam esse mecanismo como escape, expressando altos níveis de PD-1 ou PD-L1. Nesse contexto, inibidores de PD-1 vêm sendo utilizados como imunoterápicos, por exemplo Pembrolizumabe (Keytruda) e Nivolumabe (Opdivo); assim como de PD-L1 como Atezolizumabe (Tecentriq) e o Avelumabe (Bavencio). Outro *checkpoint* importante na regulação negativa da resposta imune é a proteína CTLA4, que bloqueia a secreção de IL-2 e a expansão clonal de linfócitos efetores. A CTLA4 se liga à molécula B7 da célula apresentadora de antígeno, impedindo sua interação com o fator coestimulador CD28 presente na superfície do linfócito T. Consequentemente, o linfócito T não é ativado. Assim, a estratégia imunoterápica também visa inibir CTLA4 para restaurar a atividade citotóxica dos linfócitos contra células tumorais. O Ipilimumab (Yervoy), anticorpo monoclonal inibidor de CTLA4, é normalmente utilizado na rotina clínica em sinergia ao anti-PD-1 Nivolumabe. No entanto, esses medicamentos podem provocar efeitos colaterais, como a indução de respostas autoimunes a outros órgãos e tecidos do corpo (KRUMMEL; ALLISON, 1995; SHARMA *et al.*, 2017; CHA; LEE; PONNAZHAGAN, 2020; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022).

Por fim, a terapia com vacinas de neoantígenos tumorais objetiva estimular a resposta do paciente. As vacinas são administradas com adjuvantes, os quais potencializam a ativação da resposta imune especificamente para antígenos de células transformadas (não autólogos). Esse mecanismo é eficaz, pois supera a baixa imunogenicidade das células cancerosas, característica que as permite escapar da resposta imunológica (PENG; MO; WANG, 2019). Antígenos tumor-específicos são alvos ideais para células T e podem ser subdivididos em antígenos associados ao tumor (TAA), quando superexpressos por genes não mutados; e antígenos específicos do tumor (TSA), quando expressos somente pelo tumor e, consequentemente, com menor probabilidade de sofrer tolerância imunológica (WAGNER; MULLINS; LINNEBACHER, 2018; ZHANG *et al.*, 2021). Assim, essas vacinas podem ser constituídas

por peptídeos, células dendríticas estimuladas, mRNA, DNA e vírus (LOPES; VANDERMEULEN; PRÉAT, 2019).

No entanto, a imunoterapia ainda encontra limitações devido ao microambiente tumoral inacessível e imunossupressor, ao potencial citotóxico dos medicamentos às células imunes, à evolução da resistência terapêutica e à baixa imunogenicidade de alguns cânceres (BOCKAMP *et al.*, 2020). Logo, torna-se necessário desenvolver novas estratégias, ampliando, assim, as ferramentas disponíveis para tratar a diversidade de tumores. De fato, o câncer é um problema de saúde pública com estimativas preocupantes. Existe um interesse mundial em conhecer novos compostos com potencial terapêutico, os quais precisam ser validados antes de serem adotados na prática clínica.

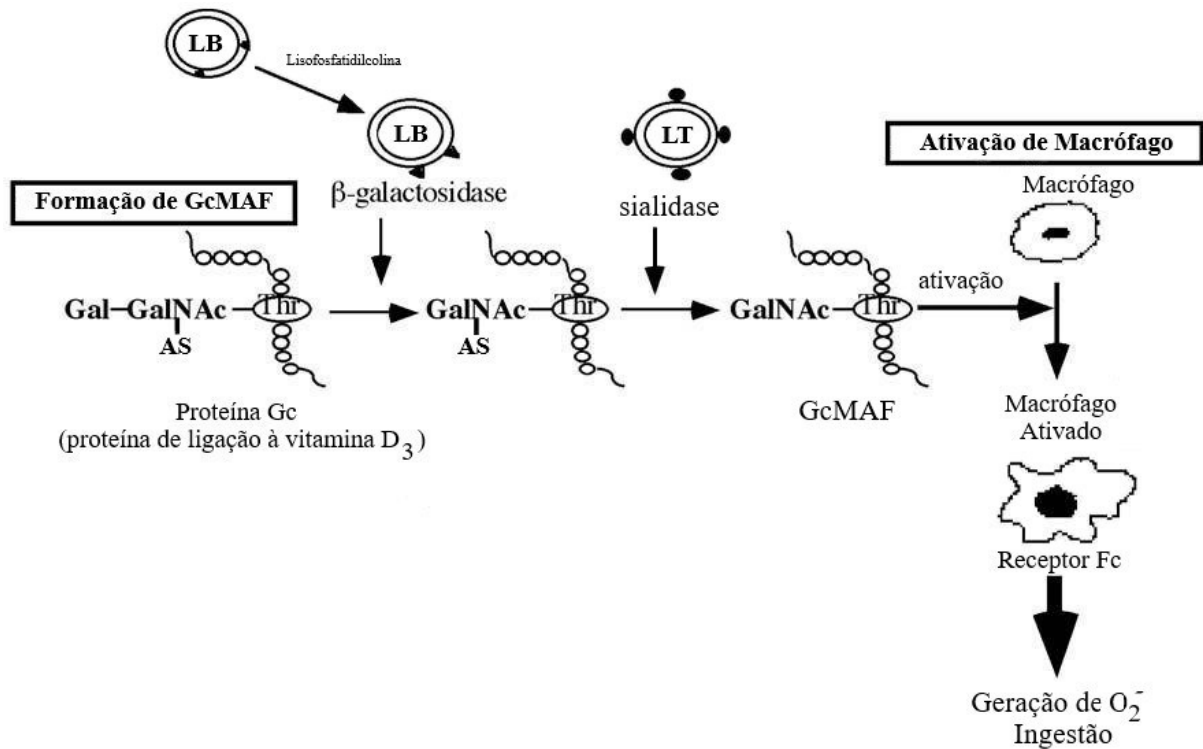
1.5 GcMAF

Os macrófagos são células fagocíticas do sistema imune com importante ação contra patógenos e células alteradas (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2015), regulando a resposta inflamatória ao secretar citocinas, proteoglicanos, espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e superóxidos, e atuando no reparo tecidual, na morte celular e na angiogênese (INUI *et al.*, 2013; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). O papel antiangiogênico das terapias anticâncer está relacionado à capacidade do ativo de infiltrar em tumores sólidos, alterando a comunicação e a vascularização. Essa característica pode ser mediada pela proteína Gc, juntamente com linfócitos B e linfócitos T, os quais são responsáveis pelo estímulo de macrófagos por meio da produção do Fator Ativador de Macrófagos (MAF) dependente da proteína humana Gc (GcMAF) (INUI *et al.*, 2013).

A Gc é uma proteína sérica multifuncional e polimórfica de aproximadamente 53 kDa, com estrutura homóloga à albumina sérica e composta por três domínios. O domínio 1 N-terminal possui o sítio de ligação a metabólitos da Vitamina D (VD) e o domínio 3 C-terminal corresponde a região de glicosilação, ou seja, de ligação dos açúcares galactose (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), ácido siálico (AS) e α -manose (α -Man) (NAGASAWA *et al.*, 2005). A conversão de Gc em GcMAF foi proposta, inicialmente, por Nabuto Yamamoto envolvendo um mecanismo em que a beta-galactosidase, presente na membrana de linfócitos B (LB), remove uma fração de galactose da proteína Gc1F (um dos fenótipos da proteína). Em seguida, a enzima sialidase, ligada à membrana de linfócitos T (LT), é responsável por remover uma porção de ácido siálico e a GalNAc resultante promove a ativação dos macrófagos (YAMAMOTO; HOMMA, 1991) (Figura 2). Em 2020, um outro modelo foi proposto

envolvendo a isoforma não glicosilada de Gc2, a qual foi capaz de ativar macrófagos por meio de um mecanismo que não envolve GalNAc, contudo, não está claro o seu envolvimento no controle de células malignas (NABESHIMA *et al.*, 2020).

Figura 2: Formação do GcMAF a partir da proteína Gc.



Fonte: Adaptado, NAGASAWA *et al.*, 2005.

Já foi demonstrado, previamente, que altos níveis da enzima α -N-acetilgalactosaminidase (nagalase) são detectados no soro de pacientes com câncer, bloqueando MAF (YAMAMOTO *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1997). Nesse contexto, a administração exógena de GcMAF seria uma possível estratégia de tratamento (MOHAMAD *et al.*, 2002). Sua ação antitumoral também está relacionada a sua resposta pró-inflamatória na presença de antígenos, através da liberação de citocinas (TNF alfa, IL-12, IL-1), atraindo linfócitos para o TME (ANDERSON *et al.*, 2020). Em 2011, foi proposta uma nova formulação do GcMAF, desenvolvido pelos pesquisadores Hitoshi Hori e Yoshihiro Uto na Universidade de Tokushima. Diferente do MAF mencionado até então, essa reformulação (GcMAF de segunda geração) apresentou uma ação fagocitária maior e, consequentemente, maior potencial imunoterapêutico (UTO *et al.*, 2012).

Ensaio clínicos com GcMAF demonstraram sua ação no tratamento de doenças infecciosas, síndrome da fadiga crônica (SFC) e esclerose múltipla (EM) (INUI *et al.*, 2015; INUI *et al.*, 2016). Em tumores, foi verificado previamente uma redução significativa na viabilidade de células MCF-7, representativas de câncer de mama, decorrente do sinergismo entre GcMAF, metabólitos da VD e o seu receptor (VDR) (THYER *et al.*, 2013).

O tratamento com GcMAF como terapia integrativa a outras imunoterapias, relatado em um estudo publicado em 2013, também apresentou resultados promissores. MAF de segunda geração foi aplicado via intramuscular ou subcutânea semanalmente em um paciente de 71 anos com carcinoma tímico com metástase pulmonar, sendo que não houve progressão da doença em um ano após a conclusão do tratamento (24 meses). O mesmo estudo também avaliou o GcMAF associado a hipertermia em um paciente de 74 anos diagnosticado com câncer de próstata com múltiplas metástases ósseas, em que foi observada a regressão das lesões. Em outra paciente de 72 anos com câncer de fígado metastático, o tratamento com o imunoterápico contribuiu para o aumento de sobrevida livre por 12 meses (INUI *et al.*, 2013). Segundo Chaiyasit, Toshio, Wiwanitkit (2015), o GcMAF, aplicado no tratamento de câncer de tireoide em uma paciente de 62 anos durante 5 semanas, foi responsável por uma significativa redução na expressão de proteínas tumorais no sangue (redução de 40,3 U/mL para 26,42 U/mL). Por fim, foi realizado um estudo com 20 pacientes, todos apresentando concentrações séricas de nagalase superior ao normal. Foram aplicadas injeções de GcMAF semanalmente e, em 19 deles, houve redução significativa da enzima inibidora de MAF (THYER, 2013).

1.6 Vitamina D no tratamento do câncer

A VD é um composto lipossolúvel essencial à saúde humana. Atua na manutenção da homeostase do cálcio e da integridade esquelética, além de regular a resposta imunológica (CHRISTAKOS, 2017) controlando a síntese de interleucinas, monócitos, macrófagos, linfócitos T e B e células dendríticas (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). Conhecida como um pro-hormônio, possui duas isoformas principais: Vitamina D2, normalmente formada na pele através do estímulo de ergosterol pela radiação UV; e a VD, formada na pele humana através da irradiação da molécula de 7-desidrocolesterol (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

A VD é amplamente relatada como essencial no controle de diversas doenças sendo, em um primeiro momento, transformada em 25-hidroxivitamina no fígado e, posteriormente, convertida em 1,25-dihidroxivitamina D3 nos rins (TRIPKOVIC, 2012). Possui efeitos

antioxidantes, anti-inflamatórios e de reparo do DNA (JEON; SHIN, 2018). Além disso, o potencial anticâncer da VD no organismo se estende à sua participação em diferentes mecanismos com efeito antiproliferativo ao inibir proteínas importantes na regulação da mitose (como as quinases dependentes de ciclinas); pró-apoptótico ao suprimir genes que inibem a morte celular; de diferenciação fenotípica, e de inibição da invasão e angiogênese (FATHI *et al.*, 2019).

No câncer de próstata, Trump e Aragon-Chingo (2018) revisaram dados de ensaios pré-clínicos em modelos de hamster que demonstraram o efeito antitumoral da VD. Esse hormônio também reduziu infecções pela bactéria *Helicobacter pylori*, o que se mostrou promissor no controle do câncer gástrico (KWAK; PAIK, 2004). No câncer de tireoide, por sua vez, a baixa expressão de VDR foi associada aos reduzidos níveis de VD no sangue e à agressividade da doença (KIM *et al.*, 2022).

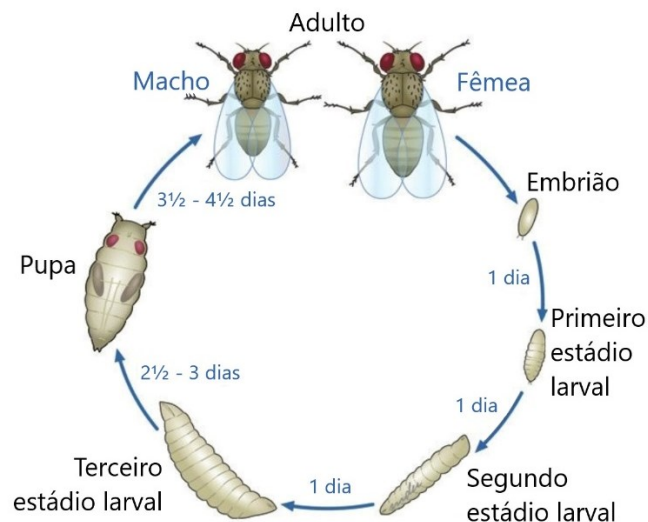
Além do seu efeito isolado, a VD pode ser combinada com outras terapias. A associação de VD à cisplatina, utilizada no controle do carcinoma espinocelular oral (CEC), promoveu a quimiossensibilidade das células tumorais, o que auxiliou no combate à resistência ao quimioterápico (HUANG *et al.*, 2019). A VD também intensificou a radiosensibilidade das células de câncer colorretal em modelos animais (YU *et al.*, 2021). No câncer de mama é capaz de promover a apoptose de células transformadas, reduzir a invasão e angiogênese, além de modular o sistema imunológico. Seu efeito adjuvante já foi descrito auxiliando a reduzir a incidência de tumores positivos para receptores de estrogênio (ZEICHNER *et al.*, 2015).

1.7 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo experimental

Drosophila melanogaster, reino Animalia e família Drosophilidae, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um importante modelo biológico experimental, utilizado desde o século XX em estudos genéticos. Foi o primeiro organismo complexo a ter seu genoma sequenciado, com pouco mais de 14.000 genes em quatro cromossomos (ADAMS *et al.*, 2000). Possui dimorfismo sexual, e, em sua maioria, os machos são menores que as fêmeas. Estas apresentam abdômen mais escuro, arredondado e aguçado com um padrão uniforme de bandas pigmentadas, sendo altamente férteis. As *Drosophilas* possuem um tempo de geração de aproximadamente 10 dias quando cultivadas a 25°C e são capazes de ativar promutágenos enzimaticamente e procarcinógenos *in vivo*. O seu cultivo em laboratório é interessante, pois os meios de cultura a base de banana e fermento são baratos e permitem uma ampla progênie (NEPOMUCENO, 2015). Seu ciclo de vida é curto e formado pelas seguintes etapas: fase

embrionária, no interior do ovo, que se estende por 24 horas após a fecundação; fase larval, que se dá cerca de um dia após a fertilização do ovo; e a fase de pupa, na qual os tecidos da larva são substituídos por tecidos adultos originários dos discos imaginais, dando origem ao indivíduo adulto (FERNÁNDEZ, 2012).

Figura 3: Fases do ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*, com duração aproximada de 10 à 12 dias, dividido em: embrionária, larval (primeiro, segundo e terceiro estádios) pupa e fase adulta.



Fonte: Adaptado, ONG *et al.*, 2014.

A *D. melanogaster* é um modelo experimental eficiente para a compreensão dos mecanismos moleculares de patologias humanas, visto que quase 75% dos genes associados a doenças humanas apresentam um homólogo funcional na mosca. Consequentemente, muitas propriedades biológicas, fisiológicas e neurológicas são correspondentes entre os mamíferos e a mosca. Assim, o embrião pode ser usado em estudos funcionais de formação de padrões, como a programação celular e a organogênese; a larva pode ser empregada em estudos sobre processos de desenvolvimento e fisiologia; a pupa é um modelo que possibilita investigar processos de desenvolvimento, e a mosca adulta auxilia em estudos sobre o sono e memória (PANDEV, 2011).

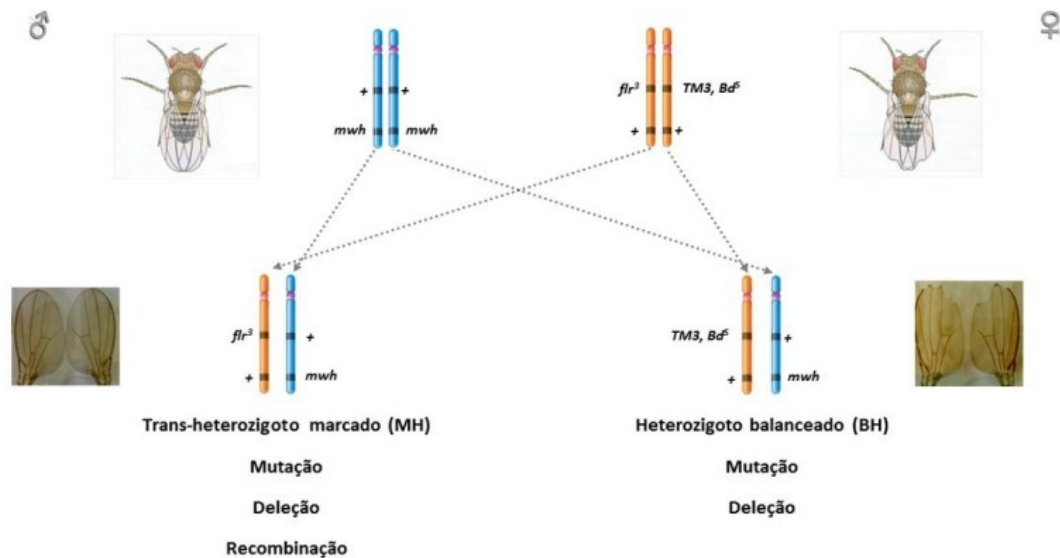
Atualmente, vários testes são passíveis de serem realizados utilizando *D. melanogaster*, sendo um adequado modelo *in vivo* para estudos da ação moduladora de drogas. Destaca-se o teste para detecção de mutação e recombinação somática (*Somatic Mutation and Recombination Test - SMART*) ou teste da mancha da asa de *D. melanogaster*, que avalia a mutagenicidade e recombinogenicidade de compostos naturais e sintéticos. O teste *SMART* foi

desenvolvido em 1984 por Graf *et al.*, (1984) e usa a progênie resultante do acasalamento das linhagens *Multiple wing hair (mwh/mwh)*; *Flare³ (flr³ /In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aabx34eBds)* e linhagem *Oregon R; flr³ (ORR; flr³ /In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aabx34eBds)³*; em que a possível ação mutagênica e/ou recombinogênica dos agentes químicos induz mutações ou recombinações nos genes marcadores, ocasionando alterações fenotípicas nas asas da mosca adulta. Esses danos são facilmente observados como: (i) pelos *mwh*, decorrente do gene *mwh* em homozigose recessiva, que leva à expressão de três ou mais pelos por célula da asa; e (ii) o padrão *flr³*, implica na malformação do pelo, expressando aparência de “chama de fogo” (GUZMÁN- RINCÓN; GRAF, 1995). A observação do padrão de pelos permite conhecer se a lesão gerada no DNA é por mutação ou recombinação. A quantidade de manchas expressas nas asas permite uma análise quantitativa dessa ação mutagênica e/ou recombinogênica do agente testado.

Adicionalmente, o teste da mancha da asa permite distinguir os mutágenos com ação direta no DNA por meio do cruzamento padrão (*Standard cross* - ST), ou mutágenos de ação indireta pelo cruzamento de alta bioativação metabólica (*High bioactivation cross* - HB). O cruzamento ST, realizado no presente trabalho, ocorre entre as linhagens mutantes, fêmeas virgens *Flr³* e machos *mwh/mwh*; com níveis basais de enzimas da família citocromos P450 (CYP6A2). E o tratamento HB decorre do cruzamento entre as linhagens mutantes, fêmeas virgens *Oregon R; flr³* e machos *mwh/mwh*; com alta atividade das enzimas do citocromo P450. Essas enzimas têm importante participação na metabolização de fármacos, carcinógenos, esteroides e de vitaminas (A, D, E e K) (GRAF *et al.*, 1989; RENDIC; GUENGERICH, 2012).

A partir desses cruzamentos, padrão e de alta bioativação, são obtidas as progênies trans heterozigos (MH), que apresentam asas com bordas lisas como marcação fenotípica; e descendentes heterozigotos balanceados (BH), que apresentam um cromossomo balanceador com múltiplas inversões (*TM3, Bd⁸*) em seu genótipo, e são caracterizadas com asas de bordas serrilhadas. Nesse sentido, através dos descendentes MH, são detectados eventos como deleções, mutações de ponto e recombinação mitótica, observados a partir da formação de manchas simples (*flr* ou *mwh*) e manchas gêmeas (*flr* e *mwh*). Logo, a progênie MH, evidencia a presença de eventos mutacionais e/ou recombinogênicos. E os descendentes BH permitem somente a observação de eventos mutacionais, através da ocorrência de manchas mutantes simples (GRAF *et al.*, 1985; GUZMÁN- RINCÓN; GRAF, 1995).

Figura 4: Representação do cruzamento padrão (ST) entre as linhagens de *Drosophila melanogaster*, o aspecto fenotípico das asas dos descendentes gerados e os tipos de eventos mutacionais relacionados.



Fonte: REZENDE, 2012.

Em suma, o teste para detecção de mutação e recombinação somática é empregado com sucesso em pesquisas com agentes químicos e físicos, pois permite avaliar e quantificar ação direta e indireta (pró-mutágenos) no DNA da mosca. Logo, através do *SMART*, é possível estudar a ação antimutagênica e antirrecombinogênica de drogas antineoplásicas. Ademais, testes pontuais em modelos de *Drosophila*, estão entre os poucos capazes de quantificar eventos de recombinação somática, essenciais para melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento do câncer (MARCOS; CARMONA, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos mutagênico e/ou recombinogênico do GcMAF isolado, e ainda, o seu efeito associado à DXR e à VD, por meio do teste *SMART* em *D. melanogaster*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação direta do imunoterápico no DNA de *D. melanogaster*;
- Avaliar se GcMAF modula a ação mutagênica/recombinogênica da Doxorubicina;
- Avaliar se a Vitamina D modula o efeito do GcMAF frente a sua associação com a Doxorubicina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Agentes químicos

O imunoterápico testado, GcMAF, foi produzido pela empresa SAISEI Mirai junto a Universidade de Tokushima no Japão, INUI-X, LOTE: 520118060. O Cloridrato de Doxorubicina (DXR) (CAS 25316-40-9), LOTE 19H0693, comercialmente conhecida como Adriblastina® RD, foi obtida pela WYETH® indústria farmacêutica Ltda. E a Vitamina D (CAS 67-97-0), LOTE: PURI006876, foi obtida da 25 Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda., Anápolis (GO), Brazil.

Todos os compostos foram diluídos em etanol 5% e imediatamente utilizados.

3.2 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (*SMART*) em células de asas de *Drosophila melanogaster*

Para o teste *SMART* foi realizado somente o cruzamento padrão (*Standard Cross* - ST), no qual machos *mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *flr*³. A progênie resultante foi transferida para frascos de vidro contendo meio preparado com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose sob uma base sólida de ágar (4% p/v), no qual se esperou a ovoposição por um período de 8h. Após 72h, as larvas, no seu terceiro estágio de desenvolvimento, foram lavadas e mantidas em frascos contendo purê de batata em flocos e os respectivos tratamentos e concentrações:

- 1 - GcMAF isolado: 25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml;
- 2 - GcMAF: 25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml associado à 0,4 mM de DXR;
- 3 - GcMAF: 25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml associado à 1mM de VD; e
- 4 - GcMAF: 25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml associado à 1mM de VD e à 0,4mM de DXR.

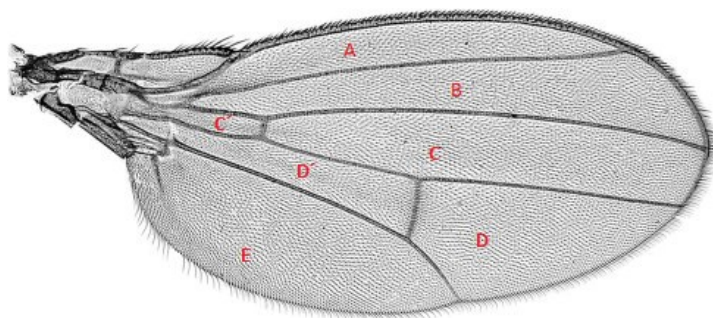
Foram incluídos o controle positivo (DXR 0,4mM) e o controle negativo (etanol 5%). A VD a 1mM também foi avaliada isoladamente. As larvas foram submetidas a um tratamento crônico durante 48h até o desenvolvimento do estágio de pupa.

As dosagens empregadas do imunoterápico neste estudo foram estabelecidas por meio de experimentos *in vivo* em camundongos, previamente conduzidos por KOGA *et al.*, (1999). A concentração de DXR (0,4 mM) utilizada como controle positivo, foi definida com base em estudos anteriores que evidenciam seu potencial mutagênico e recombinogênico nessa mesma dosagem em *D. melanogaster* (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015). De forma semelhante, a VD foi utilizada na concentração de 0,1 mM embasada em estudos que indicam sua atividade antimutagênica e antirrecombinogênica no DNA de *D. melanogaster* (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

3.2.1 Análise microscópica do teste SMART

Para a análise microscópica, as moscas adultas foram transferidas para frascos contendo etanol 70% (v/v) e, posteriormente, separadas em fêmeas e machos, tendo suas asas destacadas e estendidas aos pares sobre lâminas com auxílio de pinça entomológica. Para a etapa de destaque das asas e fixação sobre as lâminas, utilizou-se a solução de Faure (30g de goma arábica, 16 mL de glicerol, 200g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada) e uma placa aquecedora para secagem (40°C). As superfícies das asas (dorsal e ventral) foram analisadas ao microscópio óptico de luz, com aumento de 400x. A frequência e os tamanhos das manchas encontradas nos respectivos setores da asa (A, B, C', C, D', D e E – Figura 4) foram registradas para a posterior análise estatística.

Figura 5: Imagem representativa dos setores analisados na asa de *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Adaptado, VAZ; VILELA; CARVALHO, 2018.

3.3 Análises estatísticas

De acordo com o método de decisão múltipla proposto por Frei e Würigler (1988), a análise estatística do teste *SMART* foi definida sob a frequência dos tipos de manchas: mancha simples pequena (MSP) ou mancha simples grande (MSG) e mancha gêmea (MG). A frequência total de manchas por mosca, para cada tratamento, foi registrada em uma planilha. Essas frequências foram comparadas aos pares (controle negativo e GcMAF individualmente; controle positivo e GcMAF + DXR; controle positivo e GcMAF + VD + DXR; controle negativo e GcMAF + VD) utilizando o teste binominal condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), a um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). Foram gerados quatro possíveis diagnósticos: positivo, negativo, fracamente positivo ou inconclusivo.

Os tratamentos em que o total de manchas (TM) foram inconclusivos foi adotado o Teste *U* não paramétrico de Mann, Whitney Wilcoxon ($p<0,05$) (FREI; WÜRGLER, 1995). Os percentuais (%) de recombinação foram calculados segundo o modelo de Abraham (1994), utilizando a frequência de manchas mutantes por 10^5 células.

As comparações das manchas mutantes induzidas em descendentes MH e BH foram calculadas da seguinte forma:

- (i) Frequência de mutação (FM) = frequência de clones em indivíduos BH /
frequência de clones em indivíduos MH
- (ii) Frequência de recombinação (FR) = 1 – frequência de mutação (FM)

4 RESULTADOS

As tabelas mostram os resultados do teste de mutação e recombinação somática – *SMART* em *D. melanogaster*. Descendentes MH do cruzamento ST foram tratados com diferentes concentrações de GcMAF (25 pg/ml; 50 pg/ml e 100 pg/ml), o qual foi utilizado individualmente ou combinado com DXR (0,4mM) e à VD (1mM).

Na Tabela 1, os tratamentos com GcMAF individualmente, 25 pg/ml, 50 pg/ml e 100pg/ml, não diferiram do controle negativo ($p>0,05$), indicando ausência de mutagenicidade para todas as concentrações.

Tabela 1 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF de forma isolado.

Cruzamento ST																		
Genótipos e Concentrações	Número de Indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. Estatístico ^a												Total manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. Clones mhw ^{c,d}	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^f		Recombinação (%)
		MSP		MSG		MG		TM		Observado	Corrigido pelo controle							
		(1-2 cels) ^b		(>2 cels) ^b														
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2										
mwh/flr ³ (MH)																		
Controle Negativo	40	0,43	(17)		0,05	(02)		0,00	(00)		0,48	(19)		19	1,42	0,97	0,65	
DXR 0,4mM	40	1,68	(67)	+	2,43	(97)	+	1,50	(60)	+	5,60	(224)	+	138	3,64{4,00}	7,07{6,10}	22,11-{24,39}	97,38
GcMAF 25 pg/mL	40	0,18	(07)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,18	(07)	-	06	1,67{1,31}	0,31-{0,67}	0,24-{0,41}	
GcMAF 50 pg/mL	40	0,20	(08)	-	0,00	(00)	i	0,03	(01)	i	0,23	(09)	-	07	1,29{1,50}	0,36-{0,61}	0,22-{0,43}	
GcMAF 100 pg/mL	40	0,28	(11)	-	0,10	(04)	i	0,03	(01)	i	0,40	(16)	-	08	2,38{0,73}	0,41-{0,56}	0,53-{0,23}	

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): (+), positivo; (-), negativo; (i), inconclusivo. (*m*), fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$. (MSG), mancha simples grande; (MSP), mancha simples pequena; (MG), mancha gêmea; (TM), total de mancha.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Já os resultados apresentados na Tabela 2 mostram a quantidade de manchas mutantes nos descendentes MH e BH de *D. melanogaster*, submetidos ao tratamento com GcMAF nas concentrações de 25 pg/ml; 50 pg/ml e 100 pg/ml, associado à DXR (0,4mM). Os descendentes BH foram analisados pois, quando comparados ao controle, as frequências de manchas observada na progênie MH foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). Os dados revelam uma redução da quantidade de manchas mutantes para todas as concentrações comparadas com o controle positivo (DXR, 0,4 mM). Adicionalmente, houve uma maior redução do fenótipo mutante na maior concentração de GcMAF, 19,11% (122 manchas).

A taxa de eventos recombinogênicos da DXR (0,4mM) no cruzamento ST foi de 97,37%. Já a taxa de inibição desses eventos mediada pelas associações com GcMAF a 25 pg/mL, 50 pg/mL e 100 pg/mL foram, respectivamente, 18,16%, 12,87% e 19,11%. Esses resultados evidenciam a ação moduladora do imunoterápico em todas as concentrações sobre o efeito recombinogênico da DXR.

Tabela 2 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e trans-heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado a Doxorubicina.

Cruzamento ST																			
Genótipos e Concentrações	Número de Indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. Estatístico ^a												Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Média das classes de tam. Clones <i>mhw</i> ^{c,d}	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^f		Recombinação (%)	Inibição (%)
		MSP		MSG		MG		TM		Observado	Corrigido pelo controle								
		(1-2 cels) ^b		(>2 cels) ^b															
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2											
<i>mwh/flr</i> ³ (MH)																			
Controle Negativo	40	0,43	(17)	0,05	(02)	0,00	(00)	0,48	(19)			19	1,42	0,97	0,65				
DXR 0,4mM	40	1,68	(67)	+	2,43	(97)	+	1,50	(60)	+	5,60	(224)	+	138	3,64 {4,00}	7,07 {6,10}	22,11 {24,39}	97,38	
GcMAF 25 pg/mL + DXR	40	0,40	(16)	+	1,40	(56)	+	1,58	(63)	-	3,38	(135)	f+	116	4,03 {4,54}	5,94 {4,97}	24,20 {28,82}	18,16	
GcMAF 50 pg/mL + DXR	40	0,43	(17)	+	1,20	(48)	+	1,63	(65)	-	3,25	(130)	+	117	3,65 {4,08}	5,99 {5,02}	18,81 {21,25}	12,87	
GcMAF 100 pg/mL + DXR	40	0,20	(08)	+	1,30	(52)	+	1,55	(62)	-	3,05	(122)	+	105	4,12 {4,72}	5,38 {4,41}	23,44 {29,05}	19,11	
<i>Mwh/tm</i> ³ (BH)																			
Controle Negativo	40	0,08	(03)		0,05	(02)			0,13	(05)			5	2,60	0,26	0,39			
DXR 0,4mM	40	0,13	(05)	i	0,03	(01)	i		0,15	(06)	i		8	2,50 {2,33}	0,41 {0,15}	0,58 {0,19}			
GcMAF 25 pg/mL + DXR	40	0,08	(03)	i	0,20	(08)	+		0,28	(11)	i		11	3,00 {3,33}	0,56 {0,31}	1,13 {0,77}			
GcMAF 50 pg/mL + DXR	40	0,05	(02)	i	0,03	(01)	i		0,08	(03)	i		3	2,00 {3,50}	0,15- {0,10}	0,15- {0,29}			
GcMAF 100 pg/mL + DXR	40	0,00	(00)	+	0,00	(00)	i		0,00	(00)	+		0	{2,60}	0,00- {0,26}	- {0,39}			

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): (+), positivo; (-), negativo; (i), inconclusivo. (*m*), fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$. (MSG), mancha simples grande; (MSP), mancha simples pequena; (MG), mancha gêmea; (TM), total de mancha.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

A Tabela 3 mostra os resultados das análises dos tratamentos do GcMAF (25 pg/ml; 50 pg/ml e 100 pg/ml) associados à VD (1 mM). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), para a quantidade de manchas mutantes em comparação ao controle negativo. O total de manchas mutantes nas concentrações de 25 pg/ml, 50 pg/ml e 100 pg/ml de GcMAF associado à VD (1 mM) foram, respectivamente, 15, 25 e 15. Esses valores foram próximos ao encontrado no tratamento com etanol 5% (19 manchas). O tratamento com VD isolada (1 mM) não foi estatisticamente diferente do controle negativo, evidenciando ausência de efeito mutagênico/recombinogênico. Para a associação GcMAF (50 pg/mL) +VD (1 mM), foi utilizado o Teste *U* para retirada do valor inconclusivo relacionado ao total de manchas.

Tabela 3 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado a Vitamina D (VD) 0,1 mM.

Cruzamento ST																						
Genótipos e Concentrações	Número de Indiví- duos (N)	Manchas por indivíduo (n° de manchas) diag. Estatístico ^a												Total manc has mwh ^c (n)	Média das classes de tam. Clones <i>mhw</i> ^{c,d}	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^f		Recombinação (%)				
		MSP				MSG				MG						TM				Observado	Corrigido pelo controle	
		(1-2 cels) ^b				(>2 cels) ^b																
		m = 2				m = 5				m = 5						m = 2						
Controle Negativo	40	0,43	(17)			0,05	(02)			0,00	(00)			0,48	(19)			19	1,42	0,97	0,65	
DXR 0,4mM	40	1,68	(67)	+		2,43	(97)	+		1,5	(60)	+		5,6	(224)	+		138	3,64{4,00}	7,07{6,10}	22,11{24,39}	97,38
VD 1mM	40	0,23	(09)	-		0,03	(01)	i		0,00	(00)	i		0,25	(10)	-		09	1,78{1,10}	0,46-{0,51}	0,40-{0,27}	
GcMAF 25 pg/mL + VD	40	0,35	(14)	-		0,03	(01)	i		0,00	(00)	i		0,38	(15)	-		10	1,40{1,44}	0,51-{0,46}	0,34-{0,31}	
GcMAF 50 pg/mL + VD	40	0,48	(19)	i		0,13	(05)	i		0,03	(01)	i		0,63	(25)	- ^{U*}		20	1,95{12}	1,02{0,05}	0,99{52,46}	
GcMAF 100 pg/mL + VD	40	0,28	(11)	-		0,00	(00)	i		0,10	(04)	i		0,38	(15)	-		12	2,00{0,43}	0,61-{0,36}	0,61-{0,12}	

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): (+), positivo; (-), negativo; (i), inconclusivo. (m), fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$. (MSG), mancha simples grande; (MSP), mancha simples pequena; (MG), mancha gêmea; (TM), total de mancha.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. U*: Resultado não significativo tratado com teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon. Exclui inconclusivos para TM.

Finalmente, na Tabela 4, estão demonstrados os resultados da quantidade de manchas mutantes nos descendentes de *D. melanogaster* tratados com GcMAF nas concentrações de 25 pg/ml; 50 pg/ml e 100 pg/ml associados à DXR (0,4 mM) e à VD (1 mM). Pode-se constatar que a maior concentração de GcMAF apresentou um resultado fraco positivo, ou seja, reduziu significativamente a quantidade de manchas mutantes quando comparado à DXR, apresentando 17,67% de inibição dos eventos recombinogênicos do quimioterápico. As menores concentrações, 25pg/ml e 50 pg/ml, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) em relação ao controle positivo. Logo, na associação de GcMAF à 100pg/mL, observa-se o perfil modulador da combinação dos três compostos sobre os efeitos recombinogênicos e mutagênicos da DXR.

Tabela 4 - Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e trans-heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST), tratados com diferentes concentrações de GcMAF associado à Vitamina D (VD) e à DXR (0,4 mM).

Cruzamento ST																							
Genótipos e Concentrações	Número de Indivíduos (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. Estatístico ^a												Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Média das classes de tam. Clones <i>mhw</i> ^{c,d}	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão) ^f		Recombinação (%)	Inibição (%)				
		MSP				MSG				MG						TM				Observado	Corrigido pelo controle		
		(1-2 cels) ^b				(>2 cels) ^b																	
		m = 2				m = 5				m = 5						m = 2							
<i>mwh/flr</i> ³ (MH)																							
Controle Negativo	40	0,43	(17)		0,05	(02)		0,00	(00)		0,48	(19)		19	1,42	0,97	0,65						
DXR 0,4mM	40	1,68	(67)	+	2,43	(97)	+	1,50	(60)	+	5,60	(224)	+	138	3,64{4,00}	7,07{6,10}	22,11{24,39}	97,38					
VD 1mM	40	0,23	(09)	-	0,03	(01)	i	0,00	(00)	i	0,25	(10)	-	09	1,78{1,10}	0,46-{0,51}	0,40-{0,27}						
GcMAF 25 pg /mL+ DXR + VD	40	1,25	(50)	-	2,08	(83)	-	2,63	(105)	+	5,95	(238)	-	195	3,45{3,67}	9,99{9,02}	27,32{28,70}						
GcMAF 50 pg/mL + DXR + VD	40	1,05	(42)	+	1,85	(74)	f+	2,78	(111)	+	5,68	(227)	-	185	3,40{3,63}	9,48{8,50}	25,01{26,26}						
GcMAF 100 pg/mL + DXR + VD	40	0,60	(24)	+	1,78	(71)	f+	1,35	(54)	-	3,73	(149)	f+	125	3,51{3,89}	6,40{5,43}	18,26{20,08}	17,67					
<i>Mwh/tm</i> ³ (BH)																							
Controle Negativo	40	0,08	(03)		0,05	(02)					0,13	(05)			2,60	0,26	0,39						
DXR 0,4mM	40	0,13	(05)	i	0,03	(01)	i				0,15	(06)	i	6	2,50{2,33}	0,41{0,15}	0,58{0,19}						
GcMAF 100 pg/mL + DXR + VD	40	0,03	(01)	i	0,03	(01)	i				0,05	(02)	i	2	2,50{2,67}	0,10-{0,15}	0,14-{0,24}						

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): (+), positivo; (-), negativo; (i), inconclusivo. (m), fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=0,05$. (MSG), mancha simples grande; (MSP), mancha simples pequena; (MG), mancha gêmea; (TM), total de mancha.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

5 DISCUSSÃO

A imunoterapia é uma importante ferramenta clínica no tratamento contra o câncer, apresentando menos efeitos adversos aos pacientes quando comparada às demais estratégias terapêuticas. O seu principal mecanismo é a modulação do sistema imunológico (RILEY; JUNE; LANGER, 2019). O GcMAF tem se mostrado capaz de inibir a proliferação e, consequentemente, reduzir a capacidade metastática de células cancerosas (INUI *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014; INUI *et al.*, 2016). No presente estudo, foi investigada sua ação sobre o DNA de *D. melanogaster*, tanto isoladamente quanto combinada à DXR e VD, com o objetivo de avaliar se GcMAF possui efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos e demonstrar combinações promissoras, com outros fármacos utilizados por pacientes oncológicos. Nesse contexto, nossa pesquisa é pioneira ao esclarecer os efeitos do GcMAF em *D. melanogaster*.

O teste *SMART* é capaz de avaliar possíveis alterações no DNA decorrentes do dano direto ou indireto, por meio do tratamento com diferentes compostos. A DXR é frequentemente utilizada em testes experimentais com modelos vivos de *D. melanogaster*, como controle positivo para a indução de carcinogênese, detectada através de tumores epiteliais (NEPOMUCENO, 2015), e de mutagênese, indicada pela expressão do fenótipo mutante nos pelos na asa da mosca (ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015). Além disso, no *SMART*, a DXR pode ser avaliada em associação com outros compostos, pois considerando a importância de regimes polifarmacológicos, estudar o efeito da interação de diferentes fármacos é de grande interesse, principalmente na área oncológica (COSTA; NEPOMUCENO, 2006).

Como hipotetizado, os tratamentos com GcMAF individualmente (Tabela 1), quando comparados ao controle negativo, não apresentaram efeitos mutagênico ou recombinogênico em nenhuma das concentrações testadas, confirmando a ausência de atividade mutagênica ou recombinogênica em *D. melanogaster*. O GcMAF é naturalmente produzido pelo organismo humano, tendo como precursor a proteína Gc. Esta é encontrada no plasma sanguíneo em concentrações de 300 a 600 mg/L (HADDAD; WALGATE, 1976; KAWAKAMI *et al.*, 1981). Essa proteína está diretamente envolvida na regulação positiva do sistema imunológico, atuando na defesa primária contra infecções (SPADERA; SPADERA, 2020). Ademais, estudos apontaram que a desativação da proteína Gc pela enzima nagalase, secretada por células tumorais (YAMAMOTO; NARAPARAJU; ASBELL, 1996) e por células infectadas pelo vírus

da imunodeficiência adquirida (HIV), promove a não ativação de macrófagos e, consequentemente, imunossupressão e inflamação descontrolada (YAMAMOTO, 2006).

Na Tabela 2, GcMAF (25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml) modulou a atividade recombinogênica da DXR, com significativa redução das manchas em todas as concentrações. Observou-se uma inibição de 18,16%, 12,87% e 19,11% do efeito recombinogênico da DXR. A DXR intercala no DNA, suprime a enzima Topoisomerase II e promove a produção de radicais livres (RIVANKAR, 2014; GATTO; MOTA, 2021), o que causa danos celulares. Além disso, Xu e colaboradores (2013), demonstraram, em seu estudo, que a DXR inibe a formação de autofagolissomos, comprometendo a degradação em massa de células danificadas (XU *et al.*, 2013).

O sistema imunológico de *D. melanogaster*, modelo experimental do presente estudo, assemelha-se ao de humanos, sendo composto por um sistema imune inato, com a atividade de fagócitos, e sistema humoral, com a expressão de peptídeos antimicrobianos. Nesse sentido, sugerimos que, quando as moscas são expostas ao tratamento crônico com o GcMAF simultaneamente com DXR, pode acontecer a ativação de plasmócitos. Os plasmócitos, principais células sanguíneas (hemócitos) de *D. melanogaster*, são correspondentes aos macrófagos nos vertebrados (GOLD; BRÜCKNER, 2016). Como já descrito, o GcMAF aumenta os níveis de superóxido nas células fagocíticas humanas (YAMAMOTO; KUMASHIRO, 1993) e induz a translocação dos receptores de membrana com a consequente liberação de citocinas, secreção de enzimas lisossomais e regulação da produção de anticorpos e da fagocitose (ONO *et al.*, 1995; DAÉRON, MARC, 1997). Assim, também sugerimos que altas concentrações de GcMAF nas moscas podem atuar modulando a resposta imune através da superativação de hemócitos, fagocitando células transformadas no organismo. Assim, propomos que a ativação de plasmócitos por GcMAF, quando combinado à DXR, conduz à fagocitose das células danificadas pela DXR, evidenciando a importância de combinações farmacológicas para resultados promissores. Contudo, esses eventos necessitam ser posteriormente validados.

Já na sua associação à VD (Tabela 3), os dados não demonstraram diferença em relação ao controle para todas as concentrações, uma vez que o número total de manchas foi semelhante ao encontrado para o tratamento apenas com VD e para o controle negativo. Em comparação ao controle negativo, a VD não apresentou efeito mutagênico nem recombinogênico. Esse resultado está de acordo com dados anteriores do nosso grupo, em que a VD demonstrou

ausência de efeito mutagênico, potencial antimutagênico e anticarcinogênico quando associada à DXR (VASCONCELOS *et al.*, 2020).

A VD participa de diversas funções regulatórias no organismo, incluindo a modulação do sistema imune (TAMOKA; KIKUTA; ISHII, 2021). Logo, acredita-se que esse hormônio lipossolúvel desempenhe, também, funções regulatórias no GcMAF, uma vez que tem capacidade de aprimorar as funções de monócitos e macrófagos, influenciando genes reguladores da resposta imunológica inata (WANG *et al.*, 2004; HEWISON, 2011). Ademais, a proteína precursora do GcMAF (Gc), no seu domínio 1 N-terminal, possui sítio de ligação a metabólitos da VD. A Gc é conhecida como proteína de ligação à VD (DBP), participando do seu armazenamento e transporte (HADDAD, 1995).

Quando os três compostos foram combinados (Tabela 4), novamente, na maior concentração de GcMAF, houve significativa redução de manchas mutantes, apresentando 17,67% de inibição contra os efeitos recombinogênicos e mutagênicos da DXR. Nas menores concentrações do imunoterápico, 25 pg/ml e 50 pg/ml, os resultados não foram estaticamente significativos quando comparados ao controle positivo. Nesse estudo, era esperada a potencialização do efeito antimutagênico e/ou antirrecombinogênico da atividade do GcMAF na associação com a vitamina, pois a 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D), precursora da forma ativa da VD, é comumente ligada à proteína Gc, molécula precursora do GcMAF (YING, 2015). Além disso a VD é um pró-hormônio imunomodulador envolvido na síntese de interleucinas e na potencialização da ação de células imunes, como macrófagos (GIL *et al.*, 2018). Com isso, sugerimos que na concentração testada, 1 mM, a VD não apresentou atividade moduladora promissora sobre GcMAF e DXR.

A atividade não moduladora da VD, ao ser associada ao GcMAF e DXR, pode ser justificada pela ativação de macrófagos pró-tumorais. Sabe-se que os macrófagos podem ser subdivididos em tipo 1 (M1), capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias e fagocitar patógenos e células tumorais; e tipo 2 (M2), não citotóxicos, capazes de secretar citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, que corroboram com a proliferação celular e desenvolvimento do tumor (BONNOTTE *et al.*, 2001; LUCAS; ABRAHAM; AHARINEJAD, 2008; BLÉRIOT *et al.*, 2015). Portanto, acreditamos que em sinergismo com a VD, o GcMAF superativou macrófagos pró-tumorais, não sendo capaz de inibir os efeitos da DXR.

Ademais, em certos casos, a vitamina D pode apresentar características pró-oxidantes, o que significa que pode aumentar a atividade de agentes oxidantes, como os superóxidos gerados pela DXR (KOREN *et al.*, 2001). Com base nisso, há uma sugestão de que a

combinação da vitamina D com o GcMAF + DXR, nas concentrações de 25pg/ml e 50pg/ml, possa ter modulado aumentando a ação de recombino gênica da DXR. Além disso, Gilkel *et al.*, (2007) realizaram um estudo *in vivo* utilizando um modelo de xenoenxerto de neuroblastoma humano em camundongos, e sugeriram que a ação da vitamina D pode variar dependendo do microambiente celular, da presença de fatores de crescimento e do perfil molecular, podendo ter efeitos tanto proliferativos quanto antiproliferativos.

6 CONCLUSÃO

GcMAF apresentou efeito antimutagênico e/ou antirrecombinogênico ao ser associado à DXR, tanto na combinação GcMAF + DXR ou quando associada à VD (GcMAF + DXR + VD), especialmente na concentração de 100 pg/ml. Esses achados evidenciam seu potencial modulador contra os danos induzidos pela DXR nas células das asas de *D. melanogaster*. Ademais, quando utilizado sozinho, o GcMAF não apresentou efeitos mutagênicos ou recombino gênicos. A VD, por sua vez, não potencializou a ação do imunoterápico nas associações.

Em suma, nossos dados sugerem que a ação do GcMAF se mostra particularmente promissora quando o imunoterápico é associado a outros compostos com efeitos antitumorais. Entretanto, estudos adicionais precisam ser conduzidos a fim de melhor compreender a ação imunomoduladora do GcMAF. Além disso, faz-se necessário conhecer sobre a ação direta e indireta desse composto e suas combinações em outros modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

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

ADAMS, M. D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, vol. 287, n. 546, p. 2185-95, 24 de jun. 2000. DOI: 10.1126/science.287.5461.2185. PMID: 10731132.

AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nat Rev Cancer**, vol.7, n.11, p.834-846. DOI:10.1038/nrc2256.

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, vol. 28, n. 1. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Immune checkpoint inhibitors and their side effects**, 2022. Disponível em:< <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/immunotherapy/immune-checkpoint-inhibitors.html>>

ANDERSON, N. R. *et al.* Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy. **Cancer Research**. p. 2990. 2020. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-20-2990.

ANNE, S.; TSAO, M.D. Inibidores mitóticos. **Jornal de Oncologia Torácica**, vol. 6, n. 11. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.JTO.0000407559.84157.c6>.

BASKAR, R. *et al.* Biological response of cancer cells to radiation treatment. **Frontiers in Molecular Biosciences**. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00024>.

BINDEA, G. *et al.* Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. **Immunity**, vol. 39, n. 4, p. 782-795. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>.

BLÉRIOT, C. *et al.* Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. **Immunity**, vol. 42, n. 1, p. 145-58. 2015. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.12.020. Epub 2014 Dec 25. PMID: 25577440.

BOCKAMP, E. *et al.* Imunoterapia nano-enhanced cancer: imunology encounters nanotechnology. **Células**, vol 9, 2102. 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9092102>.

BONNOTTE, B. *et al.* Identification of Tumor-Infiltrating Macrophages as the Killers of Tumor Cells After Immunization in a Rat Model System. **J Immunol**, vol.167, n.9, p.5077–5083. 2001. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5077>

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **International journal of molecular sciences**. Vol. 22, n. 13, p. 6995. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>.

CALEFFI, M. *et al.* Sobrevivência do câncer de mama no Brasil: Qual o impacto do acesso à assistência médica nos resultados do câncer? **The Breast**, vol. 54, p. 155-159, 01 de dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2020.10.001>.

CAMPISI, J. Envelhecimento, senescência celular e câncer. **Revisão Anual de Fisiologia**, vol. 75, p. 685-705. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.

CARLBERG, C.; MUÑOZ, A. An update on vitamin D signaling and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 79, p. 217-230. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.018>.

COSTA, W. F.; NEPOMUCENO, J. C. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, vol. 1, n. 47, p. 18–24. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.20160>

CHA, H.; LEE, J. H.; PONNAZHAGAN, S. Revisitando a Imunoterapia: Um Foco no Câncer de Próstata. **Cancer Research**. vol. 80, n. 8, p.1615-1623. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2948>.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews**, vol. 5. 2005. DOI:10.1038/nrc1529.

CHAIYASIT, K.; TOSHIO, I.; WIWANITKIT, V. The use of Gc protein-derived macrophage activating factor for management of thyroid cancer. **J Cancer Res Ther**, vol. 11, n. 4, p: 1041. 2015. DOI:10.4103/0973-1482.151448

CHAJON, E. *et al.* O efeito sinérgico da radioterapia e imunoterapia: uma parceria promissora, mas não simples. **Science Direct**, vol. 11, p. 124-132. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.017>

CHRISTAKOS, S. Em busca de circuitos reguladores que controlam a atividade biológica da vitamina D. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 292, n. 42, p. 17559-17560. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.H117.806901>

COUZIN-FRANKEL, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. **Science**, vol. 342, n. 6165, p:1432-1433. 2013. DOI:10.1126/science.342.6165.1432

DARE, A. J. *et al.* Capítulo 13 Serviços Cirúrgicos para Tratamento do Câncer, vol. 3. 2015. DOI: 10.1596/978-1-4648-0349-9_ch13. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343623/>

DENG, C.; BRODIE, S. G. Roles of *BRCA1* and its interacting proteins. **BioEssays**. vol. 22, p. 728-37. 2000. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00369. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00369>.

DIETRICH, J. *et al.* Corticosteroids in brain cancer patients: benefits and pitfalls. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, vol.4, n.2, p. 233–242. 2011. DOI:10.1586/ecp.11.1

DRAKE, C. G.; JAFFEE, E.; PARDOLL, D. M. Mechanisms of immune evasion by tumors. **Adv Immunol**, vol. 90, p. 51-81. 2006. DOI:10.1016/S0065-2776(06)90002-9

DUAN Z, L. Y. Targeting macrophages in cancer immunotherapy. **Signal Transduct Target Ther**. vol. 6, n. 1, p. 127. 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00506-6. PMID: 33767177; PMCID: PMC7994399.

DUNN, B. K. *et al.* Disparidades de saúde no câncer de mama: a biologia atende ao status socioeconômico. **Breast Cancer Research and Treatment**, vol. 121, p. 281-292. 2010. DOI: 10.1007/s10549-010-0827-x

DUNN, G. P. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, vol. 3, n.11, p. 991-998. 2002. DOI:10.1038/ni1102-991

ERLICH, P. **Collected studies on immunity**. 1st ed. 1906.

FACINA, T. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 1, p. 63. 2014.

FANE, M.; WEERARATNA, A. T. Como o microambiente do envelhecimento influencia a progressão do tumor. **Nature Reviews Cancer**, vol. 20, n. 2, p. 89-106. 2020. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41568-019-0222-9>.

FATHI, N. *et al.* Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 109, p. 391-401. 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.102

FELDMAN, D. *et al.* The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat Rev Cancer**, vol. 14, n. 5, p. 342-357. 2014. DOI:10.1038/nrc3691

FERNÁNDEZ, C. G. (orgs.). **Embriologia**. 3.ed Porto Alegre: Artmed, 2012. 651 p. ISBN 9788536326207.

FERREIRA, U. *et al.* Uso e Indicações de Bloqueadores Hormonais no Câncer de Próstata. **Comitê Brasileiro de Estudos em uro-oncologia**, vol. 1. 2002. Disponível em: <<https://franciscobretas.com.br/publicacoes/CoBEU1.pdf>>

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**, vol. 334, p. 247-258. 1995. DOI: 10.1016/0165-1161(95)90018-7

FREIRE, D. Imunoterapia: a virada do sistema imunológico contra o câncer. **Cienc. Cult. São Paulo**, vol. 71, n. 4, p. 13 – 15. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602019000400006>.

FU, L. *et al.* The functions and regulation of Smurfs in cancers. **Seminars in Cancer Biology**, vol. 67, n. 2, p. 102 – 116. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.023>

FU, T. *et al.* A arquitetura espacial do microambiente imunológico orquestra a imunidade tumoral e a resposta terapêutica. **J Hematol Oncol**, vol. 14, n. 98. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01103-4>

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, vol. 4, n. 3, p. 281-286. 2005. DOI:10.2174/1568010054022024

GATTI, R. A. *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. **Lancet**, vol. 2, n. 7583, p.1366-1369. 1968. DOI: 10.1016/s0140-6736(68)92673-1

GATTO, M.; MOTA G. A. F. Influence of Doxorubicin Treatment on Heme Metabolism in Cardiomyoblasts: An In Vitro Study. **Arq Bras Cardiol**, vol, 116, n. 2, p. 323-324. 2021. DOI: 10.36660/abc.20200662.

GERBER, D. E. Terapias-alvo: uma nova geração de tratamentos contra o câncer. **Am Fam Médico**, vol. 77, n. 3, p. 311-9. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18297955/>

GIL, Á.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: classic and novel actions. **Ann Nutr Metab**. vol. 72, n. 2, p. 87-95. 2018. DOI:10.1159/000486536

GINKEL, P. R. V. *et al.* 1 alpha-Hydroxyvitamin D2 inhibits growth of human neuroblastoma. **J Neurooncol**, vol. 85, n. 3, p. 255-62. 2007. DOI:10.1007/s11060-007-9418-z. PMID: 17603751

GITA, T.; UMA, T.; STEPHEN, M. A. Bloqueio do checkpoint imunológico em neoplasias linfoides. **O Jornal FEBS**. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.13668>

GOLD, K.S.; BRÜCKNER, K. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. **Semin Immunol**, vol. 27, n. 6, p. 357-368. 2015. DOI: 10.1016/j.smim.2016.03.010.

GRAF, U. *et al.* Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat Res**. 222: 359-373. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90112-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(89)90112-2)

GRAF, U. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ Mutagen**. Vol. 6, n. 2, p.153-188. 1984. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.2860060206>

GREILBERGER, J.; HERWIG, R. Vitamin D - Deglycosylated Vitamin D Binding Protein Dimer: Positive Synergistic Effects on Recognition, Activation, Phagocytosis and Oxidative Stress on Macrophages. **Clin Lab**, vol. 66, n. 1. 2020. DOI:10.7754/Clin.Lab.2019.191121

GUIMARÃES, R. C. R. *et al.* Ações de enfermagem frente às reações a quimioterápicos em pacientes oncológicos. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, vol. 7, n. 2, p. 2440 – 2452. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2015.v7i2.2440-2552>.

HADDAD, J. G. Plasma vitamin d-binding protein (gc-globulin): multiple tasks. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 53, n. 1–6, p. 579-582. 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00104-8](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00104-8)

HADDAD, J. G.; WALGATE J. Radioimmunoassay of the binding protein for vitamin D and its metabolites in human serum: concentrations in normal subjects and patients with disorders of mineral homeostasis. **J Clin Invest**, vol. 58, n.5, p.1217-22. 1976. DOI: 10.1172/JCI108575. PMID: 1086857; PMCID: PMC333290.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discov**, vol. 12, n. 1, p. 31-46. 2022. DOI:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** **144**, vol. 144, n. 5, p. 646-74. 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. In press.

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

HSU, T. Iniciativas educativas em oncologia geriátrica - quem, por que e como? **Journal of Geriatric Oncology**, vol.7, n. 5, p. 390-396. 2016. PMID: 27567256 DOI: 10.1016/j.jgo.2016.07.013

HUANG, Z. *et al.* A vitamina D promove a sensibilidade à cisplatina do carcinoma de células escamosas oral, inibindo a ativação da via NF-κB modulada por LCN2 através de RPS3. **Morte celular e Doença**, vol.10, n. 936. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2177-x>

HUDSON, K. *et al.* The Extrinsic and Intrinsic Roles of PD-L1 and Its Receptor PD-1: Implications for Immunotherapy Treatment. **Front. Immunol**, vol.11, p.568931. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.568931>>. Acesso em: 02 de jul. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**, 6ª ed, p. 22, rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que causa o câncer?** 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cause-cancer>>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de pele não melanoma**, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>>. Acesso em: 01/03/2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Como surge o câncer**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estatísticas de câncer**, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso: 01/03/2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acesso em: 25/01/2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Radioterapia**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/radioterapia>>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Terapia Hormonal para Câncer de Mama**, 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/breast/breast-hormone-therapy-fact-sheet#what-is-hormone-therapy>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Transplante de medula óssea**, 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/transplante-de-medula-ossea>>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INSTITUTO ONCOGUIA. **O que é oncologia?** 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-que-e-oncologia/82/1/>>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Tipos de câncer**, 2019. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer/83/1/>>. Acesso em: 27 de mar. 2021.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Uso da quimioterapia no tratamento do câncer**, 2016. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia/3701/50/>>. Acesso em: 12 de maio de 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer today**, 2020. Estimated number of deaths in 2020, worldwide, both sexes, all ages. Disponível em: <encurtador.com.br/duxG0>. Acesso em: 25 de mar. 2021.

INUI, T. *et al.* Case Report: GcMAF Treatment in a Patient with Multiple Sclerosis. **Anticancer Res**, vol. 36, n. 7, p. 3771-3774. 2016.

INUI, T. *et al.* Clinical experience of integrative cancer immunotherapy with GcMAF. **Anticancer Res**, vol. 33, n. 7, p. 2917-2919. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23780980/>>

INUI, T. *et al.* Oral colostrum macrophage-activating factor for serious infection and chronic fatigue syndrome: Three Case Reports. **Anticancer Res**, vol. 35, n. 8, p. 4545-4549. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168499/>>

INUI, T. *et al.* Relato de caso: paciente com câncer de mama tratado com gcmaf, terapia sonodinâmica e terapia hormonal. **Pesquisa Anticâncer**, vol. 34, n. 8. 2013. Disponível em: <<https://ar.iarjournals.org/content/34/8/4589.long>>

INUI, T. *et al.* Case report: a non-small cell lung cancer patient treated with gcmaf, sonodynamic therapy and tumor treating fields. **Anticancer Res**, vol. 36, n.7, p.3767-70. 2016. PMID: 27354652.

IRANZO, J.; MARTINCORENA I.; KOONIN, E. V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol. 115, n. 26, p. E6010-E6019, 26 de jun. 2018. DOI: 10.1073/pnas.1803155115.

JAROSZ-BIEJ, M. *et al.* Microambiente tumoral como um “game changer” na radioterapia do câncer. **Int. J. Mol. Sci**, vol, 20, n. 3, p. 3212. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20133212>

JEON, S. M.; SHIN, E. A. Explorando o metabolismo e a função da vitamina D no câncer. **Exp Mol Med**, vol. 50, p. 1–14. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>

JOSHI, A. M. *et al.* Inibidores de Microtúbulos e Cardiotoxicidade. **Curr Oncol Rep**, vol 23, n.30. 2021. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01014-0>

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables for determining the statistical significance. **Mutat Res**, vol, 9, n. 5, p, 527-49. 1970. DOI: 10.1016/0027-5107(70)90038-2. PMID: 5424720.

KARIM, S. *et al.* Urolithin A's Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Antiapoptotic Activities Mitigate Doxorubicin-Induced Liver Injury in Wistar Rats. **Biomedicines**, vol. 11, n. 4, p. 1125. 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11041125. PMID: 37189743; PMCID: PMC10136031.

KAWAKAMI, M. *et al.* Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and Its metabolites in normal human subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 53, n. 6, p.1110–1116. 1981. DOI:10.1210/jcem-53-6-1110

KHADDOUR, K.; HANA, C. K.; MEWAWALLA, P. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. **Biblioteca Nacional de Medicina**. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536951/>

KHONG, H.; RESTIFO, N. Seleção natural de variantes tumorais na geração de fenótipos de “escape tumoral”. **Nat Immunol**. vol. 3, p. 999-1005. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1102-999>

KIM, D. W.; CHO, J. Avanços recentes em células CAR-T alogênicas. **Biomoléculas**, vol.10, n. 2, p. 263. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10020263>

KIM, M. J. *et al.* Vitamin D Receptor Expression and its Clinical Significance in Papillary Thyroid Cancer. **Technol Cancer Res Treat**, vol. 21. 2022. DOI:10.1177/15330338221089933

KISHTON, R. J.; SUKUMAR, M.; RESTIFO, N. P. Regulação metabólica da longevidade e função das células t na imunoterapia tumoral. **Cell Metabolism**, vol. 26, n. 1, p. 94-109. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.016>

KLEBANOFF, C.; ROSENBERG, S.; RESTIFO, N. Perspectivas para imunoterapia de células T de engenharia genética para cânceres sólidos. **Nat Med**, vol. 22, p. 26–36. 2016. <https://doi.org/10.1038/nm.4015>

KOGA, Y.; NARAPARAJU, V. R.; YAMAMOTO, N. Antitumor effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on ehrlich ascites tumor-bearing mice, **Proc Soc Exp Biol Med**, vol. 220, n. 1, p.20–26. 1999. DOI: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-3.x

KOREN, R. *et al.* Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. **Cancer Research**, vol.61, p.1439-1444, 2001.

KOVALEVA, O. V. *et al.* Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer. **Anal Cell Pathol (Amst)**. 2016. DOI: 10.1155/2016/9307549.

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **J Exp Med**, vol.182, n.2, p.459-465. 1995. DOI: 10.1084/jem.182.2.459

KWAK, J. H.; PAIK, J. K. Vitamin D status and gastric cancer: a cross-sectional study in koreans. **Nutrients**, vol. 12, n. 7, p. 2004. 2020. DOI:10.3390/nu12072004

LAJOUS, H. *et al.* Rethinking Alkylating(-Like) Agents for Solid Tumor Management. **Trends Pharmacol Sci**, vol. 40, n. 5, p: 342-357. 2019. DOI: 10.1016/j.tips.2019.03.003

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, vol. 2, n. 10, p. 1 – 20. 2010. DOI: 10.1101/cshperspect.a003236.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, p. 360, 2014. Ed. Artmed.

LEPPERT, W.; BUSS, T. O Papel dos Corticosteróides no Tratamento da Dor em Pacientes com Câncer. **Curr Pain Headache Rep**, vol. 16. P. 307–313. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11916-012-0273-z>.

LOPES, A.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. **J Exp Clin Cancer Res**, vol. 38, n. 1, p. 146. 2019. DOI:10.1186/s13046-019-1154-7

LUCAS, T.; ABRAHAM, D.; AHARINEJAD, S. Modulation of tumor associated macrophages in solid tumors. **Frontiers in Bioscience**, vol. 13, p.5580-5588. 2008.

LUENGO, A.; GUI, D. Y.; HEIDEN, M. G. V. Metabolismo direcionado para a terapia do câncer. **Bioquímica Celular**, vol. 24, n. 9. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.028>.

MA, Y. *et al.* O renascimento da imunidade antineoplásica da morte de células tumorais. **Immunol Rev**, vol. 280, n.1, p. 194-206. .2017. DOI: 10.1111/imr.12586.

MAHDAVI, M. *et al.* Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with *BRCA*. **Journal of Cell Physiol**. 2018. DOI: 10.1002/jcp.27464

MARCOS, R.; CARMONA, E. R. The wing-spot and the comet tests as useful assays for detecting genotoxicity in *Drosophila*. **Methods Mol Biol**, n. 2031, p. 337-348. 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-9646-9_19. PMID: 31473970.

MARTINCORENA, I. *et al.* Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. **Cell**, vol. 171, n. 5, p. 1029-1041.e21, 16 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.042.

MARTINS-TEIXEIRA, M. B.; CARVALHO, I. Antitumour anthracyclines: progress and perspectives. **ChemMedChem**, vol. 15, n. 11, p. 933-948. 2020. DOI: 10.1002/cmdc.202000131

MILLS, C. D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Crit Rev Immunol**, vol, 32, n. 6, p.463-88, 2012. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10. PMID: 23428224.

NABESHIMA, Y. *et al.* Simple method for large-scale production of macrophage activating factor GcMAF. **Sci Rep**, vol. 10, n.19122. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75571-y>

NABI, K.; LE, A. The heterogeneity of cancer Metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Edition 1, 2018.

NAGASAWA, H. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. **Anticancer research**, vol. 25, p. 3689-3696. 2005. Disponível em:< <https://ar.iijournals.org/content/anticancer/25/6A/3689.full.pdf> >

NAGY, R.; SWEET, K.; ENG, C. Síndromes de câncer hereditário altamente penetrante. **Oncogene**, vol. 23, p. 6445–6470. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (*Warts*). **Advanced Techniques in A Biology & Medicine**, vol. 3, p. 1-8. 2015.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutat Res**, vol. 386. n. 1, p. 39-67. 1997 DOI: [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(96\)00044-0](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(96)00044-0)

ONG, C. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. **Nanotoxicology**, vol. 9, n. 3, p. 396–403. 2015. DOI:10.3109/17435390.2014.940405

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**, vol. 81, p. 111-119. 2015.

PANDEY, U. B.; NICHOLS, C. D. Modelos de doenças humanas em *Drosophila melanogaster* e o papel da mosca na descoberta de medicamentos terapêuticos. **Pharmacological Reviews**, vol. 63, n. 2, p. 411-436, jun. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>.

PANIGRAHY, D. *et al.* Resolução da inflamação: um princípio organizador em biologia e medicina. **Farmacologia e Terapêutica**, vol. 227. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107879>

PENG, M.; MO, Y.; WANG, Y. Vacina de neoantígeno: uma imunoterapia tumoral emergente. **Mol Câncer**, vol. 18, n. 128. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1055-6>

POULSEN, H. E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, vol.7, n.1, p. 9-16. 1998.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, vol. 66, n.1. São Paulo, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000100011>

PRAZER, E. D. *et al.* Um catálogo abrangente de mutações somáticas de um genoma de câncer humano. **Nature**, vol. 463, n. 7278. 2010. DOI: 10.1038/nature08658.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 6. Ed. São Paulo: Elsevier, 2007. 829p.

RENDIC, S.; GUENGERICH, F. P. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. **Chem Res Toxicol**. vol.25, n. 7, p. 1316-1383. 2012. DOI: 10.1021/tx300132k

REZENDE, A.A.A. **Estudo comparativo dos efeitos moduladores da (-)- Cubebina sobre a mutagenicidade / recombino-genicidade induzida por diferentes agentes químicos**. 2012. Tese de doutorado - Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia - MG.

RILEY, R. S. *et al.* Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nat Rev Drug Discov**, vol. 18, p. 175–196. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>.

RIVOIRE, W. A. *et al.* Bases Biomoleculares da Oncogênese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 47, n. 2, p. 179-184. 2001.

ROBSON, M. E. *et al.* Atualização da declaração de política da Sociedade Americana de Oncologia Clínica: teste genético para suscetibilidade ao câncer. **Journal Of Clinical Oncology**, vol. 28, n. 5. 2010.

RUGGIERO, M. *et al.* Oleic acid, deglycosylated vitamin D-binding protein, nitric oxide: a molecular triad made lethal to cancer. **Anticancer Res**, vol. 34, n.7, p. 3569-78. 2014. PMID: 24982371.

SAAM, J. Mutações hereditárias associadas ao câncer em mulheres diagnosticadas com dois cânceres primários: uma oportunidade para identificar síndromes de câncer hereditário após o primeiro diagnóstico de câncer. **Oncologia**, vol. 88, n. 4, p. 226-233. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1159/000368836>

SADELAIN, M.; RIVIÈRE, I.; RIDDELL, S. Therapeutic T cell engineering. **Nature**, vol. 545, p. 423-431. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22395>

SCHAUE, D.; MCBRIDE, W. H. Oportunidades e desafios da radioterapia para o tratamento do câncer. **Nat Rev Clin Oncol**, vol. 12, p. 527-540. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.120>.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. Vol. 31, n. 6024, p.1565-1570. 2011. DOI:10.1126/science.1203486

SEAL, S. *et al.* Truncating mutations in the fanconi anemia gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. **Nature Genetics**, vol. 38, n. 11. 2006. DOI: 10.1038/ng1902.

SEGAL, S. L. *et al.* Genética e câncer de mama. **Revista HCPA**, vol. 21, n. 2, p. 191 – 197. 2001. DOI: 10.183/163838/000329966.

SHARMA, P. *et al.* Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. **Cell**, vol. 168, n. 4, p.707-723. 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.017

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics 2020. **CA Cancer J Clin**. vol. 70, n. 1, p. 7-30. 2020. DOI: 10.3322/caac.21590. PMID: 31912902.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Estatísticas de câncer, 2018. **CA Câncer J Clin**, vol. 68, n. 1. 2018. DOI: 10.3322/caac.21442

SILVA, G. A. *et al.* A fração do câncer atribuível aos modos de vida, infecções, ocupação e agentes ambientais no Brasil em 2020. **Plos One**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148761>.

SJÖBLOM, T. *et al.* As sequências de codificação de consenso de cânceres de mama e colorretais humanos. **Science**, vol. 314, n. 5797. 2006. DOI: 10.1126/science.1133427. Epub 2006 Set 7.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. **Conheça os principais tipos de tratamentos de câncer**, 2016. Disponível em: <<http://www.sbcancer.org.br/conheca-os-principais-tipos-de-tratamentos-de-cancer/>>. Acesso em: 18 de jun. 2021.

SPADERA, S.; SPADERA, M. Potential role of GcMAF in suppressing the severity of COVID-19-induced immune responses: lesson learned from HIV. **Medical Hypotheses**, vol. 144. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110293>

SULLIVAN, R. *et al.* Cirurgia de câncer global: oferecendo cirurgia de câncer segura, acessível e oportuna. **Lancet Oncol**, vol. 16, n. 11, p. 1193-224. 2015. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00223-5.

TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico. **Rev. Latinoam. Psicopatol. Fundam**, vol. 10, n. 4, p. 664 – 676. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47142007000400008>.

THYER, L. *et al.* A novel role for a major component of the vitamin D Axis: vitamin D binding protein-derived macrophage activating factor induces human breast cancer cell apoptosis through stimulation of macrophages. **Nutrients**, vol. 5, n.7, p. 2577–2589. 2013. DOI: 10.3390/nu5072577

THYER, L. *et al.* GC protein-derived macrophage-activating factor decreases α -N-acetylgalactosaminidase levels in advanced cancer patients. **Oncoimmunology**, vol. 2, n. 8, p. e25769. 2013. DOI:10.4161/onci.25769

TOMOKA, A. O.; KIKUTA, J.; ISHII, M. The effects of vitamin D on immune system and inflammatory diseases. **Biomolecules**, vol. 11, n. 11, p. 1624. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11111624>

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer incidence and mortality rates and trends--an update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, vol. 25, n. 1, p. 16-27. 2016. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578

TOULANY, M. *et al.* Visando vias de reparo de quebra de fita dupla de DNA para melhorar a resposta à radioterapia. **Genes**, vol. 10, n. 1, p. 25. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10010025>

TRIPKOVIC, L. *et al.* Comparação da suplementação de vitamina D₂ e vitamina D₃ na elevação do soro 25 -status de hidroxivitamina D: uma revisão sistemática e meta-análise. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 96, n. 6, p. 1357-1364. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.031070>.

TRUMP, D. L.; ARAGON-CHING, J. B. Vitamin D in prostate cancer. **Asian J Androl**, vol. 20, n. 3, p.244-252. 2018. DOI:10.4103/aja.aja_14_18

UTO, Y. *et al.* GcMAF: our next-generation immunotherapy. **Inui Immunotherapy Clinic**. 2012. Disponível em:< <https://jeffreydachmd.com/wp-content/uploads/2013/06/nature-outlook-saisei-mirai-gcmf.pdf>>

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrófagos: desenvolvimento e especialização em tecidos. **Revisão Anual de Imunologia**, vol. 33, p. 643-675. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. **Food Chem Toxicol**, vol. 143, n. 111549. 2020. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111549

VAZ, S. C.; VILELA, C. R.; CARVALHO, A. B. Two new species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) associated with inflorescences of *Goeppertia monophylla* (Marantaceae) in the city of São Paulo, state of São Paulo, Brazil. **Brazilian entomology review**, vol. 52, n. 2, p. 159-168. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2018.03.003>

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Genes do câncer e os caminhos que eles controlam. **Nat Med**, vol. 10, n. 8. 2004. DOI:10.1038/nm1087.

WAGNER, S.; MULLINS, C. S.; LINNEBACHER, M. Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. **World J Gastroenterol**, vol. 24, n. 48, p. 5418-5432. 2018. DOI:10.3748/wjg.v24.i48.5418

WANG, T. T. *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **J Immunol**, vol. 173, n. 5, p. 2909-2912. 2004

WARD, L. S. Entendendo o processo Molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol. 46, n. 4. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000400006>.

WILLIAMS, D. R.; MOHAMMED, S. A.; SHIELS, A. E. Compreendendo e abordando efetivamente o câncer de mama em mulheres afro-americanas: descompactando o contexto social. **Câncer**, vol. 122, n. 14, p. 2138-2149. 2016. DOI: 10.1002/cncr.29935

XU, L. *et al.* Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. **Drug Discovery Today**, vol. 18, n. 11-12, p. 592-600. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.12.013>.

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. USA**, vol. 88, p. 8539-8543. 1991. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.88.19.8539>>

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**, vol. 151, n. 5, p. 2794-2802. 1993. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/151/5/2794.short>.

YAMAMOTO, N.; NARAPARAJU, V. R.; ASBELL, S. O. Deglycosylation of serum vitamin d3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. **Cancer Res**, vol. 56, n. 12, p.2827–2831. 1996. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/56/12/2827/502416/Deglycosylation-of-Serum-Vitamin-D3-binding>

YAMAMOTO, N. Pathogenic significance of α -N-Acetylgalactosaminidase activity found in the envelope glycoprotein gp160 of human immunodeficiency virus type 1 AIDS. **Research and Human Retroviruses**, vol. 22, n. 3, p.262–271. DOI: 10.1089/aid.2006.22.262

YANG, Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to fight cancer. **J Clin Invest**. vol. 125, n. 9, p.3335-3337. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI83871> .

YU, X. *et al.* Vitamina D aumenta a radiosensibilidade do câncer colorretal revertendo a transição epitelial-mesenquimal. **Frente. Célula Dev. Biol.** 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.684855>

ZEICHNER, S. B. *et al.* Improved Clinical Outcomes Associated With Vitamin D Supplementation During Adjuvant Chemotherapy in Patients With HER2+ Nonmetastatic Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, vol. 15, n.1, p. e1–e11. 2015. DOI: 10.1016/j.clbc.2014.08.001

ZHANG, Z. *et al.* Neoantigen: a new breakthrough in tumor immunotherapy. **Front Immunol**, vol. 12, n. 672356. 2021.DOI:10.3389/fimmu.2021.672356