

Avaliação da atividade carcinogênica do hidroximetilbutirato de cálcio por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

*Evaluation of the carcinogenic activity of calcium hydroxymethylbutyrate using the
Epithelial Tumor Test (ETT) in somatic cells of Drosophila melanogaster*

CHRYSTIAN SILVA PEREIRA

Discente de Medicina (UNIPAM)

chrystianpereira@unipam.edu.br

MARYELLE DE OLIVEIRA FERREIRA

Discente de Medicina (UNIPAM)

maryelleferreira@unipam.edu.br

PAULA MARYNELLA ALVES PEREIRA LIMA

Professora orientadora (UNIPAM)

paulamp@unipam.edu.br

KARINA ALVARENGA RIBEIRO

Professora coorientadora (UNIPAM)

karinaalvarenga@unipam.edu.br

Resumo: O câncer é uma doença relacionada ao crescimento desordenado de células que afeta a fisiologia do organismo. Durante seu tratamento, são amplamente utilizados suplementos vitamínicos, como hidroximetilbutirato de cálcio (Ca-HMB), com intuito de prevenir sarcopenia e melhorar a qualidade de vida do paciente, já que auxilia na síntese proteica e na diminuição da quebra de proteínas. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito carcinogênico do Ca-HMB e sua modulação sobre a doxorrubicina, por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens de *wts*/TM3 com machos *mwh*/*mwh*. As larvas portadoras do genótipo *wts*/+*mhw* foram tratadas com diferentes concentrações de Ca-HMB (16 mg/mL e 31 mg/mL) isolado e associado a doxorrubicina (0,4 mM). As moscas que emergiram foram analisadas quanto à presença ou à ausência de tumores em todos os segmentos do corpo. O Ca-HMB apresentou ausência de aumento na frequência tumoral nas concentrações testadas com o composto isolado indicando a ausência de efeito carcinogênico, porém, em associação a doxorrubicina (DOX), observou-se efeito modulador, confirmando seu efeito modulador sobre o efeito genotóxico da DOX. São sugeridos ensaios moleculares para validar os resultados encontrados.

Palavras chave: câncer; doxorrubicina; *Drosophila melanogaster*; hidroximetilbutirato de cálcio.

Abstract: Cancer is a disease related to the uncontrolled growth of cells that affects the physiology of the organism. During cancer treatment, vitamin supplements, such as calcium hydroxymethylbutyrate (Ca-HMB), are widely used to prevent sarcopenia and improve patients' quality of life, since they assist in protein synthesis and reduce protein breakdown. This study aimed to evaluate the carcinogenic effect of Ca-HMB and its modulation of doxorubicin by means of the epithelial tumor test (ETT) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. A cross was performed between virgin *wts/TM3* females and *mwh/mwh* males. Larvae carrying the *wts+/+mwh* genotype were treated with different concentrations of Ca-HMB (16 mg/mL and 31 mg/mL), both alone and in association with doxorubicin (0.4 mM). The emerged flies were analyzed for the presence or absence of tumors in all body segments. Ca-HMB did not increase tumor frequency at the tested concentrations when administered alone, indicating the absence of a carcinogenic effect. However, when associated with doxorubicin (DOX), a modulatory effect was observed, confirming its modulation of the genotoxic effect of DOX. Molecular assays are suggested to validate the findings.

Keywords: cancer; doxorubicin; *Drosophila melanogaster*; calcium hydroxymethylbutyrate.

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a todas as doenças que possuem em comum o crescimento desordenado das células. Fisiologicamente as células se dividem em harmonia, possuindo fatores intrínsecos que permitem ou cessam a replicação, como hormônios e fatores de crescimento. Porém, quando ocorre danos no material genético, a célula pode não responder adequadamente a esses estímulos, passando a propagar uma informação errônea constantemente. Essas alterações podem ser oriundas de herança genética, na qual a pessoa herda algum alelo mutado, ou também da exposição diária a agentes cancerígenos, o que aumenta a chance de desenvolver o câncer. Apesar de ser multifatorial, mais de 50% dos casos estão relacionados aos hábitos de vida.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as neoplasias possuem maior prevalência nas regiões industrializadas em decorrência da mudança no estilo de vida da população, com pouca mobilidade, dieta ocidentalizada e exposição acentuada aos agentes danosos de natureza física, química e biológica. Já em relação à taxa de mortalidade, é maior nas áreas de menor índice de desenvolvimento humano (IDH). A maioria dessas regiões não possuem acesso facilitado aos serviços de saúde, o que impossibilita um diagnóstico precoce e, conseqüentemente, menor sobrevida (Santos *et al.*, 2023).

Uma das principais estratégias terapêuticas empregada no tratamento do câncer é a quimioterapia, no entanto debilita os pacientes. Os quimioterápicos utilizados contra a maioria dos tipos de tumores carecem de especificidade, alvejam células saudáveis, o que causa muitos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, diarreia e alopecia (Wakiuchi *et al.*, 2019).

Sabe-se que indivíduos em tratamentos oncológicos normalmente fazem suplementação de vitaminas, proteínas e minerais para melhorar a qualidade de vida, já que eles possuem maior dificuldade na absorção dos nutrientes (ARENDS *et al.*, 2017). Além dos pacientes oncológicos, pessoas que passam por outros tipos de tratamentos

imunossupressores e os idosos também fazem uso dessas estratégias, com intuito de diminuir as consequências do declínio fisiológico (Moura *et al.*, 2021).

Pode-se observar uma mudança na dinâmica demográfica no Brasil. É crescente o envelhecimento populacional, a maior prevalência de câncer, e, consequentemente, a sarcopenia, que é basicamente a perda gradual de massa muscular esquelética e diminuição da força muscular. Nesse cenário, o hidroximetilbutirato de cálcio (Ca-HMB) tem obtido grande destaque, como recurso terapêutico em pacientes sarcopênicos (Santo *et al.*, 2022; Karelis *et al.*, 2015).

Todavia, mesmo que a sarcopenia seja uma modificação significativa em pessoas com câncer e idosos, vale ressaltar que pode afligir pessoas de qualquer idade por sua etiologia multifatorial (Santo *et al.*, 2022). Com o intuito de potencializar o desempenho, no meio esportivo também tem crescido a utilização do Ca-HMB por atletas e esportistas como suplementação alimentar, já que ele auxilia de forma considerável na síntese proteica e na diminuição da quebra de proteínas, promovendo aumento de massa magra e força muscular (Laty *et al.*, 2020; Zanchi *et al.*, 2009).

Os estudos sobre o Ca-HMB são escassos quanto à sua ação carcinogênica ou de seu efeito modulador quando usado em associação com outros fármacos. Dessa forma, por ser um produto que interfere na dinâmica proteica de células, é de grande relevância novas pesquisas sobre seu potencial efeito cancerígeno, bem como seu efeito associado a quimioterápicos de referência.

2 METODOLOGIA

2.1 AGENTES QUÍMICOS

2.1.1 Doxorrubicina

As antraciclinas (ANT) são antibacterianos citostáticos que agem por meio da inibição da topoisomerase II (Menna *et al.*, 2012). O fármaco mais conhecido desse grupo é a doxorrubicina (DOX), utilizada no tratamento de neoplasias hematológicas e sólidas (Moura *et al.*, 2015). A DOX foi isolada a partir de culturas do fungo *Streptomyces peucetius*, variante *caesius*, e tem sido aplicada na terapia oncológica desde a década de 1960 (YANG *et al.*, 2014). A regressão tumoral é considerável no uso isolado da DOX e muito maior quando associada a outros agentes antineoplásicos. Entretanto, sua aplicação clínica é restrita por causa de sua cardiotoxicidade e chance de promover resistência ao fármaco (Moura *et al.*, 2015).

A DOX tem alta afinidade pelo núcleo da célula, onde se encontram 60% do quimioterápico intracelular. Para atingir o propósito como quimioterápico, as ANT se intercalam com o DNA, provocando a quebra dos filamentos único e duplo, além da troca das cromátides irmãs, interrompendo a multiplicação celular.

Para o controle positivo, foi usado neste trabalho a DOX, pois em *D. melanogaster* tem efeito carcinogênico na concentração de 0,4 mM (Bontempo; Orsolin, 2021; Nepomuceno, 2015).

2.1.2 Hidroximetilbutirato de cálcio

O Mtor® é um medicamento composto por hidroximetilbutirato de cálcio. O número de CAS 135236-72-5. É fabricado e distribuído por EUROFARMA LABORATÓRIOS S. A., localizado na Rod. Pres. Castello Branco, km 35,6, Itapevi, São Paulo, CNPJ: 61.190.096/0008-69, indústria brasileira. Cada porção de 3,7g (3 comprimidos), contém 2,3g de hidroximetilbutirato de cálcio (MTOR®, 2023).

O Ca-HMB é um metabólito de cadeia ramificada do aminoácido L-Leucina, produzido no fígado e células musculares através da transaminação da alfa-cetoisocaproato (KIC), neste caso, necessitando de fontes exógenas e endógenas deste aminoácido para sua produção (Manjarrez *et al.*, 2015). Esse processo de transaminação da leucina em ácido alfa-cetoisocaproico (KIC) acontece no citoplasma das células musculares e nas mitocôndrias. No fígado, passa por oxidação irreversível para síntese dos substratos energéticos acetoacetato e acetil Co-A. Entretanto, tanto no músculo quanto no fígado, alguns KIC são metabolizados via KIC-dioxigenase para gerar β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB). Em camundongos, o Ca-HMB induz a regulação positiva de mTOR, p70S6K1, 4EBP1 e um aumento na produção de proteínas de miotubos murinos C2C12. Também demonstra uma habilidade de inibir a proteólise muscular regulado por ubiquitina-proteassoma, e interrupção da apoptose mionuclear por antagonismo à caspases (Eley *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2018).

2.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1.1 Teste de Tumores Epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

A *D. melanogaster* é famosa popularmente como mosca da fruta. É amplamente usada nas pesquisas em genética, como modelos *in vivo* em diversos testes, permitindo até mesmo o estudo de doenças humanas. O uso desse organismo em pesquisa é vantajoso, tendo em vista seu pequeno tamanho, em média 4mm de comprimento, seu curto ciclo de vida, que é aproximadamente 26 dias, seu dimorfismo sexual, seu grande potencial reprodutivo, além de sua quantidade menor de cromossomos e genoma reduzido quando comparado ao de camundongos e humanos (Gomes, 2001; Goulart *et al.*, 2022; Rocha *et al.*, 2013).

O teste de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster* é usado para avaliar a atividade carcinogênica, tanto de substâncias puras, quanto de complexas. Nesse modelo de teste, diversas substâncias podem ser avaliadas, como medicamentos, extratos naturais de plantas, partículas aéreas, comida, entre outros (Silva, 2011).

A manutenção evolutiva de genes supressores de tumor entre *D. melanogaster* e mamíferos, como exemplo o gene *Wts* em *Drosophila*, homólogo ao *LATS1* (*Large tumor suppressor kinase 1*) existente nos humanos, tem motivado pesquisas e testes de indução de tumores em *D. melanogaster*; nesse caso, tem potencial colaborativo direto para a compreensão da carcinogenicidade de agentes físicos e químicos (Bontempo; Orsolin, 2021; Eeken *et al.*, 2002; Nepomuceno, 2015).

Caso haja deleção desse gene, acontece o desenvolvimento de clones de células circulares, de aparência verrugosa, que se manifestam por todo o corpo da mosca

(Nishiyama *et al.*, 1999). O marcador *Wts* é uma mutação recessiva e mortal quando em homozigose nos zigotos. Devido a essa letalidade, o alelo *Warts* é conservado na linhagem estoque com a participação de um balanceador cromossômico (TM3). Através do cruzamento entre as linhagens *wts*/TM3 e *multiple wing hairs (mwh/mhw)*, são obtidas larvas heterozigotas (*wts*/+). Se ocorrer a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, surgirão clones homozigotos. Os clones são possíveis em grupos de células isoladas da larva e se apresentam como tumores nesses insetos adultos (Bontempo; Orsolin, 2021; Eeken *et al.*, 2002).

Os estoques foram cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) e mantidos em frascos de ¼ de litro contendo o meio de cultura da *D. melanogaster* com 820 mL de água; 25 g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*); 11 g de ágar; 156 g de banana e 1 g de nipagin. A temperatura foi mantida em 25 °C e umidade a 60% (Bontempo; Orsolin, 2021; Santos; Silva; Orsolin, 2019).

2.1.2 Cruzamentos

Para execução deste trabalho, foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens de *wts*/TM3, Sb1 com machos *mwh/mwh*. Em seguida, os ovos dos descendentes dessa cópula foram colocados em até 8 horas. Depois, foram recolhidas as larvas oriundas da eclosão dos ovos com suporte de uma peneira de malha fina, que foi lavada com água de osmose reversa. Larvas de 3º estágio foram expostas a terapia crônica por cerca de 48 horas. Nesse momento, essas larvas estiveram mantidas em frascos de vidro, contendo 1,5 g de purê de batatas, acrescido de 5 mL de Ca-HMB nas concentrações 16 mg/mL e 31 mg/mL isoladas e associadas a DOX 0,4 mM. Também foram incluídos os controles positivos (DOX, 0,4 mM) e controle (água de osmose reversa). Ao final da metamorfose, as moscas foram coletadas e conservadas em etanol (C₂H₆O) 70% para posterior avaliação.

As moscas portadoras do genótipo *wts*/+*mhw* foram isoladas e diferenciadas pela presença de pelos selvagens fenotípicos (longos e finos). As moscas adultas, que exibirem pelos curtos e grossos, foram eliminadas, uma vez que não possuem o gene em estudo.

A análise foi feita com utilização de lupa estereoscópica, placa escavada e glicerina (C₃H₈O₃) e foi baseada na contagem de tumores. Os resultados foram tabulados em um diagrama padrão indicando a quantidade de tumores detectados em variados segmentos das moscas, como cabeça, olhos, corpo, asas, pernas e halteres.

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumor das concentrações testadas e os controles (positivo e negativo) foram calculadas usando o teste U, não paramétrico, de Mann-Whitney, aplicando o nível de significância <0,05.

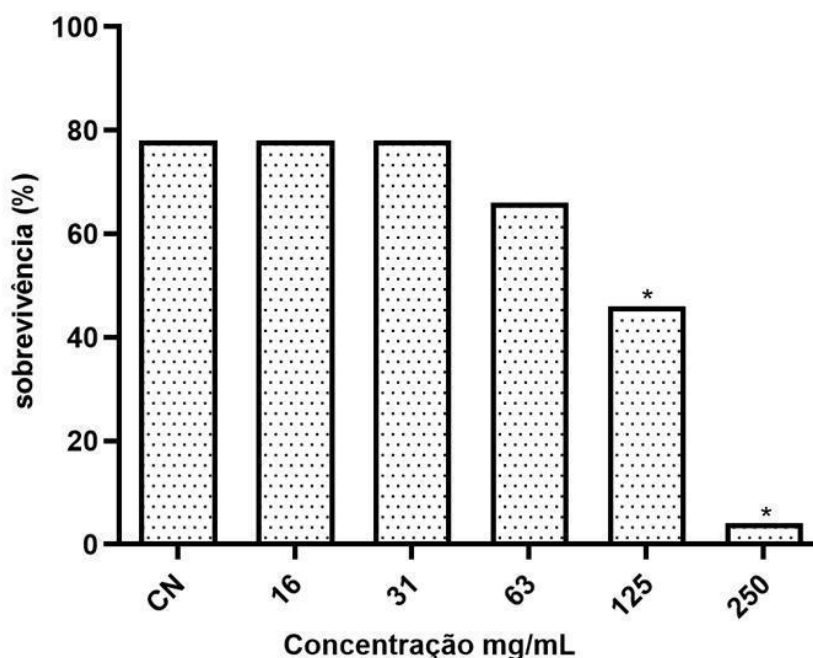
Previamente foi avaliada a toxicidade do Ca-HMB por meio do teste de toxicidade, no qual 50 larvas heterozigotas foram tratadas com cinco concentrações diferentes de Ca-HMB a 16 mg/mL, 31 mg/mL, 62 mg/mL, 125 mg/mL e 250 mg/mL. Também foi feito o controle negativo com água de osmose reversa. As moscas que eclodiram foram coletadas e contadas. A diferença estatística entre o controle e as concentrações se deu por meio do teste qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

A partir do teste de toxicidade foram escolhidas as concentrações que foram usadas no ETT.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos experimentais, se faz necessária a avaliação da toxicidade de xenobióticos, com o objetivo de observar se o composto é tóxico para o organismo analisado e definir concentrações em que toxicidade não seja um viés no resultado apresentado, conforme sugerido e orientado por diretrizes de agências regulatórias como a Food and Drug Administration (FDA, 2007). Por meio do Gráfico 1, foi possível verificar a curva de toxicidade do composto estudado, Ca-HMB. Observa-se que as concentrações de 125 mg/ml e 250 mg/ml foram consideradas estatisticamente tóxicas quando comparado ao controle negativo (CN), devido à baixa taxa de sobrevivência dos indivíduos até a fase adulta. As demais concentrações, de 16 mg/ml, 31 mg/ml e 63 mg/ml, apresentaram percentual de sobrevivência acima de 70% e não foram tóxicas para as larvas de *D. melanogaster*. Dessa forma, adotou-se para o seguimento experimental as doses de 16 mg/mL e 31 mg/ml por serem subtóxicas, com grau de sobrevivência das amostras próximas de 80%.

Gráfico 1: Taxa de sobrevivência de larvas expostas ao controle negativo (água osmose reversa), ao controle positivo (Doxorrubicina) a 0,4 mM e do Ca-HMB a 16 mg/mL, 31 mg/mL, 62 mg/mL, 125 mg/mL e 250 mg/mL. Diferença estatística comparada por meio do teste qui-quadrado, com nível de significância de 5%.



*Doses estatisticamente tóxicas.

O Ca-HMB não apresentou citotoxicidade às células de mamíferos, por meio do teste de aberração cromossômica com exposição de curto prazo nas concentrações de 0,313 mM, 0,625 mM, 1,25 mM e 2,5 mM de Ca-HMB expostos em longo prazo (Pitchford; Fuller; Rathmacher, 2018). Além disso, em animais, não apresentou intoxicação aguda a 2000mg/kg de peso corporal, conforme preconizado por protocolos toxicológicos internacionais (Fuller, Rathmacher, 2022). Em seres humanos, na administração de Ca-HMB, não foram observados marcadores de danos hepáticos, renais ou hematológicos, para um consumo de até 6 g de Ca-HMB por dia (Gallagher *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000).

Em um trabalho, foi avaliada a toxicidade do Ca-HMB para ratos tratados durante 90 dias. Não foram identificados efeitos adversos associados ao Ca-HMB quanto a sinais clínicos, peso corporal, ingesta alimentar, parâmetros de bioquímica clínica, hematologia, peso de órgãos ou análises teciduais, mesmo com consumo de até 5% na dieta, estabelecendo níveis sem efeito adverso observado (NOAEL) de 3,49 e 4,16 g·kg PC⁻¹ · d⁻¹ em ratos machos e fêmeas, respectivamente, o que corresponde a uma dosagem de 30 gramas (g) por dia para um humano de 70 quilos (Baxter *et al.*, 2005).

De forma similar, outro estudo com a mesma duração, utilizando a forma ácida livre do HMB (HMBFA), não evidenciou alterações toxicologicamente relevantes em níveis de ingestão de até 4%, que correspondeu à maior concentração avaliada na ração; o NOAEL era de pelo menos 2,48 e 2,83 g kg·PC⁻¹ d⁻¹ em machos e fêmeas, respectivamente, equivalente a dosagens humanas próximas de 28 e 32 g/dia para homens e mulheres, respectivamente (Fuller *et al.*, 2014). Esses achados justificam nossos resultados, uma vez que encontramos concentrações subtóxicas de Ca-HMB em *D. melanogaster*.

Na Quadro 1, é possível observar as frequências de tumores nos diversos segmentos corporais das moscas, tanto nas tratadas com os controles positivo e negativo, quanto nas concentrações de Ca-HMB de 16 mg/ml e 31 mg/ml isoladas e em associação com DOX.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARCINOGENICA DO HIDROXIMETILBUTIRATO DE CÁLCIO
POR MEIO DO TESTE DE TUMORES EPITELIAIS (ETT) EM CÉLULAS SOMÁTICAS
DE *Drosophila melanogaster*

Quadro 1: Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *Wts*, tratadas com Ca-HMB isolado ou em associação com doxorubicina (DOX, 0,4 mM).

Concentração		Número de moscas	Número de tumores analisados							Frequência
Ca-HMB (mg/mL)	DOX (mg/mL)		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halter	Total	
0	0	50	0	2	3	5	1	1	12	0,24
0	0,4	50	0	5	34	19	8	3	69	1,38
16	0,4	50	1	2	5	11	3	1	22	0,44
16	0	50	0	8	2	6	0	0	16	0,32
31	0,4	50	1	0	2	13	2	0	18	0,36*
31	0,0	50	1	7	7	8	1	1	25	0,50*

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

*Valor estatisticamente diferente do controle positivo (DOX, 0,4 mM)

Fonte: dados da pesquisa, 2023

Como controle negativo, foi empregada água de osmose reversa, observando-se uma frequência de 0,24 tumores por mosca. Essa baixa incidência pode ser atribuída à ocorrência espontânea devido à predisposição do organismo teste (Bontempo; Orsolin, 2021; Vasconcelos; Orsolin; Oliveira, 2020). Por sua vez, o controle positivo, com 0,4 mM de DOX, resultou em 1,38 tumores por mosca, valor estatisticamente diferente do controle negativo. Esse resultado indica que a linhagem apresenta resposta à indução de tumores, como demonstrado em artigos prévios que utilizaram a mesma dosagem deste composto (Bontempo; Orsolin, 2021; Vasconcelos; Orsolin; Oliveira, 2020).

A ação inibidora da DOX sobre a topoisomerase II é parecida com outras drogas intercalantes de DNA. Essa enzima é relevante no transcurso de replicação do DNA. Devido a esses mecanismos, a DOX tem potencial mutagênico e carcinogênico (Forrest *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2015;). Em *D. melanogaster*, a DOX provoca lesões no DNA que sofrem reparação em grande parte por meio de recombinação homóloga. A perda de heterozigose é causada pelos eventos mutagênicos e acarreta a expressão de clones de tumores epiteliais (Agnolotto; Saffi, 2006; Lehmann *et al.*, 2003).

Nas moscas que foram submetidas somente ao Ca-HMB, nas concentrações de 16 mg/ml e 31 mg/ml, houve frequência respectiva de 0,32 e 0,50 tumores por mosca. Esse resultado demonstra que o Ca-HMB, em comparação ao controle negativo, não apresentou aumento na frequência de tumores ($p > 0,05$), indicando ausência de efeito carcinogênico do Ca-HMB nas duas concentrações avaliadas em *D. melanogaster*. Esses achados são consistentes com os da literatura, que descreve que o Ca-HMB não induz danos genéticos ou interfere em mecanismos de controle do ciclo celular. Tal efeito pode ser explicado pelo seu modo de ação. O composto atua principalmente na modulação do metabolismo proteico, promovendo a ativação da via mTOR e a inibição do sistema ubiquitina-proteassoma, contribuindo para o equilíbrio entre síntese e degradação de proteínas (Wilson *et al.*, 2013). Além disso, estudos indicam que o composto pode exercer efeitos citoprotetores, incluindo a estabilização da membrana celular e a atenuação do estresse oxidativo, fatores diretamente relacionados à preservação da integridade do DNA (Holecek, 2017).

Quando associado a DOX, o Ca-HMB reduziu a frequência tumoral para 0,44 e 0,36 nas concentrações de 16 mg/mL e 31 mg/mL, respectivamente, valores significativamente inferiores ao controle positivo com DOX isolada (1,38). Esse efeito modulador mostrou-se dose-dependente, sugerindo que o Ca-HMB atenua os danos genotóxicos provocados pela DOX. O mecanismo envolve não apenas a manutenção do equilíbrio proteico, mas também a redução do estresse oxidativo induzido pela DOX e a preservação da integridade da membrana celular, diminuindo a vulnerabilidade das células à citotoxicidade da DOX (Fuller *et al.*, 2011; Holecek, 2017). Dessa forma, o Ca-HMB demonstrou potencial protetor e modulador, evidenciando sua capacidade de proteger o DNA das células saudáveis sobre ação do agente genotóxico (DOX) sem comprometer a sobrevivência celular.

A ação anticarcinogênica do HMB, conforme um estudo com camundongos (Coleman *et al.*, 2021), pode ser explicada pelo fato de que ele é capaz de remodelar o microambiente pró-tumorigênico, especialmente em condições associadas à obesidade, e que, quando utilizado em sinergia com terapias anti-PD1, estimula a polarização de macrófagos para o fenótipo M1 (antitumorais). Uma vez que macrófagos do tipo M2, de

caráter imunossupressor, favorecem o crescimento tumoral por diferentes mecanismos, essa polarização sugere que o HMB pode desencadear reprogramação metabólica dessas células.

Além disso, o HMB atua como antagonista da sinalização inflamatória mediada por NF- κ B em miotubos *in vitro* e no músculo *in vivo*, resultando em aumento do tamanho das fibras musculares e supressão de vias inflamatórias. A sinalização de TNF- α via NF- κ B exerce papel pleiotrópico na resposta à imunoterapia. No tecido muscular, a ativação de NF- κ B está relacionada à atrofia, decorrente do aumento da degradação proteica, enquanto sua inibição contribui para prevenir a atrofia muscular provocada pelo câncer (Coleman *et al.*, 2021).

4 CONCLUSÃO

A avaliação do potencial carcinogênico do Ca-HMB, por meio do Teste de Tumores Epiteliais em *Drosophila melanogaster* (ETT), demonstrou ausência de aumento na frequência tumoral nas concentrações testadas com o composto isolado, não sendo carcinogênico. Em associação com a doxorrubicina (DOX), observou-se efeito modulador, evidenciado pela redução gradual da frequência de tumores com o aumento da dose de Ca-HMB. Esses achados sugerem um possível efeito anticarcinogênico do Ca-HMB, possivelmente relacionado à modulação do microambiente tumoral e à atividade sobre processos inflamatórios, apesar de não serem eventos diretamente avaliados aqui, em contraste com a ação da DOX, conhecida por induzir danos ao DNA e perda de heterozigose do gene *Wts*. Assim, o estudo aponta um potencial efeito citoprotetor do Ca-HMB, destacando, contudo, a necessidade de investigações adicionais com diferentes modelos experimentais e concentrações para confirmação desses efeitos.

REFERÊNCIAS

- AGNOLETTI, M. H.; SAFFI, J. **Estudo de lesões e reparo de DNA em pacientes com câncer de mama e em fibroblastos humanos**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Rio Grande do Sul. 2006.
- ARENDS, J. *et al.* ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, Scotland, v. 36, 11-48, 2017.DOI:10.1016/j.clnu.2016.07.015.
- BAXTER, J. H. *et al.* Dietary toxicity of calcium β -hydroxy- β -methyl butyrate (CaHMB). **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 12, p. 1731-1741, 2005.
- BONTEMPO, N. J.; ORSOLIN, P. C. Efeito modulador do Previcox® sobre a ação carcinogênica da doxorrubicina por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 20, n. 2, p. 269-276, 2021.

COLEMAN, M. F.; LIU, K. A.; PFEIL, A. J.; ETIGUNTA, S. K.; TANG, X.; FABELA, S.; LASHINGER, L. M.; CUI, Z.; HURSTING, S. D. β -hydroxy- β -methylbutyrate supplementation promotes antitumor immunity in an obesity responsive mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancers**, v. 13, n. 24, p. 6359, 2021. DOI: 10.3390/cancers13246359. PMID: 34944981. PMCID: PMC8699071.

SANTO, I. C. do E.; MACEDO, R. R.; SILVA, T. M.; CRUZ GUIMARÃES, T. R.; CALAZANS, R.M. Efeitos da suplementação com hidroximetilbutirato na sarcopenia em idosos sem exercício físico: revisão sistemática da literatura. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 46, n. supl. 1, p. 100-114, 2022.

EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VAN VEEN, B. L.; PASTINK, A.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v.40, p. 277-282, 2002.

ELEY, H. L.; RUSSELL S. T.; BAXTER, J. H.; MUKERJI, P.; TISDALE, M. J. Signaling pathways initiated by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**, 2007.

FORREST, R. A.; SWIFT, L. P.; REPHAELI, A.; NUDELMAN, A.; KIMURA, K.; PHILIPS, D. R.; CUTTS, S. M. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 12, p. 1602-1612, 2012.

FULLER, J. C.; RATHMACHER, J. A. Acute dose toxicity evaluation of the food supplement calcium 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) in female Sprague Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 130, p. 105133, 2022. DOI: 10.1016/j.yrtph.2022.105133.

FULLER, J. C. *et al.* Safety profile of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 9, p. 2359-2365, 2011.

GALLAGHER, P. M. *et al.* β -hydroxy- β -methylbutyrate ingestion, Part II: effects on hematology, hepatic and renal function. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n. 12, p. 2116-2119, 2000.

GOMES, R. A. P. L. **Protocolo de Utilização de *Drosophila* em genética**. Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2001. Disponível em: <http://ordembilogos.pt/wp-content/uploads/2015/11/Drosophila-01Jan01.pdf>.

GOULART, A. S.; CAVALHEIRO KIELING, K. M.; VIÇOSA, C. S. C.L.; SALGUEIRO, A. C.F.; FOLMER, V. Ensino de Ciências a partir da problematização: percepções de educandos acerca do ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e31411225694-e31411225694, 2022.

HOLECEK, M. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation and skeletal muscle in healthy and muscle-wasting conditions. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Hoboken, v. 8, n. 4, p. 529-541, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Ações de Enfermagem para o controle do câncer**: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro, 2008. 624 p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2022. 160 p.

KARELIS A. D., MESSIER V., SUPPÈRE C., BRIAD P., RABASA-Lhoret R. Effect of cysteine-rich whey protein (immunocal®) supplementation in combination with resistance training on muscle strength and lean body mass in non-frail elderly subjects: a randomized, double-blind controlled study. **J Nutr Health Aging**, 19(5):53-6, 2015.

LATY, B. C.; CAMPOS, C. V. de; BENNEMANN, G. D.; CAMILO, F. Propriedades funcionais e terapêuticas do beta-hidroxi beta-metilbutirato (HMB): uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i3.2422.

LEHMANN, M; FRANCO, A; VILAR, K. S. P; REDULLY, M. L; ANDRADE, H. H.R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research-Genetic Toxicology**, n. 539, p. 167-175, 2003.

MANJARREZ, M. O. R. *et al.* El β hidroxi- β -metilbutirato (HMB) como suplemento nutricional (I): metabolismo y toxicidade. **Nutrición Hospitalaria**, 2015.

MENNA, P.; PAZ, O. G.; CHELLO, M.; COVINO, E.; SALVATORELLI, E.; MINOTTI, G. Expert Opinion on Drug Safety. **Anthracycline cardiotoxicity**, v. 11, n. S1, p. S21-S36, maio 2012.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Experimentação Animal/Artigos**, v. 60, n. 2, p.33-36, 2008.

MOURA, G. V.; SOUSA, M. C.; SOUSA, P.; LIMA, C. H. R. Uso de suplementos alimentares no manejo nutricional em idosos com Sarcopenia. **Saúde.Com**, v. 17, n. 3, p. 2355-2362, 27 set. 2021. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/Edições UESB.

MOURA, R. L.; VIEGAS, A. A.; NASCIUTTI, P. R.; CARVALHO, R. O. A.; MOURA, V. M. B. D. de. Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina: patogenia, diagnóstico e terapias antioxidantes. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.

MTOR®. [Bula]. Itapevi, São Paulo. EUROFARMA LABORATÓRIOS S. A.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 3, 2015.

NISHIYAMA, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts supressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Lett.**, Amsterdam, v. 459, p. 159-165, 1999.

NISSEN, S.; SHARP, R. L.; PANTON, L. *et al.* β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 1937-1945, 2000. DOI: 10.1093/jn/130.8.1937.

PITCHFORD, L. M., FULLER, J. C., RATHMACHER, J. A. Genotoxicity assessment of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. **Regul Toxicol Pharmacol**, 100:68-71, 2018. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.10.016.

ROCHA, L. D. L. S.; FARIA, J. C. N. M.; CRUZ, A. H. S.; REIS, A. A. S.; SANTOS, R. S. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de genética. **Scire Salutis**, 3(1), 37-48. 2013.

SANTOS, M. de O.; LIMA, F. C. da S. de; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M. de; CANCELA, M. de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. e-213700, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700.

SANTOS, J. C. dos; SILVA, S. C.; ORSOLIN, P. C. Efeito modulador da Ritalina® (metilfenidato) sobre a ação carcinogênica da doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 207-211, 2019. DOI: 10.23925/1984-4840.2018v20i4a5.

SILVA, R. G. Efeito modulador do ômega-3 sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia. Pós Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia. 2011.

U. S. Food and Drug Administration (FDA). **Princípios toxicológicos para a avaliação da segurança de ingredientes alimentares: Redbook 2000**. Capítulo IV.C.1: Testes de curto prazo para toxicidade genética – orientações para a indústria e outras partes interessadas. 2007.

VASCONCELOS, M. A.; ORSOLIN, P. C.; OLIVEIRA, V. C. Modulating effect of vitamin D3 on the mutagenicity and carcinogenicity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster* and in silico studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, p. 111549, 2020.

WAKIUCHI, J. W.; MARCON, S. S.; OLIVEIRA, D. C.; SALES, C. A. A quimioterapia sob a ótica da pessoa com câncer: uma análise estrutural. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 28, 2019.

WILKINSON, D. J. *et al.* Impact of the calcium form of β -hydroxy- β -methylbutyrate upon human skeletal muscle protein metabolism. **Clinical Nutrition**, 2018. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.09.024

WILSON, J. M. *et al.* Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: a review. **Amino Acids**, Vienna, v. 45, n. 2, p. 271–284, 2013.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.

ZANCHI, N. E.; NICASTRO, H.; GUALANO, B.; COSTA, A.S.; LANCHA JUNIOR, A.H. Suplementação de HMB: relevância clínica e mecanismos de ação. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, 2009.