

# Avaliação do efeito carcinogênico do Nifedipino em *Drosophila melanogaster*

*Evaluation of the carcinogenic effect of Nifedipine on Drosophila melanogaster*

LUCAS BARONE DA ROCHA

Discente do curso de Medicina - UNIPAM  
E-mail: lucasbaronedarocha@hotmail.com

NATANE MIQUELANTE

Discente do curso de Medicina - UNIPAM  
E-mail: nana\_miquelante@hotmail.com

PRISCILA CAPELARI ORSOLIN

Professora coorientadora - UNIPAM  
E-mail: priscilaco@unipam.edu.br

BETHÂNIA CRISTHINE DE ARAÚJO

Professora orientadora - UNIPAM  
E-mail: bethania@unipam.edu.br

---

**Resumo:** A carcinogênese pode ocorrer de forma espontânea e ser provocada por agentes carcinogênicos, como medicamentos. Para tratamento da hipertensão arterial sistêmica, uma das opções é o uso de bloqueadores dos canais de cálcio, como o Nifedipino. O uso prolongado desses medicamentos tem relação com o desenvolvimento de câncer de mama. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito carcinogênico do Nifedipino em *Drosophila melanogaster*, por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais. O Nifedipino foi utilizado isoladamente, nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL, no tratamento de larvas de 72 horas de *D. melanogaster* resultantes do cruzamento entre fêmeas *wts/TM3, Sb<sup>1</sup>* com machos *mwh/mwh*. Nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL do Nifedipino, houve aumento significativo nas frequências de tumores quando comparadas ao controle negativo. Por isso, é possível concluir que o Nifedipino apresentou efeito carcinogênico em *D. melanogaster*, nas condições experimentais testadas.

**Palavras-chave:** Bloqueadores dos canais de cálcio. Carcinogenicidade. *Drosophila melanogaster*. Nifedipino.

**Abstract:** A carcinogen can occur spontaneously and can also be caused by carcinogens such as medicines. One way to treat systemic arterial hypertension is to use calcium channel blockers such as nifedipine. Prolonged use of these drugs has been associated with the development of breast cancer. The present study aimed to evaluate the carcinogenic effect of nifedipine in *Drosophila melanogaster*. For this, we use the clone detection assay of epithelial tumors. Nifedipine was used at doses of 0.5; 1.0 and 2.0 mg / mL without treatment of 72-h *D. melanogaster* larvae used to cross *wts/TM3, Sb<sup>1</sup>* females with *mwh/mwh* males. At doses of 1.0 and 2.0 mg / mL, there was no significant increase in tumor incidence compared to the negative control. Therefore, it can

be concluded that, under the experimental conditions tested, nifedipine has a carcinogenic effect on *D. melanogaster*.

**Keywords:** Calcium channel blockers. Nifedipine. *Drosophila Melanogaster*. Carcinogenicity tests.

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O ciclo celular possui como principal função garantir que o DNA seja duplicado de forma exata para que ocorra a multiplicação celular. Esse ciclo é controlado pelos *checkpoints*, que, de forma criteriosa, protegem as células em cada fase do ciclo, bloqueando defeitos e impedindo que eles sejam repassados para as células filhas (CRUZ, 2010). Além dos mecanismos moleculares necessários para a integração e desenvolvimento do ciclo celular, são necessários alguns genes, como ativadores da proliferação celular (proto-oncogenes); genes responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais quando alterados (oncogenes); genes de reparo do DNA, responsáveis pelo reparo do DNA ou pela apoptose; e os inibidores da proliferação celular (genes supressores de tumor), que produzem fatores (proteínas) que inibem o processo de proliferação da célula (BRASILEIRO FILHO, 2016).

Quando ocorre o processo de mutação ou ativação anormal dos genes controladores do ciclo celular, inicia-se o surgimento de uma célula tumoral (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). A carcinogênese pode ocorrer de forma espontânea (por meio de mutações transmitidas por células germinativas ou adquiridas nos tecidos somáticos) e ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos), que podem promover alterações mutagênicas e epigenéticas nas células (FEET-CONTE; SALLES, 2002).

A exposição a determinadas substâncias, incluindo o uso de alguns medicamentos, pode resultar em um descontrole do ciclo celular, elevando o risco de mutações (DÜSMAN *et al.*, 2012). Dessa forma, o uso de medicamentos deve ser cuidadosamente controlado e baseado em evidências, principalmente quando não se têm estudos suficientes em relação aos efeitos a longo prazo. Isso vale no caso dos anti-hipertensivos, como o Nifedipino.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é decorrente de um conjunto de fatores de risco, como obesidade, tabagismo e etilismo. Já a fisiopatologia é dependente de um aumento da resistência vascular periférica ou do débito cardíaco, resultando no aumento da pressão arterial (GOLAN *et al.*, 2014). O tratamento da HAS visa diminuir os efeitos da doença em órgãos-alvo, sendo que a primeira conduta terapêutica é a mudança de estilo de vida. Porém, as terapias não farmacológicas, na maioria das vezes, não produzem redução suficiente da pressão arterial, sendo necessário lançar mão da terapia farmacológica, a qual envolve um extenso arsenal de medicamentos, dentre eles, o Nifedipino, um bloqueador dos canais de cálcio que faz a modulação do tônus do músculo liso vascular (RANG *et al.*, 2016).

Os antagonistas dos canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), também denominados bloqueadores da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , exercem seus efeitos por meio de sua ligação com a subunidade  $\alpha_1$  dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem (canais de tipo L ou lentos), reduzindo o fluxo

de  $\text{Ca}^{2+}$  através do canal, constituindo assim um importante determinante do tônus vascular e da contratilidade cardíaca (HILAL-DANDAN; BRUTON, 2015).

Os principais fármacos bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizadas clinicamente são: Diidropiridinas (p. ex., Nifedipino, Anlodipina e Felodipina), Benzotiazepinas (p. ex., Diltiazem) e as Fenilalquilaminas (p. ex., Verapamil). Todos esses bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L diminuem a resistência vascular coronariana e podem levar a um aumento no fluxo sanguíneo coronariano, porém cada um deles exerce efeitos farmacológicos distintos. Esses medicamentos são utilizados no tratamento da hipertensão, de certas arritmias cardíacas e algumas formas de angina (RANG *et al.*, 2016). Dentre os antagonistas dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , as Diidropiridinas são vasodilatadores mais potentes, produzindo um grau significativamente maior de vasodilatação arterial. Em contrapartida, exercem relativamente pouco efeito sobre o tecido cardíaco (GOLAN *et al.*, 2014).

O Nifedipino, por exemplo, dilata as artérias coronárias, especialmente os vasos de grande calibre. Além disso, reduz o tônus da musculatura lisa vascular nas artérias coronárias e evita vasoespasmos. O resultado final é o aumento do fluxo sanguíneo pós-estenótico e aumento da demanda de oxigênio. Paralelamente a isso, o Nifedipino diminui a necessidade de oxigênio com a redução da pós-carga (ADALAT® RETARD, 2016).

O uso prolongado de medicamentos bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ter relação significativa com o desenvolvimento de câncer de mama, porém estudos entre essa associação apresentaram resultados ainda pouco consistentes (LI *et al.*, 2014). Dessa forma, o presente trabalho torna-se relevante, já que visa avaliar a possível ação carcinogênica do Nifedipino em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, esta pesquisa foi efetuada utilizando o ensaio para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster*, um modelo biológico adequado para o desenvolvimento de pesquisas genéticas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 AGENTES QUÍMICOS

#### 2.1.1 Nifedipino

O Nifedipino possui apresentação de 10 e 20 mg e contém: Nifedipino equivalente de 10 e 20 mg respectivamente. Excipientes: hipromelose, lactose, polietilenoglicol, estearato de magnésio, amido, celulose microcristalina, polissorbato, óxido de ferro e dióxido de titânio. Esse composto é disponibilizado em caixas contendo 20, 30 ou 60 comprimidos. O medicamento deve ser conservado ao abrigo da luz, protegido da umidade excessiva, na sua embalagem original, em temperatura ambiente (entre 15° e 30°C) (ADALAT® RETARD, 2016).

No presente estudo, foi utilizado o Nifedipino 10mg, com o número CAS: 21829- 25-4, produzido pelo laboratório Neo Química, do lote LB17L0581, com data de fabricação de novembro de 2017 e data de validade de novembro de 2020. As concentrações utilizadas no experimento (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL) foram baseadas no estudo

desenvolvido por Oliveira (2015), desenvolvido, também, testando anti-hipertensivos em *D. melanogaster*.

### 2.1.2 Cloridrato de Doxorrubicina

A Doxorrubicina (DXR) está envolvida em reações de oxidação/redução, produzindo radicais livres altamente reativos e altamente tóxicos. Células tratadas com esse medicamento têm manifestado alterações nas características morfológicas associadas à apoptose, o que pode ser um dos seus mecanismos de ação (DOXORRUBICINA, 2013). Ela deve ser conservada em temperatura ambiente (entre 15 e 30°C), protegida da luz (ADRIBLASTINA®, 2013).

O cloridrato de Doxorrubicina foi o composto utilizado como controle positivo na presente pesquisa, pois possui atividade genotóxica e carcinogênica comprovada em *D. melanogaster* (ORSOLIN; OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012). Foi utilizado na concentração de 0,4 mM, preparado a partir da adição de 0,03538g de Adriblastina® em 50 mL de água osmose reversa ultra pura autoclavada.

Esse medicamento, com o número CAS: 23214-92-8, é produzido pelo laboratório Pfizer na forma de ampola, contendo 50mg, do lote 8PL5045, com data de fabricação de abril de 2018 e data de validade de março de 2022. O medicamento é armazenado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) em temperatura ambiente, protegido da luz, respeitando as orientações do fabricante.

## 2.2 TESTE PARA DETECÇÃO DE TUMORES EPITELIAIS (ETT) EM *D. melanogaster*

### 2.2.1 Linhagens

Para realização do teste ETT, foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*), portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-03), respectivamente. Foram mantidas no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Foram acondicionadas em frascos de vidro contendo o meio de cultura próprio para *D. melanogaster*, conservadas em incubadora à temperatura de 25°C e umidade de 60% (aproximadamente), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

### 2.2.2 Cruzamento

Larvas heterozigotas *wts+/+mwh* de 72 horas foram obtidas a partir do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb<sup>1</sup>* com machos *mwh/mwh*. Para o acasalamento, foram colocadas em frascos contendo meio de cultura próprio à base de fermento biológico fresco. Posteriormente, as moscas foram transferidas para frascos de postura, em base sólida de ágar e uma camada de fermento suplementado com sacarose. A postura dos ovos resultantes desse cruzamento ocorreu durante um período de aproximadamente 8 horas. Desse cruzamento, todas as larvas descendentes foram

tratadas com Nifedipino, em concentrações isoladas e os respectivos controles positivo (DXR) e negativo (água osmose reversa ultra pura autoclavada).

### 2.2.3 Tratamento das larvas

Após a postura, as larvas de 72 horas resultantes do cruzamento foram lavadas com água destilada e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina, sendo, então, tratadas com 5 mL de DXR (controle positivo), água osmose reversa (controle negativo) e com Nifedipino em três diferentes concentrações isoladas (0,5; 1,0 e 2,0mg/mL).

Realizado o procedimento experimental, os tubos de ensaio contendo meio alternativo de purê de batatas foram vedados e mantidos na incubadora por aproximadamente 7 dias, período necessário para a metamorfose das larvas em moscas adultas. As moscas adultas foram transferidas para outros recipientes contendo etanol 70%, devidamente identificados. Posteriormente, foram colocadas individualmente em placas escavadas contendo glicerina. Os machos e as fêmeas que apresentavam fenótipos de pelo longo e fino (ausência do balanceador cromossômico *TM3*, *Sb<sup>1</sup>* e presença do gene *wts*) foram analisados quanto à presença de tumores epiteliais nos diferentes segmentos do corpo.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores observadas nas três concentrações testadas de Nifedipino e os controles, positivo e negativo, foram calculadas por meio do teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise dos indivíduos, foi possível verificar as frequências de tumores observadas nos diferentes segmentos da *D. melanogaster* tratadas com Nifedipino, além do controle positivo e negativo (Tabela 1). A análise de tumores observada nos indivíduos tratados no controle negativo mostra uma frequência de 0,75 tumor/mosca, que, segundo Alves e Nepomuceno (2012), ocorre devido à predisposição genética intrínseca à *D. melanogaster* (ocorrência aleatória). Já nos indivíduos tratados com o controle positivo, é possível notar uma frequência de 2,26 tumores por mosca. A DXR tem seu uso como controle positivo, pois atua na interação com a molécula de DNA, que interfere na divisão celular e na produção de radicais tóxicos. Provavelmente esses mesmos mecanismos estão relacionados com a transformação de uma célula normal para uma célula maligna (ALMEIDA *et al.*, 2005). O Teste de Mann-Whitney demonstrou significativa diferença entre o controle positivo e controle negativo ( $p < 0,05$ ), confirmando a formação de tumores, nas linhagens utilizadas, a partir da indução por DXR.

As larvas que foram submetidas ao tratamento com Nifedipino isolado nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL apresentaram frequências tumorais de 0,54; 1,18 e 1,73, respectivamente. Não houve diferença significativa nas frequências de tumores na

concentração de 0,5 mg/mL quando comparada ao controle negativo (água osmose reversa), como mostra a Tabela 1. No entanto, o Nifedipino, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL, apresentou um aumento estatisticamente significativo na frequência tumoral quando comparado ao controle negativo. Tais resultados evidenciam efeito carcinogênico do Nifedipino em *D. melanogaster*.

**Tabela 1:** Frequência de clones de tumores observados em *D. melanogaster*, heterozigotas para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com diferentes concentrações de Nifedipino (NFDP)

Tratamentos		Número de moscas analisadas	Número de tumores analisados						Total	Frequência (Nº de tumores /mosca)
NFDP (mg/mL)	DXR (mM)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter		
0	0	150	0	37	5	53	13	5	113	0,75
0	0,4	150	6	71	55	174	19	14	339	2,26
0,5	0	150	0	25	12	36	5	3	81	0,54
1,0	0	150	0	21	6	147	3	1	178	1,18*
2,0	0	150	0	16	11	225	7	1	260	1,73*

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

\* Valor considerado diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ). NFDP, Nifedipino. DXR, doxorubicina.

Fonte: dados da pesquisa, 2021.

Os anti-hipertensivos são as classes de medicamentos mais prescritas no mundo. Nos Estados Unidos, o número de prescrições das classes betabloqueadores, diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio e bloqueadores dos receptores de angiotensina foi alarmante (CHRISTOPHER *et al.*, 2013). Dessa forma, é indispensável o conhecimento acerca dos efeitos (benéficos ou maléficos) dessa classe de medicamentos nos seres humanos.

Os resultados obtidos na presente pesquisa evidenciam o efeito carcinogênico do Nifedipino, nessas condições experimentais, e ratificam resultados obtidos em outros estudos envolvendo organismos e testes experimentais diferentes. Li e colaboradores (2003), ao fazerem um estudo caso controle com mulheres em idade entre 65 e 79 anos, afirmam que algumas classes específicas de anti-hipertensivos, incluindo os bloqueadores de canais de cálcio de liberação imediata, podem aumentar o risco de adenocarcinoma de mama em mulheres pós menopausa.

Pahor *et al.* (1996) realizaram um estudo coorte prospectivo, comparando pessoas com 71 anos ou mais que tomaram bloqueadores dos canais de cálcio com os outros participantes, e obtiveram como resultados que a frequência, da maioria dos tipos de câncer, em pacientes que faziam uso dos bloqueadores dos canais de cálcio, foi maior do que nos demais. Além disso, os resultados foram dose-dependentes, corroborando os resultados encontrados nesta pesquisa, pois foi evidenciado que, quanto maior a concentração do medicamento, maior foi a frequência de tumores comparada ao controle negativo.

Os bloqueadores dos canais de cálcio inibem a apoptose celular em vários modelos experimentais e seu uso em longo prazo (em doses terapêuticas) está associado

a um maior risco de câncer por suprimirem a atividade gênica (PAHOR *et al.*, 1996). Em uma metanálise realizada por Li *et al.* (2014), a partir de 17 estudos observacionais, foi encontrada associação entre o uso de bloqueadores dos canais de cálcio, principalmente o Nifedipino, e o risco de câncer de mama, sendo sustentada a hipótese por evidências laboratoriais. Ademais, os referidos autores afirmam que é possível que o tecido mamário seja mais vulnerável a alterações apoptóticas que os demais tecidos humanos.

Embora o resultado do presente trabalho constate o resultado de outras pesquisas, é importante ressaltar que os mecanismos pelos quais os bloqueadores dos canais de cálcio inibem a apoptose não foram diretamente estudados.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Nifedipino, por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster* (ETT), aumentou significativamente a frequência de tumores nas concentrações isoladas. Isso demonstra seu efeito carcinogênico em relação ao controle negativo. No entanto, ressalta-se a necessidade de novos estudos, com amostras maiores e diferentes metodologias, para melhor conhecimento da ação carcinogênica dessa substância.

#### REFERÊNCIAS

ADALAT® RETARD: comprimidos. Farmacêutica responsável: Dra Dirce Eiko Mimura. São Paulo. Bayer Farmacêutica Ltda., 2016. **Bula de Remédio.**

ADRIPLASTINA®: frasco-ampola. Responsável técnico: José Cláudio Bumerad. Fabricado por: Actavis Italy S.p.A. Nerviano, Milão e registrado, importado e distribuído por Laboratórios Pfizer Ltda. Guarulhos (SP), 2013. **Bula de remédio.**

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVES E. M., NEPOMUCENO J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do Avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p. 125-140, 2012.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: Patologia. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

CHRISTOPHER, I. *et al.* Use of Antihypertensive Medications and Breast Cancer Risk Among Women Aged 55 to 74 Years. **JAMA Internal Medicine**, [S. l.], v. 173, n. 17, p. 1629-1637, sep. 2013.

CRUZ, A. T. **Componentes do ciclo celular ao longo da gênese do melanoma e seus possíveis reguladores**. 2010. 144 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2010.

DOXORRUBICINA: frasco-ampola. Responsável técnico: Luciana Righetto. Fabricado por: Laboratórios IMA S.A.I.C. Ciudad de Buenos Aires - Pcia. de Buenos Aires – Argentina. Embalado por: Glenmark Generics S.A. – Pilar, Parque Industrial – Buenos Aires, Argentina. Importado por: Glenmark Farmacêutica Ltda., 2013. **Bula de Remédio**.

DÜSMAN, E. *et al.* The main mutagens and carcinogens agents of human exposure. **Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 66-81, ago. 2012.

FEET-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemater.**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.

GOLAN, D. E. *et al.* **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2. ed. AMGH, 2015.

LI, C. I. *et al.* Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65-79 years. **Cancer**, [S. l.], v. 98, n. 7, p. 1504-1513, oct. 2003.

LI, W. *et al.* Calcium channel blockers and risk of breast cancer: a meta-analysis of 17 observational studies. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 17-29, 2014.

OLIVEIRA, R. G. S. **Análise do efeito mutagênico e recombinogênico de diferentes fármacos anti-hipertensivos em células somáticas de *D. melanogaster***. 2015. 91 p. Dissertação (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Genética e Bioquímica, Uberlândia, 2015.

ORSOLIN, P. C.; OLIVEIRA, R. G. S.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of Orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 50, p. 2598-2604, 2012.

PAHOR, M. *et al.* Calcium-Channel Blockers and Incidence of cancer in aged populations. **Lancet**, London, v. 348, n. 9026, p. 493-497, aug. 1996.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 625-633, Santa Maria, 2004.