

Avaliação do efeito carcinogênico do sulfato de hidroxicloroquina em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of the carcinogenic effect of hydroxychloroquine sulfate in Drosophila melanogaster

PEDRO EDUARDO PEREIRA ASSUNÇÃO

Discente de Medicina (UNIPAM)
E-mail: pedroepa@unipam.edu.br

VITOR HUGO OLIVEIRA

Discente de Medicina (UNIPAM)
E-mail: vitorho@unipam.edu.br

BETHÂNIA CRISTHINE DE ARAÚJO

Professora coorientadora (UNIPAM)
E-mail: bethania@unipam.edu.br

PRISCILA CAPELARI ORSOLIN

Professora orientadora (UNIPAM)
E-mail: priscilaco@unipam.edu.br

Resumo: A hidroxicloroquina é utilizada no tratamento da malária, doenças reumáticas e dermatológicas. Estudos recentes exploraram sua possível eficácia contra a covid-19, resultando em sua utilização para essa finalidade, embora com grau de recomendação C, devido à falta de evidências robustas para sua indicação. A literatura sobre os efeitos adversos da hidroxicloroquina é limitada, motivando este estudo a investigar seu potencial carcinogênico por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. Para validar o experimento, a água de osmose reversa foi empregada como controle negativo e a doxorubicina como controle positivo. As moscas foram expostas a diferentes concentrações do fármaco: 1, 2, 4, 8 e 16 mM. A frequência tumoral foi calculada para comparar as concentrações do teste com os controles. Os resultados revelaram que a hidroxicloroquina induziu a formação de tumores em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: hidroxicloroquina; neoplasias epiteliais; teste de carcinogenicidade.

Abstract: Hydroxychloroquine is used in the treatment of malaria, rheumatic diseases, and dermatological conditions. Recent studies have explored its potential efficacy against covid-19, resulting in its use for this purpose, albeit with a grade C recommendation due to the lack of robust evidence for its indication. The literature on the adverse effects of hydroxychloroquine is limited, prompting this study to investigate its potential carcinogenicity through the epithelial tumor test (ETT) in *Drosophila melanogaster*. To validate the experiment, reverse osmosis water was used as the negative control and doxorubicin as the positive control. Flies were exposed to different concentrations of the drug: 1, 2, 4, 8, and 16 mM. Tumor frequency was calculated to compare test concentrations with controls. The results revealed that hydroxychloroquine induced tumor formation at all tested concentrations.

Keywords: hydroxychloroquine; epithelial neoplasms; carcinogenicity test.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O câncer representa uma das principais causas de morte globalmente e acarreta impactos econômicos significativos e crescentes (OPAS, 2020). Sua característica principal é a presença de anormalidades teciduais, caracterizadas por um crescimento celular descontrolado e quase independente, persistindo de maneira exacerbada mesmo após o fim dos estímulos, resultando na formação de células cancerosas (INCA, 2020).

Nesse cenário, os proto-oncogenes, que são genes normais responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no controle da proliferação celular normal, quando sofrem mutações, transformam-se em oncogenes, desencadeando uma proliferação celular excessiva e desregulada. Essas alterações ocorrem através da amplificação gênica, rearranjo cromossômico e superexpressão gênica (Rodrigues, 2016). Paralelamente, outra categoria fundamental na regulação do ciclo celular são os genes supressores de tumor, os quais exercem uma influência negativa sobre o crescimento tumoral ao promoverem a apoptose. Assim, quando sujeitos a mutações, perdem sua capacidade de inibir o desenvolvimento de tumores, permitindo a perpetuação do crescimento celular neoplásico e, conseqüentemente, do câncer (Morin *et al.*, 2015).

A carcinogênese, processo central na formação de células tumorais, é dividida em três estágios distintos: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio tem início com a mutação dos genes responsáveis pela codificação de proteínas reguladoras do ciclo celular, seja de forma aleatória ou em resposta a estímulos carcinogênicos, como xenobióticos mutagênicos. Em seguida, durante a fase de promoção, observam-se alterações como a multiplicação celular descontrolada e a incapacidade de reparo de células defeituosas, resultando no acúmulo de erros genéticos (Allgayer, 2018). Por fim, a fase de progressão é caracterizada pela perda do controle replicativo, culminando na consolidação do genótipo maligno (INCA, 2020).

O composto hidroxicloroquina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da malária, apresentando também resultados terapêuticos positivos em doenças reumáticas e dermatológicas, como lúpus e artrite reumatoide. Pertencente à família dos compostos 4-aminoquinolina, possui diversas ações farmacológicas, incluindo a inibição da formação de prostaglandinas, o aumento da atividade de células do sistema imunológico e interferência em atividades enzimáticas. Este composto é caracterizado por uma rápida absorção e pode se acumular em determinados órgãos por períodos prolongados (Sulfato de Hidroxicloroquina, 2018; Katzung; Vanderah, 2023).

Diante da emergência global causada pela pandemia do novo coronavírus e da significativa disseminação e morbidade associadas à COVID-19, o sulfato de hidroxicloroquina emergiu como uma possível opção terapêutica, conforme evidenciado por diversos estudos realizados na época (Colson; Rolain; Raoult, 2020; Oliveira; Pinto, 2020). A justificativa para o uso desse fármaco residia na sua suposta capacidade de bloquear a infecção viral, promovendo um aumento do pH endossômico e interferindo na glicosilação de células receptoras do SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2020). No entanto, apesar dos resultados iniciais promissores, alguns estudos indicaram a necessidade de

cautela na sua recomendação para uso rotineiro, dada a ausência de dados consistentes que respaldassem sua eficácia (Imoto *et al.*, 2020). Portanto, é imprescindível a realização de testes adicionais para assegurar a segurança e eficácia desse medicamento, especialmente considerando seus possíveis efeitos na homeostasia do ciclo celular.

Uma ferramenta amplamente utilizada na avaliação da segurança de substâncias, como fármacos, e no estudo de possíveis agentes danosos ao DNA é o teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. Esse método fundamenta-se na análise de fenótipos malignos e tem sido empregado para investigar os efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos de diversas substâncias químicas (Allgayer, 2018).

A *D. melanogaster*, conhecida como “mosca das frutas”, compartilha considerável homologia genética com os genes humanos. Além disso, apresenta vantagens como modelo experimental devido à sua alta prolificidade, ciclo reprodutivo curto, baixo custo e facilidade de manipulação em laboratório (Das *et al.*, 2015; Allgayer, 2018). Portanto, a análise dos efeitos da hidroxicloroquina por meio do ETT torna-se de grande importância para a ciência.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial carcinogênico do sulfato de hidroxicloroquina por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2 METODOLOGIA

2.1 AGENTES QUÍMICOS

2.1.1 Sulfato de hidroxicloroquina

O sulfato de hidroxicloroquina ($C_{18}H_{26}ClN_3O \cdot H_2SO_4$), CAS 747-36-4, é registrado, fabricado e embalado pela EMS S/A, distribuído em embalagens contendo 10, 20, 30, 60, 100 (fracionável) ou 200 (hospitalar) unidades. Está disponível com a posologia de 400 mg de sulfato de hidroxicloroquina, equivalente a 309,6mg de hidroxicloroquina base (Sulfato de hidroxicloroquina, 2018). No presente trabalho, foi utilizado o lote 3J9569, fabricado em 03/2023 e válido até 03/2025. Foram testadas cinco diferentes concentrações de sulfato de hidroxicloroquina, definidas com base no estudo de Davis *et al.* (2020), sendo elas: 1, 2, 4, 8 e 16 mM.

2.1.2 Doxorrubicina

O quimioterápico cloridrato de doxorrubicina (DOX), CAS 23214-92-8, foi utilizado como agente indutor de tumor e controle positivo. Tal escolha se deve a sua comprovada ação carcinogênica, atuando por meio de lesões na fita dupla de DNA e/ou inibição de enzimas responsáveis pelo reparo genético, como a DNA topoisomerase (Lullmann; Mohr; Hein, 2016). O composto foi administrado na concentração de 0,4mM. Esse medicamento é produzido pelo laboratório Libbs, com o nome comercial de Fauldoxo®, e apresentado em solução injetável com 50mg de cloridrato de

doxorrubicina em cada frasco ampola (25mL) (Fauldoxo®, 2017). A droga usada no estudo corresponde ao lote 1147130, com fabricação em 03/2022 e validade até 03/2024.

2.2 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

2.2.1 Linhagem estoque e cruzamentos

No teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) são utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*, *wts* e *multiplique wing hairs (mwh)*. Os estoques dessas linhagens são mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagenese (LABCIM) do Centro Universitário de Patos de Minas/UNIPAM, Patos de Minas/MG, Brasil. As moscas ficam armazenadas em frascos com meio de cultura próprio composto por 820mL de água, 25g de fermento biológico, 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin. Os estoques são mantidos em uma incubadora (modelo B.O.D.411 D) a temperatura de 25°C e aproximadamente 60% de umidade, com fotoperíodo controlado (12 horas de claro e 12 horas de escuro).

Para a formação de larvas heterozigotas (*wts +/+ mwh*), de 72 horas, foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* com machos *mwh/mwh* e a coleta de ovos dos descendentes ocorreu durante um período de, aproximadamente, 8 horas.

2.2.2 Procedimento experimental e análise das moscas

Decorridas 72 horas, as larvas resultantes do cruzamento descrito no tópico anterior foram coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5g de purê de batatas e 5mL das substâncias teste: sulfato de hidroxiclороquina (em cinco concentrações isoladas: 1, 2, 4, 8 e 16 mM) e os respectivos controles positivo (DXR 0,4mM) e, negativo (água de osmose reversa, ultrapura).

Após a metamorfose das larvas, as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo etanol 70%. Em seguida, foram colocadas em placas escavadas, contendo glicerina, para a sua avaliação. Para isso, foram separadas quanto aos fenótipos, pois apenas moscas portadoras de pelos finos e longos apresentam o gene *wts* e manifestam verrugas e, portanto, apenas essas moscas foram analisadas. Moscas com o fenótipo de pelos curtos e grossos foram descartadas. Para análise utilizou-se lupas estereoscópicas e pinças entomológicas.

2.2.3 Análise estatística

Com a finalidade de analisar as diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas de sulfato de hidroxiclороquina e os controles foi empregado o teste U, não paramétrico, de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi realizado a partir da diluição do sulfato de Hidroxicloroquina em diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 e 16 mM), além do controle positivo (DXR 0,4mM) e controle negativo (água osmose reversa). Na tabela 1, é possível verificar a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo de *Drosophila melanogaster*, obtidos por meio da análise tumoral. A avaliação mostra que a hidroxicloroquina foi carcinogênica em todas as concentrações testadas, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências tumorais nessas concentrações e o controle negativo ($p < 0,05$).

Tabela 1: Frequência de tumores observados nos descendentes de *Drosophila melanogaster*, tratados com diferentes concentrações de sulfato de hidroxicloroquina

	Indivíduos (moscas)	Tumores encontrados						Total	Frequência
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres		
Controle Água	113	0	0	0	15	0	1	16	0,14
DXR 0,4mM	107	0	7	21	64	7	0	99	0,93*
Hidroxicloroquina 1 mM	73	0	0	1	39	1	0	41	0,56*
Hidroxicloroquina 2 mM	81	0	1	0	27	1	0	29	0,36*
Hidroxicloroquina 4 mM	111	0	0	0	36	0	0	36	0,32*
Hidroxicloroquina 8 mM	98	0	1	1	22	2	0	26	0,27*
Hidroxicloroquina 16 mM	92	0	1	2	36	0	0	39	0,42*

* valor considerado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) de acordo com o teste U.

A avaliação do efeito carcinogênico do sulfato de hidroxicloroquina foi realizada sem estabelecimento prévio de quantidade máxima de indivíduos, sendo analisados os sobreviventes de cada experimento, em sua totalidade. Nos indivíduos tratados com controle negativo (água osmose reversa), observou-se a frequência de 0,14 tumores por mosca. Segundo Alves e Nepomuceno (2012), essa ocorrência aleatória de alterações genéticas é algo intrínseco da *Drosophila melanogaster*, o que justifica a baixa frequência de tumores encontrados no controle negativo e seu uso para esse fim.

Nas moscas tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), a frequência foi de 0,93 tumores/mosca, o que demonstra que a linhagem é viável e responde à indução tumoral. A DXR foi usada como controle positivo, pois é capaz de induzir lesões no material genético celular, por meio da interação com a enzima topoisomerase II, enzima importante para a replicação do DNA, e da geração de radicais livres, o que predis põe a célula a sofrer mutagênese (Lullmann; Mohr; Hein, 2016).

Na concentração de 1mM, obtivemos 73 moscas sobreviventes, as quais apresentaram um total de 41 tumores, correspondendo a 0,56 tumor/mosca. Na concentração de 2mM, das 81 moscas, o total foi de 29 tumores, com uma relação de 0,36 tumor/mosca. Na concentração de 4mM, sobreviveram 111 moscas, com total de 36 tumores, totalizando 0,32 tumor/mosca. Já na concentração de sulfato de hidroxicloroquina 8mM, foram obtidas 98 moscas sobreviventes, com frequência

tumoral de 0,27. Por último, a concentração de hidroxiclороquina 16mM obteve 92 sobreviventes, com uma frequência de 0,42 de tumores por indivíduo.

Percebe-se que a frequência tumoral não aumentou, proporcionalmente, com aumento da concentração da substância testada, ou seja, o efeito não foi dependente da dose. Contudo, pode-se notar que as frequências de tumores em todas as concentrações testadas de sulfato de hidroxiclороquina aumentaram de forma estatisticamente significativa quando comparadas ao controle negativo. Nas concentrações de 1mM e 16mM, a frequência foi 4 e 3 vezes maior, respectivamente, do que a encontrada no controle negativo. Tal fato corrobora favoravelmente com o efeito carcinogênico da hidroxiclороquina.

Mesmo que o sulfato de hidroxiclороquina seja um medicamento bastante utilizado no meio médico para o tratamento de diversas patologias (Menezes; Sanches; Chequer, 2020), no contexto da pandemia da COVID-19, a prescrição desenfreada e precipitada do sulfato de hidroxiclороquina para o tratamento precoce do Coronavírus foi iniciada depois de se observar seu efeito *in vitro* na inibição do SARS-CoV-2, o que ocorreu sem que houvesse evidências suficientemente fortes para haver consenso do uso com esse fim (Melo Neto *et al.*, 2021).

Posteriormente, estudos foram elaborados para verificar se essa medicação era realmente eficaz no controle do referido vírus, mas os resultados foram divergentes. Muitos deles mostraram a ineficácia da hidroxiclороquina *in vivo*, como o estudo de Rosenberg *et al.* (2020), cujo objetivo foi analisar o desfecho clínico de três diferentes grupos diante do tratamento recebido: um recebeu apenas hidroxiclороquina, outro hidroxiclороquina e azitromicina e o último grupo não recebeu nenhuma medicação. Os índices de mortalidade obtidos pelo estudo foram, respectivamente, 19,9%; 25,7% e 12,7%. Nesse sentido, diversos pontos devem ser destacados para que se obtenha uma segurança a respeito de seu uso, ainda mais em casos que seu benefício é questionável (Menezes; Sanches; Chequer, 2020).

Entre as características farmacocinéticas da hidroxiclороquina, sabe-se que possui uma meia vida longa, podendo levar até seis meses para que se atinja uma eliminação completa pelo corpo. Dessa forma, o uso descontrolado pode ser responsável por diversos efeitos colaterais, dentre eles efeitos cardiотóxicos, ataques agudos de febre e elevação de enzimas hepáticas (Menezes; Sanches; Chequer, 2020). Além disso, é importante destacar o possível efeito carcinogênico encontrado a partir da análise prescrita no presente estudo.

Mesmo que por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (ETT) não seja possível determinar o mecanismo exato responsável pela carcinogênese do sulfato de hidroxiclороquina, pode-se propor possíveis mecanismos relacionados a farmacodinâmica do medicamento no organismo. Dentre os possíveis efeitos, a hidroxiclороquina possui a ação de interferência nas ligações ao DNA, além de atuar sobre a atividade enzimática. Ainda, os potenciais riscos à mutação genética induzida por tal medicamento, aliada a atuação inibitória na interação antígeno-anticorpo e na síntese de produção de interleucina-1 (IL-1) (Sulfato de Hidroxiclороquina, 2018; Katzung; Vanderah, 2023), pode contribuir para um possível efeito carcinogênico da hidroxiclороquina.

Diante disso, fica evidente a necessidade de que o médico saiba praticar a Medicina Baseada em Evidências (MBE), que tem como pilares aliar as melhores e mais atuais evidências científicas com a experiência do profissional, considerando o melhor para o paciente (Melo Neto *et al.*, 2021). Para isso, deve-se deixar de lado as ações baseadas apenas no empirismo e tradições, que podem inclusive trazer mais danos colaterais do que benefícios, como foi observado na pandemia da COVID-19, com a prescrição de um fármaco ainda não recomendado. A prescrição da hidroxicloroquina sem necessidade pode trazer malefícios, incluindo efeitos carcinogênicos que podem ser decorrentes do uso exacerbado de tal medicação. Dessa forma, muitos desses efeitos ainda poderão vir à tona futuramente, como uma consequência de longo prazo da hiperprescrição dessa droga.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sulfato de hidroxicloroquina, por meio da análise tumoral em *Drosophila melanogaster*, induziu a formação de tumores epiteliais em todas as concentrações testadas. Entretanto, são necessários novos estudos, com amostras maiores e diferentes metodologias, para melhor entendimento da ação carcinogênica da hidroxicloroquina.

REFERÊNCIAS

- ALLGAYER, N. Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico de fármacos através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*: revisão. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 40-49, 2018.
- 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.
- COLSON, P.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Chloroquine for the 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 105923, 2020.
- DAS, A. *et al.* Sildenafil (Viagra) sensitizes prostate cancer cells to doxorubicin-mediated apoptosis through CD95. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 4399-4413, 2015.
- DAVIS, S. N. *et al.* Chloroquine kills hair cells in zebrafish lateral line and murine cochlear cultures: Implications for ototoxicity. **Hearing Research**, [S. l.], v. 395, p. 108019, 2020.
- FAULDOXO®: cloridrato de doxorubicina. Farmacêutica Responsável: Cintia Delphino de Andrade. São Paulo, Libbs Farmacêutica Ltda, 2017. Bula de Remédio.

IMOTO, A. M. *et al.* Cloroquina e hidroxiclороquina no tratamento da covid-19: sumário de evidências. **Comunicação em Ciências da Saúde**, Brasília, v. 31, suppl. 1, p. 17-30, 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do Câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 6. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2020. 114 p.

KATZUNG, B. G.; VANDERAH, T. W. **Farmacologia básica e clínica**. Grupo A, 2023.

LULLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L. **Farmacologia**: texto e atlas. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MELO NETO, A. J. de *et al.* Prevenção quaternária e a prescrição de cloroquina e hidroxiclороquina na covid-19: vale a pena pecar pelo excesso?. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 43, p. 2573, 2021.

MENEZES, C. R.; SANCHES, C.; CHEQUER, F. M. D. Efetividade e toxicidade da cloroquina e da hidroxiclороquina associada (ou não) à azitromicina para tratamento da COVID-19. O que sabemos até o momento?. **Journal of Health and Biological Sciences**, Fortaleza, v. 8, ed. 1, p. 01-09, 2020.

MORIN, P. J. *et al.* Genética do Câncer. In: LONGO, D. L. **Hematologia e Oncologia de Harrison**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. cap. 24, p. 236-245.

OLIVEIRA, G. M. M.; PINTO, F. J. Covid-19: a matter close to the heart. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 199-202, 2020.

OPAS. Organização Pan-americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde. **Câncer**. 2020. Folha informativa atualizada em outubro de 2020.

RODRIGUES, A. B. Oncogênese. In: RODRIGUES, A. B.; MARTIN, L. G. R.; MORAES, M. W. **Oncologia multiprofissional**: bases para assistência. Barueri: Manole, 2016. Cap. 01, p. 1-14.

ROSENBERG, E. S. *et al.* Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with covid-19 in New York State. **JAMA**, [S. l.], v. 323, n. 24, p. 2493-2502, 2020.

SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA: comprimido revestido. Responsável técnico: Dra. Telma Elaine Spina. São Paulo: EMS S/A, 2018. Bula de remédio.

WANG, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*. **Cell Research**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 269-271, 2020.