

Análise dos efeitos carcinogênicos da hidroclorotiazida sobre células epiteliais de *Drosophila melanogaster*

*Analysis of the carcinogenic effects of hydrochlorothiazide on epithelial cells of
Drosophila melanogaster*

JOÃO VICTOR DORNELAS

Discente do curso de Medicina (UNIPAM)
joaodornelas@unipam.edu.br

RODRIGO SOARES DE ANDRADE

Professor orientador (UNIPAM)
rodrigosa@unipam.edu.br

Resumo: A hidroclorotiazida (HCTZ) é um medicamento amplamente utilizado na prática médica para o controle da hipertensão arterial. Estudos demonstraram que ela possui um efeito carcinogênico, aumentando as chances de desenvolvimento de neoplasias cutâneas, sendo as mais comuns o carcinoma espinocelular e o basocelular. O objetivo deste estudo foi 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, enquanto a doxorubicina foi utilizada como controle positivo. As moscas foram expostas a diferentes concentrações do fármaco: 1,25, 0,6250 e 0,3125 mg/mL. A frequência tumoral foi calculada para comparar as concentrações do teste com os controles. Os resultados indicaram que a HCTZ não induziu a formação de tumores nas concentrações testadas.

Palavras chave: hidroclorotiazida; neoplasias epiteliais; teste de carcinogenicidade.

Abstract: Hydrochlorothiazide (HCTZ) is a widely used medication in medical practice for controlling hypertension. Studies have shown that it has carcinogenic effects, increasing the chances of developing skin neoplasms, the most common being squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. The aim of this study was to investigate its carcinogenic potential through the epithelial tumor detection test (ETT) in *Drosophila melanogaster*. To validate the experiment, reverse osmosis water was used as a negative control, while doxorubicin was used as a positive control. The flies were exposed to different concentrations of the drug: 1.25, 0.6250, and 0.3125 mg/mL. Tumor frequency was calculated to compare the test concentrations with the controls. The results indicated that HCTZ did not induce tumor formation at the tested concentrations..

Keywords: Hydrochlorothiazide; epithelial neoplasms; carcinogenicity test.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pele, segundo dados epidemiológicos, é o tipo de carcinoma mais comum no mundo, com cerca de 83.770 casos em homens e 93.170 em mulheres entre os anos de 2020 e 2022. O câncer de pele não melanoma (CPNM) corresponde a aproximadamente 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, sendo o mais frequente e o de menor mortalidade (INCA, 2011).

Existem dois grandes tipos de câncer de pele: melanoma e não melanoma, sendo este último o de maior prevalência. A pele, por ser o maior órgão do corpo humano e apresentar estrutura heterogênea, pode desenvolver diferentes tipos de tumores de câncer de pele não melanoma (INCA, 2011). Os mais frequentes são o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma epidermoide. O carcinoma basocelular, embora seja o mais incidente, é também o menos agressivo. No entanto, se não for tratado adequadamente, pode resultar em mutilações significativas. (INCA, 2011).

Um dos fármacos mais utilizados no tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é a hidroclorotiazida (HCTZ), pertencente à classe das tiazidas. Seu mecanismo de ação consiste em aumentar a eliminação de líquidos do organismo por meio da urina, caracterizando-se, portanto, como um diurético. Este medicamento é amplamente utilizado no Brasil, tanto isoladamente quanto em associação com outros fármacos anti-hipertensivos, como, por exemplo, a Losartana (Calabria *et al.*, 2020).

Segundo Pedersen (2018), em um estudo que analisou uma população composta por 71.533 casos de carcinoma basocelular (CBC) e 8.629 casos de carcinoma espinocelular (CEC), aproximadamente 3% dos participantes eram usuários contínuos de hidroclorotiazida. A análise de dados farmacoepidemiológicos relatada no estudo permitiu inferir uma associação entre o uso contínuo de hidroclorotiazida e o câncer de pele não melanoma (CPNM). De acordo com o mesmo artigo, o efeito carcinogênico estaria relacionado à dose cumulativa, sendo significativo a partir de ≥ 50.000 mg acumulados.

Dessa forma, foi proposta a realização deste projeto de pesquisa com a finalidade de avaliar o potencial carcinogênico da substância hidroclorotiazida e sua associação com o CPNM, considerando a fração significativa da população brasileira que faz uso desse fármaco. O estudo foi conduzido por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo experimental conduzido no Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

2.2 HIDROCLOROTIAZIDA

A HCTZ utilizada no procedimento foi adquirida na farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) com recursos dos pesquisadores.

Para a realização deste estudo, foram utilizadas três concentrações de HCTZ, definidas a partir de uma curva de sobrevivência obtida em um pré-teste, por meio do teste de toxicidade (TX). A curva foi estabelecida utilizando o mesmo teste aplicado neste estudo, o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*.

Foi realizado o teste de toxicidade utilizando a HCTZ em seis concentrações, que foram definidas pelos pesquisadores, tendo como base outros estudos utilizando esse fármaco em outros modelos experimentais.

O teste de toxicidade foi realizado utilizando HCTZ em seis concentrações, definidas pelos pesquisadores com base em estudos prévios que empregaram esse fármaco em outros modelos experimentais. O teste de toxicidade (TX) teve como objetivo determinar uma relação dose-dependente entre cada concentração testada e o potencial tóxico do composto. Para esse teste, foi utilizado um frasco para cada concentração, devidamente identificado para evitar qualquer confusão com os demais frascos do experimento. Foram, então, colocadas 100 larvas de *Drosophila melanogaster* em um frasco contendo meio próprio para desenvolvimento. Posteriormente, os pesquisadores contabilizaram o número de larvas que evoluíram da fase larval para a fase de pupa e, posteriormente, para a fase de mosca adulta.

Na etapa de análise, foi determinada a quantidade de moscas mortas em cada concentração testada, estabelecendo-se uma relação dose-dependente entre o número de moscas mortas e a concentração utilizada.

2.3 DOXORRUBICINA

A doxorubicina é um antibiótico antracíclico produzido pela fermentação de *Streptomyces peucetius* e tem sido utilizada para induzir regressão em diversas neoplasias (tumores malignos), como linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin. O cloridrato de doxorubicina pode potencializar a toxicidade de outras terapias antitumorais, sendo, portanto, utilizado como um fator de pesquisa para controle positivo na verificação de tumores (Cloridrato..., 2014).

O controle positivo adotado como referência para a realização desta pesquisa será o cloridrato de doxorubicina 50 mg, comercialmente vendido como Adriblastina® RD, fabricado e embalado pela Actavis Italy S.p.A., em Nerviano, Milão – Itália (MS – 1.0216.0165, lote 905825) e importado pelo laboratório Pfizer. Sua comercialização é realizada somente mediante prescrição médica, sendo seu uso restrito a hospitais. O medicamento é apresentado na forma de pó liofilizado injetável, em embalagem contendo um frasco-ampola. Cada frasco-ampola contém 10 mg ou 50 mg de cloridrato de doxorubicina (Cloridrato..., 2014).

2.4 TESTE DE TOXICIDADE

Foi realizado o teste de toxicidade (TX) para determinar as concentrações que não afetam o desenvolvimento das larvas, com o objetivo de não comprometer o experimento e de estabelecer a dose ideal para o uso da hidroclorotiazida. As concentrações de 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL e 0,3125 mg/mL foram selecionadas com

base nos resultados desse teste. No total, foram testadas 500 larvas, das quais 369 completaram o ciclo de desenvolvimento, demonstrando que essas concentrações são seguras para o experimento.

2.5 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster* apresenta características vantajosas para o estudo de marcadores tumorais. Essas características incluem dimorfismo sexual, ciclo de vida curto, alta fecundidade (cada fêmea pode pôr até 300 ovos durante sua vida), número reduzido de cromossomos, cromossomos gigantes e a presença de genes homólogos a outros animais, incluindo vertebrados. O embrião desenvolve-se fora do corpo, sendo que a etapa de blastoderme do embrião é sincicial, o que facilita o acesso a todos os núcleos para a injeção de macromoléculas.

Segundo o *National Center for Biotechnology Information*, o gene *warts* (*wts*) é um supressor de tumor em *Drosophila*, localizado no cromossomo 3R100A5. A deleção desse gene leva à formação de clones de células grandes e arredondadas, gerando uma espécie de "verrugas" nas pernas, asas e no corpo das moscas. A ausência da função do gene *wts* também resulta em hipertrofia apical das células epiteliais do disco imaginal (Justice *et al.*, 1995).

O gene *wts* é responsável pela codificação da proteína serina-treonina quinase, que, assim como as ciclinas, participa do processo de regulação do ciclo de divisão celular (Eeken *et al.*, 2002). Nos mamíferos, há um gene homólogo ao *wts* denominado *LATS1*, que também desempenha um papel significativo na regulação do ciclo celular. Assim como o *wts*, o *LATS1* é responsável pela produção da serina-treonina quinase e, portanto, mutações nesses genes estão associadas ao desenvolvimento de tumores (Silva, 2011).

Para o desenvolvimento do teste de detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster*, foram utilizadas duas linhagens mutantes (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3). A linhagem *wts/TM3, sb1* foi gentilmente cedida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana, EUA, sob o número de registro Bloomington/7052 (Silva, 2011).

Para a análise, foram utilizadas apenas moscas de pelo longo, pois estas apresentam o fenótipo mutante associado à presença do tumor (*wts+/+ mwh*). As moscas que apresentam o balanceador cromossômico (*TM3, Sb1*), caracterizadas pela presença de pelos curtos e grossos, foram descartadas (Silva, 2011).

2.6 LINHAGENS

Para a realização do teste *wts* (*warts*), foram utilizadas duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3). Os estoques dessas linhagens são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagenese (LABCIM) do Centro Universitário de Patos

de Minas (UNIPAM), sendo mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura específico para *D. melanogaster*.

O meio de cultura é composto por 820 mL de água, 25 g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana e 1 g de nipagin. As linhagens são conservadas em uma incubadora, mantida a uma temperatura em torno de 25 °C e 60% de umidade relativa.

2.7 CRUZAMENTOS

Para a realização dos cruzamentos, foram colocados os machos *mwh/mwh* e as fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* em frascos contendo meio de cultura específico para postura, onde as fêmeas depositaram seus ovos. Após 72 horas do cruzamento, foram obtidas larvas heterozigotas *wts+/+ mwh*, que foram posteriormente tratadas com HCTZ.

2.8 TRATAMENTOS

Foram utilizadas as larvas de 72 horas do primeiro cruzamento. Em seguida, as larvas foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê de batata instantâneo, um meio alternativo para *Drosophila*. Posteriormente, as larvas foram tratadas com três concentrações diferentes de HCTZ, definidas em 1,25, 0,625 e 0,3125 mg/mL. Para o controle positivo, foi utilizada a DXR, e para o controle negativo, água de osmose reversa. Durante essa etapa do tratamento, as larvas foram expostas aos agentes químicos por um período de aproximadamente 48 horas, até ocorrer a empupação.

2.9 COLETA DAS MOSCAS

Após o tratamento, as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo álcool a 70%, os quais foram devidamente identificados com o nome e as concentrações dos compostos testados.

2.10 ANÁLISES DAS MOSCAS

Após a coleta das moscas e sua colocação em frascos contendo álcool a 70%, a análise foi iniciada. As moscas foram separadas em dois grupos: pelo curto e pelo longo. As moscas de pelo longo foram colocadas individualmente em placas escavadas contendo glicerina (Glicerol - C₃H₈O₃) e analisadas com uma lupa estereoscópica para visualização e contagem da presença de tumores, com o auxílio de um pincel para manuseio. O registro da frequência de tumores foi realizado em uma tabela, que quantificou a incidência de tumores nas regiões da cabeça, olhos, asas, corpo, halteres e pernas, além do total por mosca em cada concentração testada.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores nas concentrações testadas e nos controles (positivo e negativo) foram calculadas utilizando o teste U de Mann-Whitney, não paramétrico, com nível de significância $< 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo foi realizado por meio da diluição da hidroclorotiazida em diferentes concentrações: 1,25, 0,625 e 0,3125 mg/mL, além do controle positivo (DXR 0,4 mM) e controle negativo (água de osmose reversa). Essas concentrações foram escolhidas com base nos resultados do teste de toxicidade (TX), com o objetivo de determinar a melhor concentração para o experimento.

Na Tabela 1, é possível verificar a frequência dos tumores encontrados nos segmentos do corpo de *Drosophila melanogaster*, obtidos por meio da análise tumoral. A avaliação da hidroclorotiazida demonstra que não 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 hidroclorotiazida

Moscas	Tumores encontrados						Total	Frequência	
	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres			
DXR	150	9	30	6	71	5	5	126	0,84*
HCTZ 1,25mg/ml	170	2	2	0	2	0	0	6	0,035*
HCTZ 0,625 mg/ml	180	0	1	0	2	0	0	3	0,0167*
HCTZ0,3125mg/ml	190	0	0	3	1	0	0	4	0,0211*
Controle Água	200	0	0	0	0	4	0	4	0,02

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

A avaliação do efeito carcinogênico da hidroclorotiazida (HCTZ) foi realizada sem um estabelecimento prévio de número máximo de indivíduos, sendo analisados os sobreviventes de cada experimento e separadas as moscas de pelo longo, em sua totalidade.

Nas concentrações de 1,25 mg/mL de HCTZ, com um total de 170 moscas, foram encontrados 6 tumores, resultando em uma frequência de 0,035. Na concentração de 0,625 mg/mL, com um total de 180 moscas, foram encontrados 3 tumores, resultando em uma frequência de 0,0167. Na concentração de 0,3125 mg/mL, com um total de 190 moscas, foram encontrados 4 tumores, com uma frequência de 0,0211.

Nas moscas tratadas com a DXR (controle positivo), verificou-se uma frequência de 0,84 tumores/mosca, evidenciando a viabilidade da linhagem e sua resposta à indução tumoral. A DXR foi utilizada como controle positivo, pois possui a capacidade de induzir lesões no material genético celular por meio da sua interação com a enzima topoisomerase II, uma enzima essencial para a replicação do DNA, o que predispõe o surgimento de mutações (Lullmann; Mohr; Hein, 2016).

Nas concentrações observadas de HCTZ e no controle positivo, foram demonstradas frequências muito baixas do aparecimento de tumores, o que pode ser relacionado, segundo Alves e Nepomuceno (2012), à ocorrência aleatória de alterações genéticas, algo intrínseco à *Drosophila melanogaster*. Isso justifica a baixa frequência de tumores e a ausência de toxicidade da hidroclorotiazida em si..

Vale ressaltar que a frequência tumoral aumentou discretamente com o aumento da concentração da substância testada, indicando que o efeito pode estar relacionado à dose. Contudo, os números obtidos neste experimento não são conclusivos para estabelecer uma relação definitiva entre dose e efeito carcinogênico. No entanto, observou-se um aumento discreto na dosagem máxima do medicamento. Esse fato sugere a necessidade de mais pesquisas com novas doses, para investigar o aumento das chances de desenvolvimento de neoplasias (Alves; Nepomuceno; 2012).

Mesmo sendo amplamente utilizada na prática médica devido ao seu efeito no controle da pressão arterial, a hidroclorotiazida pertence ao grupo farmacológico das tiazidas ou tiazídicos. Estes fármacos atuam na porção convoluta do túbulo contornado distal, onde inibem o transporte do íon Na^+Cl^- , promovendo o aumento da eliminação de Na^+ , Cl^- , K^+ e água. Isso resulta em uma diminuição do volume plasmático (15 a 20%), conseqüentemente reduzindo o débito cardíaco, aumentando a resistência periférica e a atividade da renina plasmática, o que, por fim, leva à diminuição da pressão arterial (Rang; Dale, 2016).

Sabe-se que o uso prolongado dessa droga está associado a propriedades fotossensibilizadoras, que aumentam o risco de câncer de lábio, pele não melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas) e melanoma (Calabria *et al.*; 2020).

O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo mais prevalente entre os cânceres de pele. Ele se origina nas células basais, localizadas na camada mais profunda da epiderme (camada superior da pele). Os CBCs surgem com maior frequência em áreas expostas ao sol, como face, orelhas, pescoço, couro cabeludo, ombros e costas, podendo também se desenvolver em regiões não expostas, embora mais raramente. Devido à exposição contínua à radiação ultravioleta (UV), o carcinoma basocelular apresenta um número considerável de mutações genéticas (Brasileiro Filho; 2021).

Vale ressaltar que o carcinoma espinocelular (CEC) é o segundo câncer mais prevalente entre os tipos de câncer de pele (INCA, 2017). Ele se manifesta nas células escamosas, que compõem a maior parte das camadas superiores da pele. Embora seja

raro, o carcinoma de células escamosas pode migrar para gânglios linfáticos regionais e se disseminar para outros locais, como ossos, cérebro e pulmões (Broetto, 2012).

Diante disso, é evidente a necessidade de que os médicos pratiquem a Medicina Baseada em Evidências (MBE), que tem como pilares a combinação das melhores e mais atuais evidências científicas com a experiência clínica do profissional, sempre considerando o melhor interesse do paciente (Melo Neto *et al.*, 2021). Para evitar danos futuros aos pacientes, a medicina deve constantemente buscar o conhecimento mais atualizado e as formas de tratamento mais comprovadas. Dado que o tratamento é de longo prazo, é fundamental o estudo aprofundado de medicamentos, como a hidroclorotiazida, que são amplamente utilizados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hidroclorotiazida, por meio da análise tumoral em *Drosophila melanogaster*, não induziu a formação de tumores epiteliais em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, são necessários novos estudos, com amostras maiores e metodologias distintas, para um melhor entendimento da ação carcinogênica da hidroclorotiazida. Isso se faz relevante, pois é importante obter comprovações que permitam verificar se doses mais elevadas podem aumentar a probabilidade de surgimento de tumores. Considerando que a HCTZ é amplamente utilizada na prática médica para o controle da hipertensão, é fundamental entender seus potenciais efeitos adversos a longo prazo para a população, a fim de evitar possíveis desfechos desfavoráveis.

REFERÊNCIAS

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. (ed.). **Bogliolo - Patologia** [livro eletrônico]. 10. ed. Online: Guanabara Koogan, 2021.

BROETTO, J. *et al.* Tratamento cirúrgico dos carcinomas basocelular e espinocelular: experiência dos Serviços de Cirurgia Plástica do Hospital Ipiranga. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 2, n. 5, p. 3-7, 2012.

CALABRIA, A. C. *et al.* Relação do uso prolongado de hidroclorotiazida com o melanoma: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, e958998175, 14 set. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.8175>.

CLORIDRATO de doxorubicina: pó liofilizado para solução injetável. Responsável técnico: Valéria Medeiros Miqueloti. São Paulo: Glenmark Farmacêutica, 2014. Bula de remédio.

EEKEN, J. C. J. *et al.* Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 277-282, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/em.10119>.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Câncer de pele não melanoma**. 2011. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma>.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **O câncer e seus fatores de risco**. 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo2013> Rio de Janeiro, ID=322.

JUSTICE, R. W. *et al.* The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, n. 5, p. 534-546, 1995. DOI: 10.1101/gad.9.5.534.

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

MELO NETO, A.J. de *et al.* 2021. Prevenção Quaternária e a Prescrição de Cloroquina e Hidroxicloroquina na COVID-19: vale a pena pecar pelo excesso? **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**. v. 16, n. 43, jul. 2021. DOI: [https://doi.org/10.5712/rbmfc16\(43\)2573](https://doi.org/10.5712/rbmfc16(43)2573).

RANG, H. P; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p 768, 2011.

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