

Avaliação da atividade anticarcinogênica do cloridrato de clorpromazina por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

*Evaluation of the anticarcinogenic activity of chlorpromazine hydrochloride using the epithelial tumor test (ETT) in somatic cells of *Drosophila melanogaster**

LUANA CARDOSO BRITO

Discente de Medicina (UNIPAM)

luanacbrito@unipam.edu.br

PAULA MARYNELLA ALVES PEREIRA LIMA

Professora orientadora (UNIPAM)

paulamp@unipam.edu.br

Resumo: O presente estudo avaliou a atividade anticarcinogênica do cloridrato de clorpromazina (CPZ) por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. A pesquisa justifica-se pela busca de novas aplicações para fármacos preexistentes no tratamento do câncer. A metodologia consistiu na utilização de larvas de 2º instar, descendentes do cruzamento entre linhagens mutantes *wt*s e *mwh*, previamente tratadas com doxorrubicina 0,4 mM e posteriormente submetidas a tratamentos crônicos com diferentes concentrações de CPZ (1,9 mg/mL; 3,9 mg/mL e 7,8 mg/mL). A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância $P < 0,05$. Os resultados foram validados por meio dos controles positivo e negativo, comprovado pela predisposição genética do organismo modelo às substâncias testadas. A concentração de 3,9 mg/mL aumentou significativamente a quantidade de tumores induzidos pela doxorrubicina. Todavia, as doses de 1,9 mg e 7,8 mg não apresentaram o mesmo efeito inibitório, sugerindo um efeito de hormese. Diante disso, sugere-se cautela nas concentrações farmacológicas administradas. Sugerimos ensaios adicionais para elucidar os mecanismos moleculares relacionados.

Palavras-chave: cloridrato de clorpromazina; *Drosophila melanogaster*; efeito carcinogênico; teste de tumores epiteliais.

Abstract: This study evaluated the anticarcinogenic activity of chlorpromazine hydrochloride (CPZ) using the epithelial tumor test (ETT) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. The research is justified by the search for new applications of preexisting drugs in cancer treatment. The methodology consisted of using second-instar larvae descended from crosses between the mutant strains *wt*s and *mwh*, previously treated with 0.4 mM doxorubicin and subsequently subjected to chronic treatments with different concentrations of CPZ (1.9 mg/mL, 3.9 mg/mL, and 7.8 mg/mL). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, with a significance level of $P < 0.05$. The results were validated by positive and negative controls, as demonstrated by the genetic predisposition of the model organism to the tested substances. The concentration of 3.9 mg/mL significantly increased the number of tumors induced by doxorubicin. However, the

doses of 1.9 mg/mL and 7.8 mg/mL did not show the same inhibitory effect, suggesting a hormetic effect. Therefore, caution is recommended regarding the pharmacological concentrations administered. Additional assays are suggested to elucidate the related molecular mechanisms.

Keywords: chlorpromazine hydrochloride; *Drosophila melanogaster*; carcinogenic effect; epithelial tumor test.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia que se inicia a partir da proliferação celular descontrolada, caracterizando-se por um processo complexo e heterogêneo. As alterações genéticas e epigenéticas favorecem um caráter geneticamente instável à célula cancerosa, amplificando-se devido ao acúmulo de danos no DNA e erros nos mecanismos de controle da célula (Barroso-Sousa; Fernandes, 2023).

Existem vestígios históricos de câncer que datam 3000 a.C. Essa descoberta provém de múmias do antigo Egito que apresentavam deformações ósseas que poderiam ser tumores. Apesar de ser uma doença mais evidenciada atualmente, tanto pelo avanço científico quanto pela alta expectativa de vida, o câncer tem mais prevalência em idades avançadas (López; Cardona, 2022).

O impacto gerado pelo câncer abrange toda a esfera social, econômica e psicológica, afetando a qualidade de vida. Todavia a maior parte das neoplasias advém de fatores modificáveis e não herdados, principalmente de etiologias infecciosas, hábitos comportamentais como etilismo, tabagismo, sedentarismo, obesidade e exposição ambiental e ocupacional a agentes químicos e poluentes (Barroso-Sousa; Fernandes, 2023).

O câncer é tratado com mais de um medicamento, porém sua cura ainda não foi encontrada. Dessa forma, existe uma busca por novas maneiras de reorientar o tratamento do câncer com medicações preexistentes. Os antipsicóticos são exemplos de fármacos que vêm sendo estudados, pois são de amplo espectro, ou seja, além de tratar esquizofrenia, tratam mania, delírio, depressão psicótica e agitação associada a demência. Todavia esse tipo de tratamento ainda não é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), apesar dos achados de supressão do câncer com essa classe de medicamentos (BROWN, 2022).

O Cloridrato de Clorpromazina (CPZ) é um medicamento desenvolvido na década de 1950, principalmente para o tratamento de esquizofrenia, que revolucionou a indústria farmacêutica e expandiu o entendimento sobre os sinais químicos envolvidos na rede de neurotransmissores humanos. Esse remédio diminuiu o estigma envolto nas doenças mentais, o que possibilitou até mesmo a volta dos pacientes com esquizofrenia para a sociedade (Boyd-Kimball *et al.*, 2018).

Durante os primeiros usos do medicamento, em meados de 1952, foi observada uma sedação peculiar, já que era diferente das demais sedações utilizadas na época em hospitais psiquiátricos. O seu principal diferencial era o efeito amplo em alucinações, delírios, confusão mental e, o mais importante, não induzia a narcose (Porto, 2018).

A primeira síntese do CPZ foi realizada em 1951 e patenteada por Paul Charpentier, dos laboratórios Rhône-Poulenc, em 1953. Desde então outras formas para sua síntese foram criadas. A última foi em 2012, patenteada por Wang, sobre o nome de CN102617509 (A), que obteve melhores rendimentos que os métodos tradicionais (Boyd-Kimball *et al.*, 2018).

Como o CPZ é encontrado no mercado farmacêutico há mais de 70 anos e utilizado em ampla escala, torna-se necessária a pesquisa de efeito anticarcinogênico desse medicamento por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*.

2 METODOLOGIA

2.1 AGENTES QUÍMICOS

2.1.1 Doxorrubicina (DXR)

Como controle positivo, foi utilizado um agente químico de ação citotóxica, a doxorrubicina (DXR), CAS 23214-92-8, (Adriblastina®RB Cloridrato de Doxorrubicina 50 mg). Cada frasco-ampola contém 50mg de pó liofilizado para uso injetável. A DXR é um medicamento de uso restrito a hospitais e é indicado para regressão de neoplasias como carcinoma da mama, pulmão, bexiga, tireoide e ovário, sarcomas ósseos e de tecidos moles, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms, leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloblástica aguda (ADRIBLASTINA®, 2013).

A DXR foi utilizada na presente pesquisa como controle positivo, uma vez que seu efeito carcinogênico é amplamente reconhecido e já foi comprovado em células de *Drosophila melanogaster* (Orsolin; Silva-Oliveira; Nepomuceno, 2012).

O mecanismo de ação da DXR é complexo, porém há interação, através de intercalação, com o DNA, fazendo com que haja a inibição da biossíntese macromolecular. Dessa forma, há uma maior inibição da enzima topoisomerase II, não permitindo sua progressão, além de afrouxar os enrolamentos da molécula e facilitar o processo de replicação do DNA. Assim, após estabilizar o complexo topoisomerase II, ocorre quebras na cadeia de DNA, impede-se que a dupla hélice de DNA seja selada novamente, interrompendo o processo de replicação. Além disso, é capaz de gerar radicais livres que induzem danos ao DNA e à membrana celular (Rivankar, 2014).

2.1.2 Cloridrato de clorpromazina

O Cloridrato de clorpromazina (CPZ), CAS 69-09-0, ou seja, 3-(2-clorofenotiazin-10-il)-N,N-dimetilpropan-1-amina, é uma molécula de baixo peso molecular derivada de fenotiazina e utilizada para o tratamento de esquizofrenia. O CPZ foi usado neste trabalho na apresentação de 40mg/mL, solução oral em gotas. Foi adquirido em frascos contendo 20mL.

2.2 TESTE DE TUMORES EPITELIAIS (ETT) EM *Drosophila melanogaster*

Para o desenvolvimento do teste para a detecção de clones de tumor epitelial em *D. melanogaster*, foram utilizadas duas linhagens mutantes, a *wts* e a *mwh*, portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3).

Essas linhagens foram mantidas em estoques cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas (MG). Foram mantidas em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster*. Esse meio foi obtido através do processamento e cozimento de preparação, contendo 820 mL de água, 25g de fermento biológico fresco (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de agar, 156g de banana madura e 1g de metilparabeno.

2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As condições propícias para manutenção das linhagens de *Drosophila* foram oferecidas através de conservação destas no interior de uma incubadora B.O.D. 411 D, em temperatura de aproximadamente 25° C e umidade em torno de 60%.

Para a realização da pesquisa, foi feito o cruzamento entre fêmeas virgens de *wts/TM3, Sb¹* com machos *mwh/mwh*. A postura dos ovos dos descendentes do cruzamento ocorreu dentro de um período de 8 horas. O procedimento experimental foi conduzido em esquema de pós-tratamento, no qual larvas de 2º estágio ($\pm$ 66 horas) foram submetidas a um tratamento por 6 horas com DXR a 0,4mM para indução de tumores. Posteriormente, às 6 horas, as larvas foram retiradas da DXR, lavadas e colocadas em frascos contendo 1,5 g de purê de batatas. Foram adicionados ao purê 5mL de 3 diferentes concentrações de CPZ (1,9 mg/mL; 3,9 mg/mL e 7,8 mg/mL), em quatro repetições. Para controle positivo, as larvas foram colocadas em frasco com purê e 5mL de água de osmose reversa; já para controle negativo, foi adicionada água a outros quatro frascos também com purê e colocadas larvas que não foram tratadas previamente com DXR, mas que foram expostas às mesmas condições experimentais.

As larvas ficaram alimentando dos respectivos meios por um período de, aproximadamente, 48 horas. Ao findar da metamorfose, 120 horas após o período de alimentação das larvas, as moscas foram coletadas e preservadas em etanol (C₂H₆O) 70% para posterior análise.

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

A análise foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica, placa escavada e glicerina (C₃H₈O₃) e baseada na contagem de tumores. Os resultados foram tabulados em um diagrama padrão expressando os números de tumores encontrados em diferentes 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.

2.4 VIABILIDADE TÉCNICA

O Laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM dispõe de todos os equipamentos (estufas, autoclaves, banho-maria, microscópios ópticos de luz, lupas estereoscópicas, chapas aquecedoras, entre outros.) e linhagens mutantes de *D. melanogaster*, que foram necessários na execução da pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *D. melanogaster*, conhecida comumente por mosca da fruta, é da ordem Diptera, eucarionte, com $2n = 8$ cromossomos, sendo 3 pares de autossomos e 1 par sexual. A espécie garante uma boa utilização para testes genéticos, pois tem um ciclo de vida curto, fácil manutenção em laboratório e gera uma prole com muitos indivíduos. Testes desenvolvidos com esse organismo modelo servem como base para resultados esperados em humanos, pois as moscas têm reações metabólicas semelhantes a eles (Graf, 2006).

Diante disso, avaliou-se o potencial anticarcinogênico do CPZ em *D. melanogaster*. Os dados das frequências de tumores encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência de clones tumorais observada em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor tumoral WARTS, pré-expostas à doxorrubicina (DXR – 0,4 mM) e, em seguida, tratadas com diferentes concentrações de Cloridrato de Clorpromazina-CPZ (1,9 mg, 3,9 mg e 7,8 mg mM). Foram incluídas a água ultrapura (controle negativo); doxorrubicina 0,4 mM (DOX, controle positivo).

A frequência de tumores foi analisada em diferentes segmentos.

Tratamento		Número de moscas	Número de tumores analisados							Frequência
CPZ (mg)	DOX (mM)		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halter	Total	
0	0	96	0,01 (01)	0,04 (04)	0,06 (06)	0,26 (25)	0,02 (02)	0,00 (00)	38	(0,39)
0	0,4	73	0,00 (00)	0,09 (07)	0,49 (36)	0,49 (36)	0,08 (06)	0,00 (00)	85	(1,16)*
1,9	0,4	80	0,03 (03)	0,07 (06)	0,65 (52)	0,45 (36)	0,03 (03)	0,00 (00)	100	(1,25)
3,9	0,4	89	0,20 (18)	0,05 (05)	0,84 (75)	0,45 (40)	0,18 (16)	0,09 (08)	162	(1,82)**
7,8	0,4	55	0,00 (00)	0,12 (07)	0,56 (31)	0,50 (28)	0,12 (07)	0,00 (00)	73	(1,32)

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

*Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$).

**Valores considerados diferentes do controle positivo ($P \leq 0,05$).

Frequência: número de tumores/mosca

Fonte: dados da pesquisa, 2024.

Na Tabela, observa-se que o tratamento de *Drosophila melanogaster* à DXR (0,4 mM) induziu um aumento significativo na frequência de tumores epiteliais (1,16), quando comparado ao controle negativo (0,39). Esse dado evidencia que a DXR na concentração de 0,4 mM é eficiente na indução de tumores no organismo analisado, como o encontrado em estudos prévios (Vasconcelos *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2018).

Outrossim, as larvas tratadas com água, referentes ao controle negativo, também desenvolveram tumores. Esse achado confirma a predisposição genética do organismo teste e valida o experimento desta pesquisa (Alves; Nepomuceno, 2012).

Em relação a CPZ, percebe-se que, na concentração intermediária de 3,9 mg/mL, há um aumento na frequência tumoral, evidenciando que esse tratamento aumentou a quantidade de tumores previamente induzidos pela DXR. Por outro lado, nas concentrações de 1,9 mg/mL e 7,8 mg/mL, não houve diferença significativa quando comparadas ao controle positivo, DXR a 0,4 mM.

Rykalo e Baylo (2023) avaliaram o efeito da CPZ em células hepáticas de ratos e observaram que apresenta efeito hepatotóxico relacionado à fragmentação do DNA nuclear. Sabe-se que danos ao DNA geram instabilidade genômica, contribuindo diretamente para a carcinogênese (Meaza *et al.*, 2024). Sugere-se que CPZ possa ter levado a quebras no material genético, contribuindo para a perda da heterozigose do supressor tumoral, WTS, mecanismo detectado pelo teste.

Todavia, as concentrações de 1,9 mg e 7,8 mg de CPZ não demonstraram efeito equivalente à dose de 3,9 mg, sem efeito significativo na indução de tumores epiteliais. De acordo com Wesołowska (2011), os fenotiazidicos, como o CPZ podem atuar aumentando as doses de DOX dentro das células por interferir com a glicoproteína P, o que bloquearia o efluxo do quimioterápico. Logo, a maior quantidade do quimioterápico pode gerar maior danos à célula e consequente morte das células alteradas (Xiao *et al.*, 2022).

Além disso, a teoria da resposta bifásica ou teoria da hormese indica que alguns químicos possuem resposta modulada de acordo com a célula ou tecido tumoral testado, podendo apresentar estimulação em doses baixas e inibição em doses altas, ou vice-versa (Calabrese, 2005). Dessa forma, pode-se entender que a dose de 1,9 mg não atingiu o limiar necessário para contribuir para a carcinogênese. Por outro lado, possivelmente a dose de 7,9 mg ativou mecanismos compensatórios que mascaram o efeito carcinogênico. Já a concentração intermediária de 3,9 mg foi suficiente para agir sinergicamente no efeito tumoral.

4 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou o efeito carcinogênico do CPZ por meio do teste de tumores epiteliais em células somáticas de *D. melanogaster*. O CPZ com a concentração de 3,9 mg contribuiu para o aumento de tumores. Porém, na menor e maior concentração, 1,9 mg e 7,8 mg, respectivamente, tal efeito não foi significativo. Diante disso, sugere-se que o efeito que CPZ induz é dependente da dose, sugerindo cautela na administração. Sugerem-se estudos em outros modelos experimentais, como mamíferos, por exemplo, para elucidação do efeito carcinogênico do CPZ em doses variadas.

REFERÊNCIAS

- ADRIBLASTINA® RD: pó liofilizado injetável. Responsável técnico: José Cláudio Bumerad. Itália: Actavis Italy S.p.A., 2013. Bula de remédio.
- 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, dez. 2012.
- BARROSO-SOUSA, Romualdo; FERNANDES, Gustavo. **Oncologia**: princípios e prática clínica. Editora Manole, 2023. E-book.
- BOYD-KIMBALL, Debra; GONCZY, Katelyn; LEWIS, Benjamin; MASON, Thomas; SILIKO, Nicole; WOLFE, Jacob. Classics in Chemical Neuroscience: chlorpromazine. **Acs Chemical Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 79-88, 21 jun. 2018.
- BROWN, James S. Treatment of cancer with antipsychotic medications: pushing the boundaries of schizophrenia and cancer. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 141, p. 104809, out. 2022.
- CALABRESE, Edward J. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. **Critical Reviews in Toxicology**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 463-582, jan. 2005.
- CLORIDRATO DE CLORPROMAZINA. Responsável técnico: Cristal Mel Guerra e Silva. Ribeirão das Neves: Hypofarma – Instituto de Hypodermia e Farmácia Ltda, 2023. Bula de remédio.
- CLORPROMAZ. Responsável: técnico Florentino de Jesus Krencas. Pouso Alegre: União Química Farmacêutica Nacional S/A, 2022. Bula de remédio.
- FURTADO, S. G.; NEPOMUCENO, J. C. Redução de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*, pela enzima metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, por meio de teste wts (warts). **Perquirere**, Patos de Minas, v. 1, n. 9, p.224-240, jul. 2012.
- GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, n.2, 2006.
- LIMA, Paula Marynella Alves Pereira *et al.* Efeitos de um refrigerante carbonatado na incidência de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 240-247, 2018.
- LÓPEZ, M. M.; CARDONA, A. F. Historia del cáncer y el cáncer en la historia. **Medicina**, v. 42, n. 4, p. 528-562, octubre - diciembre 2020.

MEAZA, Idoia *et al.* Carcinogenic mechanisms of hexavalent chromium: From DNA breaks to chromosome instability and neoplastic transformation. **Current environmental health reports**, v. 11, n. 4, p. 484-546, 2024.

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

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

PORTO, José Eduardo Sant'anna. **Clorpromazina: um remédio de seu tempo**. 2018. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de História da Ciência, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2018.

RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal Of Cancer Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 853, 2014.

RYKALO, N. A.; BAYLO, O. V. Investigation of nuclear DNA content and cell cycle phases in rat liver cells under chlorpromazine administration. **Reports of Morphology**, v. 29, n. 3, p. 26-31, 2023.

SILVA, Daniel Augusto da. O paciente com câncer e a espiritualidade: revisão integrativa. **Revista Cuidarte**, p. 01-14, 1 set. 2020. Universidad de Santander - UDES.

VASCONCELOS, Mirley Alves *et al.* Efeito modulador da vitamina D3 na mutagenicidade e carcinogenicidade da doxorubicina em *Drosophila melanogaster* e estudos in silico. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, p. 111549, 2020.

WESOŁOWSKA, O. Interaction of phenothiazines, stilbenes and flavonoids with multidrug resistance-associated transporters, P-glycoprotein and MRP1. **Acta biochimica Polonica**, v. 58, p. 433-448. 2011.

XIAO, Yupeng *et al.* Recent advances in calcium-based anticancer nanomaterials exploiting calcium overload to trigger cell apoptosis. **Advanced Functional Materials**, v. 33, n. 3, p. 2209291, 2022

XU, Fuyan *et al.* Repurposed antipsychotic chlorpromazine inhibits colorectal cancer and pulmonary metastasis by inducing G2/M cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, v. 89, n. 3, p. 331-346, 24 jan. 2022.