

**POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DO ANTIDEPRESSIVO CLONAZEPAM EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

**CARCINOGENIC POTENTIAL OF THE ANTIDEPRESSIVE CLONAZEPAM IN
SOMATIC CELLS OF *Drosophila melanogaster***

Tatiene Abadia dos Reis¹
Cássio Resende de Moraes²

RESUMO: Representante da classe dos benzodiazepínicos, o fármaco Clonazepam, figura-se em relatórios de Organismos Internacionais como uma das substâncias mais consumidas no mundo. Clonazepam age no Sistema Nervoso Central (SNC) propiciando um efeito tranquilizador ao paciente, resultando em relaxamento muscular, assim como uma inibição leve das funções do SNC, facilitando uma ação anticonvulsivante. Além disso, é eficaz no controle da Fobia Social, no controle da Síndrome do Pânico, bem como na redução de quadros clínicos associados à ansiedade generalizada. Devido ao consumo do clonazepam pela população brasileira, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial carcinogênico de diferentes concentrações do medicamento, por meio do Teste para Detecção de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*. Para avaliar o efeito carcinogênico do clonazepam, Larvas de 3º estágio descendentes do cruzamento entre fêmeas virgens *wts*/TM3, *sb¹* e machos *mwh/mwh* foram tratadas com diferentes concentrações de clonazepam (0,51; 0,255; 0,127 e 0,053 mg/mL). A toxicidade do clonazepam foi mensurada por meio da taxa de moscas que sobreviveram a etapa de metamorfose após exposição. Não foi observado efeito tóxico e carcinogênico em nenhuma das concentrações testadas em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: Depressão; Teste *wts*; Câncer

ABSTRACT: Representative of the class of benzodiazepines, the drug Clonazepam, is listed in reports of International Organizations as one of the most consumed substances in the world. Clonazepam acts in the Central Nervous System (CNS) providing a reassuring effect to the patient, resulting in muscle relaxation, as well as a mild inhibition of CNS functions, facilitating an anticonvulsive action. In addition, it is effective in controlling Social Phobia, controlling Panic Syndrome, and reducing clinical pictures associated with generalized anxiety. Due to the consumption of clonazepam by the Brazilian population, the present work

-
1. Licenciada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério - UNIFUCAMP
 2. Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Mário Palmério – UNIFUCAMP. Especialista e Biotecnologia Ambiental pelo Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. Especialista em Toxicologia e Bioquímica pela Faculdade Metropolitana do Estado de São Paulo – FAMEESP. Especialista em Biologia Celular e Molecular pelo Centro Universitário FAVENI - UNIFAVENI. Mestre e Doutor em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Docente e Pesquisador pelo UNIFUCAMP. cassio.1015@hotmail.com)

aims to evaluate the carcinogenic potential of different concentrations of the drug, through the Test for Epithelial Tumor Detection in *Drosophila melanogaster*. To evaluate the carcinogenic effect of clonazepam, third instar larvae descendant of the cross between virgin *wt*s/TM3,*sb*¹ males and *mwh/mwh* males were treated with different concentrations of clonazepam (0.51, 0.255, 0.127 and 0.053 mg/mL). The toxicity of clonazepam was measured by the rate of flies that survived the post-exposure metamorphosis stage. No toxicological and not carcinogenic effects were observed at any of the concentrations tested in *D. melanogaster*.

Keywords: Depression; wts Test; Cancer

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem passou a viver em sociedade, o surgimento de doenças infectocontagiosas têm sido um evento recorrente. A preocupação relacionada a estas doenças tem levantado preocupações fundamentadas principalmente na manifestação destas no organismo, bem como a possibilidade de óbito de indivíduos contaminados.

Dentre as várias doenças já identificadas em humanos, destacam-se as de natureza neurológica. Na busca da palição dos sintomas, o homem passou a extrair da natureza ou sintetizar drogas com diferentes mecanismos psicotrópicos.

Representante da classe dos benzodiazepínicos, o fármaco Clonazepam, figura-se em relatórios de Organismos Internacionais como uma das substâncias mais consumidas no mundo (Brasil, 2011). Clonazepam age no Sistema Nervoso Central (SNC) propiciando um efeito tranquilizador ao paciente, resultando em relaxamento muscular, assim como uma inibição leve das funções do SNC, facilitando uma ação anticonvulsivante. Além disso, é eficaz no controle da Fobia Social, no controle da Síndrome do Pânico, bem como na redução de quadros clínicos associados à ansiedade generalizada (ANVISA, 1999).

No Brasil Clonazepam é comercializado na forma de Rivotril e Clonatril (produtos formulados a base de clonazepam) e o acesso ao medicamento pela população é relativamente fácil, o que têm possibilitado a automedicação, inferindo o surgimento de diferentes efeitos colaterais. Clonazepam têm alcançado proporções elevadas de venda nos últimos anos (Santos et al., 2009).

Diferentes efeitos colaterais já foram descritos quanto a depressão do SNC, sobre efeito do clonazepam, tais como, sonolência, coma, enxaqueca, fala mal articulada, tremor, vertigem, perda do equilíbrio, confusão, depressão, amnésia, alucinações, insônia, tentativa de suicídio, ansiedade e distúrbio de memória (Versiani; Nardi; Munding, 1989).

No sistema hematopoiético pode desenvolver quadros clínicos associados à anemia, leucopenia, trombocitopenia. Otite, vertigem, desidratação, febre, ganho ou perda de peso, reação alérgica e fadiga também são efeitos colaterais já descritos proporcionado pelo uso de clonazepam (Acordo Coletivo, 2012).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), o câncer compreende um grupo com mais de 100 doenças, resultante da perda do reconhecimento celular e do crescimento desordenado de células em determinado local do corpo. Esta doença pode ser caracterizada de acordo com sua origem e propriedade de invadir outros tecidos (metástase), basicamente em câncer benigno e maligno. O câncer benigno é resultante de uma massa de células cancerígenas com crescimento lento que não apresenta propriedade de metástase, enquanto o câncer maligno apresenta esta propriedade, sendo este, de difícil cura pelos oncologistas (INCA, 2014).

Segundo o INCA as causas do câncer estão relacionadas a diversos fatores, sendo eles de natureza ambiental (tabagismo, alcoolismo, radiação solar, uso de alguns medicamentos) ou hereditária (fatores genéticos). É importante levar em consideração que a carcinogenicidade de um medicamento, está associada ao risco de uma substância em promover o aparecimento de neoplasias.

Pouca informação está disponível sobre o Clonazepam ao que diz respeito a possíveis efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Matsubara; Arisawa; Maruyama, 1978; Pharlab, 1999), demonstrando a necessidade de verificar se o medicamento pode também resultar danos genéticos como efeito colateral.

Nessa perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial carcinogênico do clonazepam por meio do Teste para Detecção de Tumor Epitelial (Teste *wts*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Este é um dos poucos trabalhos que busca verificar se o clonazepam pode estar associado na conversão de células selvagens em células neoplásicas.

O Teste para detecção de tumor epitelial é um robusto teste que possibilita a detecção de diferentes xenobióticos que possam interagir direta ou indiretamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA), incrementando mutações seja por eventos aneugênicos, clastogênicos ou por alterações pontuais, levando a formação de células consideradas altamente invasivas (Nepomuceno, 2015). Vários autores ressaltam a sensibilidade do teste no rastreio de substância cancerígenas (Orsolin e Nepomuceno, 2009; Moraes et al., 2016^a; Moraes et al., 2016^b; Vasconcelos et al., 2017; Moraes et al., 2017).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agentes químicos

Clonazepam em forma de cápsula foi manufaturado pela empresa Medley Farmacêutica Ltda (Lote 16070153).

Mitomicina C (CAS 50-07-7) na formulação em pó liofilizado foi fabricado por Kyowa Hakko Kirin Co. Ltda. Shizuoka (Japão), embalado por Bristol-Myers Squibb S.r.l Sermoneta-Latina-Itália e importado por Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A.

2.2 Teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster* (Teste *wt*s)

2.2.1 Linhagens de *Drosophila*, cruzamento e tratamentos

Duas linhagens mutantes foram usadas nesse teste: Linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e linhagem *warts* (*wt*s, 3-100). A linhagem *multiple wing hairs* é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh*, localizado no cromossomo 3, em posição distal em relação ao centrômero (*mwh*, 3-0,3). Quando expresso em homozigose recessiva o gene *mwh*, produz fenótipo de pelos nas asas da mosca em formato múltiplo, diferente do fenótipo selvagem (um único pelo por célula).

A linhagem *warts* possui o marcador *wt*s no cromossomo 3, que é mantido em homozigose na presença do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹. O marcador *wt*s, quando expresso na condição selvagem, atua como um gene supressor de tumor. A deleção desse gene, e a expressão do alelo recessivo, leva à formação de clones de células que são consideradas altamente invasivas, acarretando na manifestação de tumor epitelial no corpo e apêndices da mosca.

Essas linhagens foram mantidas em estoque, em frascos contendo ¼ meio de cultura a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) em estufa B.O.D (SOLAB) em ciclos luz/escuro (12h:12h) na temperatura de 25 ± 2°C e 65 ± 5% de umidade relativa.

Foi realizado o cruzamento entre machos *mwh/mwh* e fêmeas virgens da linhagem *wt*s, [1] in [1] kni [ri-1] p [p] *wt*s [3-17]/TM3, SB [1]. Duas progênes são geradas nesse cruzamento: Progênie MH, trans-heterozigoto marcado (*mwh*^{+/+}*wt*s) e progênie BH, heterozigoto balanceado (*mwh*^{+/+}TM3, *Sb*¹). No Teste para Detecção de Tumor epitelial, apenas a progênie MH é analisada. A identificação da progênie é feita mediante a expressão do balanceador cromossômico TM3, *Sb*¹, que apresenta fenótipo de pelos curtos e espessos no corpo da mosca, o que difere da progênie MH, com fenótipo de pelos longos e finos.

A coleta de ovos do cruzamento *mwh*^{+/+}*mwh* x *wts*^{+/}TM3, *Sb*¹ ocorreu dentro do período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura a base de ágar (4%) e fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água ultrapura Miliq (Millipore) e coletadas com auxílio de peneira de malha fina. Posteriormente, as larvas foram submetidas a tratamento crônico (48 horas) até completar o processo da metamorfose. As larvas foram colocadas em *vials* (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de comprimento) contendo 1,5 g de purê de batatas (Yoki® Alimentos S.A) e 5 mL de solução de clonazepam nas concentrações 0,51; 0,255; 0,127 e 0,063 mg/mL de dieta. As concentrações usadas foram escolhidas seguindo a seguinte linha de raciocínio: A segunda maior concentração foi escolhida por ser a usual pelo homem, seguida de duas concentrações abaixo da usual e a maior concentração para verificar o efeito do uso indiscriminado do clonazepam.

Paralelo ao teste *wts*, neste estudo, foi avaliado a toxicidade das drogas em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. A toxicidade foi mensurada pela taxa de indivíduos que completaram o processo de metamorfose após o tratamento crônico (48 horas).

O teste *wts* foi acompanhado de controle negativo, água ultrapura e controle positivo, mitomicina C (MMC) na concentração de 0,1 mM. Esta concentração foi baseada em estudos de recombinação mitótica em *D. melanogaster* (Tsuda e Takeda, 1987) e ensaios de carcinogênese (Orsolin e Nepomuceno, 2009; Orsolin; Silva-Oliveira; Nepomuceno, 2012).

2.2.2 Fixação de moscas e análise de tumor epitelial

Para análise de tumor epitelial, adultos eclodidos do cruzamento *mwh*^{+/+}*mwh* x *wts*^{+/}TM3, *Sb*¹ foram fixados em etanol 70% (v/v) e analisados sob lupa estereoscópica (Bel® Photonics) em placa de petri com glicerina. A análise baseou-se na contagem de tumores de acordo com a descrição de Justice et al (1995). Os resultados foram registrados em um diagrama padrão expressando os números de tumores observados em cada parte do corpo das moscas: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres.

2.2.3 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre a frequência de tumores epiteliais nas concentrações testadas e os controles (negativo e positivo) foram calculadas usando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, utilizando o nível de significância $P < 0,005$.

Comparações estatísticas referentes à taxa de sobrevivência das moscas tratadas com as drogas e os controles (negativo e positivo) foram feitas com o teste do Chi-quadrado para razões de amostras independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi avaliado a toxicidade e o potencial carcinogênico do antidepressivo clonazepam em *D. melanogaster*. Como apresentado na **Figura 1** não foi observado efeito tóxico em *D. melanogaster* em nenhuma das concentrações testadas.

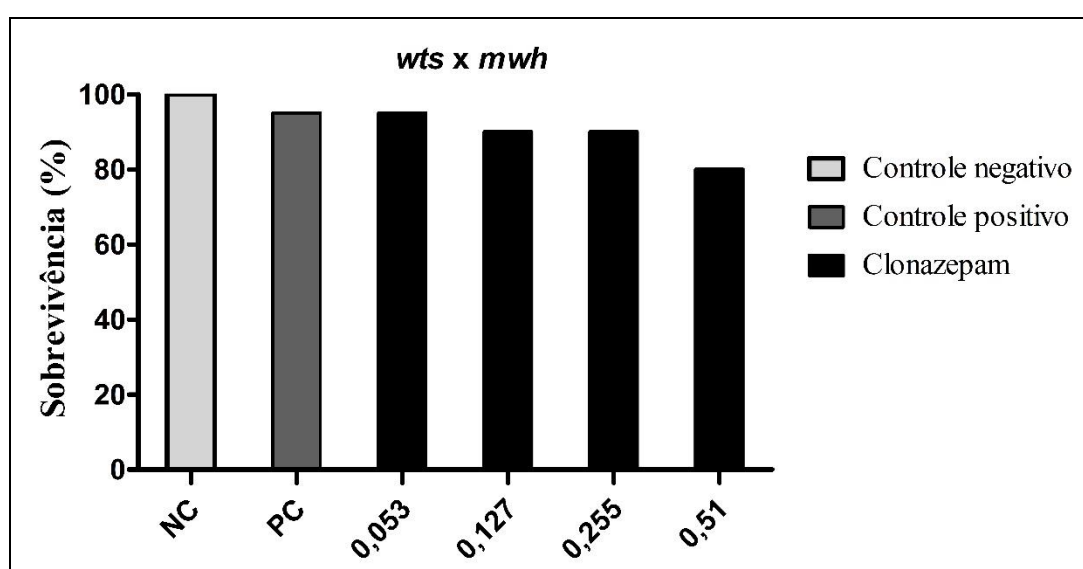


Figura 1. Taxas de sobrevivência dos descendentes de *Drosophila melanogaster* resultantes dos cruzamentos *mwh/mwh* e *wts/TM3, sb^l*, tratadas cronicamente com diferentes concentrações de clonazepam. NC = Controle negativo (Água); PC = Controle positivo (Mitomicina C: 0,1 mM).

Para avaliar o efeito carcinogênico do antidepressivo clonazepam foi utilizado como ferramenta biológica de rastreio de agentes indutores de danos genéticos, o Teste para Detecção de Tumor Epitelial em células somáticas de *D. melanogaster*. O resumo dos resultados está apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Frequência de tumor epitelial observados em descendentes heterozigotos para o gene supressor de tumor *wts* de *D. melanogaster* tratados com diferentes concentrações do antidepressivo Clonazepam (CLOP) e Mitomicina-C (MMC)

Tratamento mg/mL	Número de indivíduos	Número de tumores analisados (total de tumores)						
		olhos	cabeça	asas	corpo	pernas	halteres	Total
Controle negativo	200	0,005 (01)	0,000 (00)	0,015 (03)	0,075 (15)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,100 (20)
Controle positivo	130	0,138 (18)*	0,115 (15)*	2,138 (278)*	0,823 (107)*	0,300 (39)*	0,046 (06)*	3,561 (463)*
CLOP 0,51	200	0,000 (00)	0,000 (00)	0,005 (01)	0,065 (13)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,008 (16)
CLOP 0,255	200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,075 (15)	0,005 (01)	0,005 (00)	0,090 (18)
CLOP 0,127	200	0,000 (00)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,125 (25)*	0,000 (00)	0,000 (00)	0,125 (25)
CLOP 0,063	200	0,000 (00)	0,005 (01)	0,020 (04)	0,065 (13)	0,010 (02)	0,000 (00)	0,100 (20)

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

* Valores considerados diferentes do controle negativo ($P \leq 0,05$). Controle negativo: Água ultrapura; Controle positivo: Mitomicina C.

Para interpretação dos resultados foi utilizado o diagnóstico estatístico de Mann-Whitney, onde foi comparado a frequência de tumores presentes em todo o corpo das moscas tratadas com clonazepam com o controle negativo. Os resultados obtidos nessa pesquisa, indicaram baixa frequência de tumor epitelial (**Tabela 1**), não diferindo do controle negativo, evidenciando, portanto, ausência de efeito carcinogênico.

Embora tenha um considerável número de dados toxicológicos do clonazepam (Gatsonis et al., 2003), poucos dados estão disponíveis na literatura ao que diz respeito a análise dos efeitos de clonazepam sobre a instabilidade genética (Matsubara; Arisawa; Maruyama, 1978; Iqbal et al., 2015).

Os resultados aqui observados entram em concordância com Matsubara, Arisawa e Maruyama (1978). Estes autores avaliaram a capacidade mutagênica de diferentes concentrações de Clonazepam, por meio do Teste Ames em diferentes linhagens de bactéria. Não foi identificado efeito mutagênico em nenhuma das concentrações analisadas.

Iqbal et al. (2015) avaliaram o risco indireto de diferentes tipos de câncer devido a exposição crônica a diferentes Benzodiazepínicos (BZDs). Estes autores basearam seu trabalho na observação de pacientes (42500) com uso crônico de BZDs (12 – 20 anos) e constaram que o uso crônico de clonazepam está diretamente associado ao surgimento de câncer em diferentes tecidos.

O presente trabalho aqui apresentado é de relevância científica devido a carência de dados do medicamento quanto aos seus efeitos genotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Neste sentido, destacamos a necessidade de mais pesquisas com o clonazepam, visando sobretudo garantir seu consumo, pela população com um maior padrão de segurança toxicológica.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir, que nestas condições experimentais, nas concentrações testadas e em *Drosophila melanogaster* o antidepressivo Clonazepam não desempenha atividade tóxica ou carcinogênica.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Modelo de bula com informações técnicas aos profissionais de saúde - Epileptil® clonazepam. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9939712015&pIdAnexo=2945502>. Acesso em 03 Abril de 2017.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC, Brasília, v.1, n.1. 2011.

FILHO, J. P. Efeitos do Rivotril. Disponível em: <<https://acordocoletivo.org/2012/02/21/efeitos-do-rivotril/>>. Acesso em 10 Abril de 2017.

GATZONIS, S; KARADIMAS, P; GATZONIS, S; BOUZAS, E. A. Clonazepam associated retinopathy. Eur J Ophthalmol, v. 13, n. 9, 813-815, 2003.

Instituto Nacional de Câncer – INCA O que é o câncer?. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 15 Janeiro de 2016.

IQBAL, U; NGUYEN, P.A; SYED-ABDUL, S; YANG, H.C; HUANG, C.W; JIAN, W.S; HSU, M.H; YEN, Y; YU-CHUAN, J. Is long-term use of Benzo Diazepine a risk for câncer? Medicine, v. 96, n.6, 2015.

MANGINI, Z, A.; CAPONI, S, N, C.. Condicionantes relacionados ao uso crônico de clonazepam no Brasil: uma história de vida. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/viewFile/1984-8951.2014v15n106p117/pdf_4>. Acesso em: 15 Janeiro de 2016.

MAROT, R. PSICOSITE: Psicofármacos / Ansiolíticos Disponível em : <<http://www.psicosite.com.br/far/ans/rivotril.htm>>. Acesso em 30 Dezembro de 2016.

MATSUBARA, E; ARISAWA, M.; MARUYAMA, H. B.. Mutagenic evaluation using in vitro and in vivo bacterial tests. Mutation Research, v. 57, n.1, p. 17-26, 1978.

MORAIS, C. R^a.; BONETTI, A. M.; CARVALHO, S. M.; REZENDE, A. A. A.; ARAUJO, G. R.; SPANÓ, M. A.. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of Fipronil insecticide in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Chemosphere, v. 165, p. 342-351, 2016.

MORAIS, C. R^b.; VIEIRA, T. C.; BORGES, R. M.; GUIMARÃES, L. M. M.; BARCELOS, L. A.; SOUZA, F. C.; PIMENTEL, L. S.; SILVA, J. C.; VASCONCELOS, M. A.; RODRIGUES, T. S.; SOUSA, F. A.; REZENDE, A. A. A.; SPANÓ, M.; BONETTI, A. M.. Assessment of carcinogenic potential of soft drinks of cola, diet cola, orange and lemon, produced in the city of Uberlândia, Minas gerais state, Brazil. Bioscience Journal, v. 32, p. 1025-1039, 2016.

ORSOLIN, P. C.; NEPOMUCENO, J. C.. Potencial carcinogênico do açafrão (*Curcuma Longa L*) identificado por meio do teste para detecção de clones de tumor em *Drosophila melanogaster*. Perquiere, v. 6, p. 55-69, 2009.

PHARLAB INDÚSTRIA FARMACÊUTICA S.A. Clonazepam. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=16250162016&pIdAnexo=3376913>. Acesso em: 02 Março de 2017.

SANTOS, H. C.; RIBEIRO, R. R.; FERRARINI, M.; FERNANDES, J. P. S.. Possíveis interações medicamentosas com psicotrópicos encontradas em pacientes da Zona Leste de São Paulo. Revista Ciências Farmaceutica Básica Aplicada. 2009; v30(3):285-289.

VASCONCELOS, M. A.; ORSOLIN, P. C.; OLIVEIRA, R. G. S.; NEPOMUCENO, J. C.; SPANÓ, M. A.. Assessment of the carcinogenic potential of high intense sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, V.101, P.1-7, 2017.

VERSIANI, M.; NARDI, A. E.; MUNDIN, F. D.. Fobia Social. Jornal Brasileira Psiquiatria set/out 1989; v38. N5 :251-263. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Nardi/publication/290346682_Social_phobia/links/569d0b1708ae27633ac97e3f.pdf>. Acesso em 10 Abril de 2017.

ZYDUS NIKKHO FARMACÊUTICA Ltda. Clonazepam. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9382862015&pIdAnexo=2911428>. Acesso em 03 Abril de 2017