

Avaliação do efeito carcinogênico do bromazepam em *Drosophila melanogaster*

Evaluation of carcinogen bromazepam effect in Drosophila melanogaster

Matheus Vendramini Furtado Amaral^{1*}, Eythor Ávila Reis¹, Priscila Capelari Orsolini²

¹Acadêmico do Curso de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas;

²Doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia, Docente do Curso de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas

Resumo

Introdução: embora o câncer seja um dos maiores problemas de saúde pública enfrentados mundialmente, diversas substâncias presentes no meio, como os fármacos, não estão muito bem elucidadas sobre seu possível potencial carcinogênico. Entre eles, estão os benzodiazepínicos, fármacos que possuem crescente aumento do consumo desde o século XX e, principalmente, na segunda década do século XXI, por suas ações ansiolíticas, sedativas e anticonvulsivantes. **Objetivo:** avaliar o efeito carcinogênico do bromazepam por meio do teste para detecção de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. **Metodologia:** para realização do ETT foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *wts* (fêmeas) e *mwh* (machos). As larvas descendentes desse cruzamento foram tratadas isoladamente com cinco concentrações de bromazepam, sendo elas: 0,0375; 0,075; 0,15; 0,30 e 0,60 mM. A Doxorubicina foi utilizada como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo. Após tratamento, coleta e armazenamento, as moscas foram analisadas, identificando-se as frequências tumorais, por região corporal, em cada concentração testada. **Resultados:** o bromazepam não apresentou efeito carcinogênico em nenhuma das concentrações experimentadas neste estudo, não havendo diferença estatisticamente significativa nas frequências tumorais observadas nos indivíduos tratados com bromazepam quando comparadas à frequência obtida nos indivíduos tratados com o controle negativo. **Conclusão:** Nas presentes condições experimentais, o bromazepam não apresentou atividade carcinogênica, no entanto, há a necessidade de novos estudos, com diferentes metodologias e diferentes organismos testes, para a maior compreensão da ação do bromazepam no organismo.

Palavras-chave: Carcinogênese. Bromazepam. *Drosophila melanogaster*.

Abstract

Introduction: although cancer is one of the biggest public health problems faced worldwide, several substances present in the environment, such as drugs are not very well understood about its possible carcinogenic potential. Among them are benzodiazepines, drugs that have increased their consumption since the 20th century and, mainly, in the second decade of the 21st century, due to their anxiolytic, sedative and anticonvulsant actions. **Objective:** Evaluate the carcinogenic effect of bromazepam through the test to detect epithelial tumor clones (ETT) in *Drosophila melanogaster*. **Methodology:** to perform the ETT, two mutant strains of *D. melanogaster* were used: *wts* (female) and *mwh* (male). The descending larvae of this cross were treated separately with five concentrations of bromazepam, namely: 0.0375; 0.075; 0.15; 0.30 and 0.60 mM. Doxorubicin was used as a positive control and ultrapure water as a negative control. After treatment, collection and storage, the flies were analyzed, identifying the tumor frequencies, by body region, at each concentration tested. **Results:** bromazepam did not have a carcinogenic effect at any of the concentrations experienced in this study, with no statistically significant difference in tumor frequencies observed in individuals treated with bromazepam when compared to the frequency obtained in individuals treated with the negative control. **Conclusion:** In the present experimental conditions, bromazepam did not show carcinogenic activity, however, there is a need for further studies with different methodologies and different test organisms to better understand the action of bromazepam in the body.

Keywords: Carcinogenesis. Bromazepam. *Drosophila melanogaster*.

INTRODUÇÃO

A era dos benzodiazepínicos, fármacos que possuem ação ansiolítica, sedativa e anticonvulsivante, foi instaurada em 1960, com o primeiro elemento da série, o clordiazepóxido, o qual possuía a ideia de segurança e incapacidade de causar dependência, substituindo, então, os barbitúricos. Na década de 1970, os casos de dependência foram verificados, o que resultou no esta-

becimento de medidas de controle adotadas em vários países pelo uso mais racional. Apesar disso, a utilização atual ainda é exagerada, sendo os benzodiazepínicos indicados como as substâncias de uso controlado mais consumidas pelos brasileiros entre os anos de 2007 e 2010 (COMHUPES, 2013).

A elevada presença quantitativa dos benzodiazepínicos é explicada pela necessidade da medicalização da sociedade ultramoderna, em que pressões cotidianas, afetam o equilíbrio psicológico e provocam determinadas situações, como o estresse e a ansiedade, aumentando o consumo dos fármacos (ALVIM *et al.*, 2017; SILVEIRA

Correspondente/Corresponding: *Matheus Vendramini Furtado do Amaral – End.: Rua Pedra Azul, 484, Bairro Alto Caiçaras – Tel: (34) 99928-2088 – E-mail: matheusvendraminii13@gmail.com

JÚNIOR, 2015). Além disso, o consumo é agravado pela facilidade de adquirir o medicamento por baixo custo e pela falta de orientação, podendo causar o aumento da automedicação e do uso sem o conhecimento acerca dos possíveis riscos e efeitos adversos (SILVEIRA JÚNIOR, 2015).

O uso de benzodiazepínicos pela população brasileira possui uma crescente elevação, aumentando o consumo em 72% entre os anos de 2010 e 2012. Esse acréscimo pode ser justificado pelo aumento de fatores que geram ansiedade, como o desemprego elevado e a falta de religião. Porém, por ter consequências ainda pouco compreendidas nas diversas esferas do corpo humano, a utilização exacerbada de tais fármacos pode ser prejudicial. Além disso, diversos estudos revelam a capacidade dos benzodiazepínicos em modificar a resposta imunológica, favorecendo o desenvolvimento de doenças, como o câncer (AZEVEDO *et al.*, 2016; SAKAI, 2009).

Desse modo, a utilização exagerada dos benzodiazepínicos, muitas vezes sem a orientação adequada, pode provocar alguns efeitos prejudiciais ao organismo. O principal mecanismo de ação descrito para os efeitos biológicos dos benzodiazepínicos decorre da sua interação, no sistema nervoso central, com o complexo formado pelo receptor do ácido gama aminobutírico A (GABA_A) e canais de cloro. Atualmente, sabe-se, porém, que existem outros sítios de ligação para os benzodiazepínicos, sendo eles: o receptor periférico para benzodiazepínicos (PBR) e a proteína translocadora (TSPO), a qual é expressa tanto em células normais quanto em células tumorais. Estudos demonstram que as ações *in vivo* do diazepam, medicamento do grupo dos benzodiazepínicos, podem promover aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SAKAI, 2009), as quais, em concentrações inadequadas, podem desencadear diversas patologias, como o câncer (GOUVEIA, LIMA, 2017).

Nesse ínterim, vale ressaltar que o câncer, doença com estimativa atual de 600 mil novos casos por ano, é estimulado por agentes mutagênicos e recombinogênicos, que podem favorecer o estabelecimento de danos no DNA (BRASIL, 2017). Quando esses danos não são reparados, podem culminar na desorientação das atividades celulares. As causas dessa doença são diversas e o aumento do risco pode estar associado a fatores ambientais, como o uso de alguns fármacos e alimentos, os quais podem, em algumas circunstâncias, predispor ao câncer (ALLGAYER, 2018; GOLDMAN; AUSIELLO, 2010).

A carcinogênese é o processo formador do câncer e o modo de proliferação celular depende diretamente do efeito dos agentes carcinogênicos. Nessa perspectiva, esse processo é determinado pela exposição a esses potenciais agentes, os quais influenciam para a formação do câncer por meio da frequência, do período de tempo de ação e pela interação entre eles. Esse processo é originado pelo estágio de iniciação, no qual o gene sofre ação dos agentes cancerígenos, modificando-o. Em

segundo lugar, as células geneticamente alteradas sofrem ação dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores, anunciando o estágio de promoção. Posteriormente, o estágio de progressão caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, evidenciando a instalação do câncer (BRASIL, 2020).

Desde o final do século XX, diante dos efeitos negativos do câncer, houve progresso do desenvolvimento de testes de genotoxicidade e de mutagenicidade preditivos do potencial carcinogênico de diferentes agentes. Tais testes tornam viável a avaliação da toxicidade de substâncias, por intermédio da identificação dos fatores de risco de natureza química, como os fármacos (ALMEIDA, 2015).

Dentre esses meios para avaliação há o teste para detecção de clones de tumores epiteliais (Epithelial Tumor Test – ETT), o qual utiliza duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*: *mhw* e *wts* (LIMA *et al.*, 2018; NEPOMUCENO, 2015; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2017). A linhagem *mhw* é mantida em homocigose recessiva para o marcador *mhw*, localizado no cromossomo 3, na posição distal ao centrômero (*mhw*, 3-0,3), apresentando fenótipo de pelos múltiplos nas asas da mosca, diferente do fenótipo selvagem, o qual apresenta somente um pelo por célula. Já a linhagem *wts* apresenta o marcador *wts* no cromossomo 3, conservado em homocigose na presença do balanceador cromossômico *TM3, Sb*. Desse modo, o marcador *wts* atua como um gene supressor de tumor quando expresso em fenótipo selvagem (MORAIS, 2015). Considerando o exposto, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar o efeito carcinogênico do bromazepam por meio do ETT em *D. melanogaster*.

METODOLOGIA

AGENTES QUÍMICOS

O agente testado foi o bromazepam (CAS 1812-30-2; Lote L9KP15071) produzido pela Medley Indústria Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil. Cada comprimido de 6mg possui: celulose microcristalina, azul de indigotina, laca de alumínio, óxido de ferro amarelo, dióxido de silício, estearato de magnésio, lactose monoidratada e talco (BROMAZEPAM, 2018). No trabalho foram utilizadas cinco diferentes concentrações de bromazepam, sendo elas: 0,0375 mM, 0,075 mM, 0,15 mM, 0,30 mM e 0,60 mM, determinadas com base no estudo de Okada *et al.* (2012).

Para atuar como agente indutor de tumor e controle positivo foi utilizado o cloridrato de Doxorubicina (DXR), denominado comercialmente como Adriblastina® (CAS 25316-40-9; Lote 19H0693), apresentando atividade recombinogênica e carcinogênica comprovada em *D. melanogaster* (BRAGA *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2012; SANTOS; LAHLOU; ORSOLIN, 2018; VASCONCELOS *et al.*, 2017). O

mesmo é produzido pelo laboratório Pfizer sob a forma de ampola com conteúdo de 50mg. O acondicionamento é feito no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas sob condições ideais de temperatura e ausência de luz. O medicamento foi preparado a partir da adição de 0,03538g de Adriblastina® em 25 mL de água osmose reversa ultrapura, obtendo uma concentração final de 0,4 mM.

LINHAGENS, CRUZAMENTOS E TRATAMENTO EXPERIMENTAL

Para realização do ETT foram utilizadas experimentalmente duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *wts* e *mwh*, portadoras dos marcadores genéticos warts (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs*, (3-03). A linhagem *wts* foi fornecida pelo Bloomington Drosophila Stock Center, da Universidade de Indiana nos Estados Unidos (USA). Já a linhagem *mwh/mwh* foi cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland) (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Os estoques destas linhagens são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas e mantidas em frascos contendo meio de cultura para *D. melanogaster*. As linhagens são conservadas dentro de uma incubadora B.O.D. 411 D, a uma temperatura aproximada de 25° C e 60% de umidade, com fotoperíodo controlado, com 12 horas de claro e 12 horas de escuro alternadas (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Para obtenção de larvas heterozigotas (*wts+/+mwh*) foi realizado o cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3,Sb1* com machos *mwh/mwh*, em meio de cultura de banana. Machos e fêmeas foram colocados, após 48 horas, em frascos com meio próprio para postura (fermento e açúcar), para a deposição de ovos pelas fêmeas, onde permaneceram por um período médio de 8 horas. As larvas de 72 horas, provenientes desse cruzamento, foram recolhidas em peneira de malha fina, lavadas e, posteriormente, tratadas com bromazepam em cinco concentrações e os respectivos controles: positivo (doxorrubicina) e negativo (água ultrapura).

Após uma semana do tratamento, as moscas eclodidas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo etanol a 70%. Feito isso, foram separadas quanto ao fenótipo (somente moscas portadoras de pelos finos e longos apresentam o gene *wts*; desse modo, moscas com fenótipo de pelo curto e grosso são descartadas).

Para análise das moscas foram utilizadas lupas estereoscópicas e pinças entomológicas. O registro das frequências tumorais foi efetuado em uma planilha padrão, onde foram contabilizados os tumores identificados em cada região (asa, cabeça, corpo, olho, perna, halteres), em cada concentração testada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores nas cinco concentrações testadas de bromazepam e os controles foram calculadas por meio do teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a carcinogenicidade do bromazepam por meio do ETT, realizado em *D. melanogaster*. Na Tabela 1 é possível verificar a frequência de tumores epiteliais nos diferentes segmentos corporais da *D. melanogaster*. Para controle negativo foi utilizada água ultrapura, evidenciando uma frequência de 0,29 tumor/mosca, em um total de 200 moscas analisadas. Essa discreta indução tumoral ocorre devido à predisposição genética intrínseca do organismo teste e a ocorrência aleatória/espontânea de alterações genéticas (ALVES; NEPOMUCENO, 2012; BRAGA *et al.*, 2018). Por outro lado, as moscas submetidas ao tratamento com doxorrubicina (DXR) (0,4mM) acusaram uma frequência de 2,65 tumores/mosca, demonstrando a indução tumoral do controle positivo.

A DXR possui um caráter citotóxico, principalmente por meio de um efeito sobre a topoisomerase II, uma enzima DNA girase que possui atividade aumentada em células em proliferação (RANG *et al.*, 2016). Quando a DXR interage com essa enzima, sua ação é inibida, o que gera quebras na cadeia de DNA e, conseqüentemente, na síntese de RNA DNA-dependente (BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004; BRUNTON, 2006). Evidências sugerem também que as antraciclina, como a DXR, atuam na formação de ligações com os grupos fosfolipídeos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de íons, além de promoverem a formação de radicais livres de oxigênio e da semiquinona, por meio de um processo redutor enzimático (KATZUNG; TRAVOR, 2017). Dessa forma, é possível compreender o papel carcinogênico e genotóxico da substância, além de sua utilização como controle positivo.

Os resultados mostram também que o bromazepam não apresentou efeito carcinogênico em nenhuma das concentrações experimentadas neste estudo, uma vez que as frequências totais de tumores nas concentrações 0,0375; 0,075; 0,15; 0,3 e 0,6 mM foram, respectivamente, 0,33; 0,43; 0,20; 0,24 e 0,23 tumor/mosca, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparadas à frequência obtida nos indivíduos tratados com o controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de clones de tumores observados em *D. melanogaster*, heterozigotas para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com diferentes concentrações de bromazepam isoladas.

Tratamentos Bromazepam DXR (mM) (mM)	Número de moscas analisadas	Número de Tumores analisados							Total	Frequência (nº de tumores/mosca)
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
0 0	200	0	3	7	42	3	3	58	0,29	
0 0,4	200	9	26	236	137	108	17	530	2,65*	
0,0375 0	200	0	5	13	34	4	8	65	0,33	
0,075 0	174	1	12	9	48	1	4	75	0,43	
0,15 0	200	0	11	3	22	0	5	41	0,20	
0,3 0	184	0	10	3	27	3	2	45	0,24	
0,6 0	200	0	8	7	20	4	7	46	0,23	

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$. * Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa

O câncer é uma doença da expressão descontrolada de genes, caracterizando uma doença genética. A origem desse descontrole deve-se, parcialmente, a condições que desvirtuam e dificultam a manutenção da estabilidade genômica. Exposição crescente do homem a agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos, contribui para a crescente incidência da doença. Logo, a identificação desses fatores é de extrema importância para o estudo de estratégias de controle e prevenção (HOFF *et al.*, 2013).

O entendimento sobre os mecanismos que envolvem o câncer em humanos é pautado, dentre outros métodos, em estudos baseados na conservação evolutiva de genes entre *Drosophila* e mamíferos. Existe certa homologia entre numerosos proto-oncogenes e supressores de tumor nos mamíferos e os genes do organismo teste, com destaque para o *wts*, reconhecido como um supressor de tumor em *Drosophila* e homólogo ao gene supressor de tumor LATS1 em mamíferos. A deleção desse gene proporciona o desenvolvimento de clones de células arredondadas e consideravelmente invasivas, caracterizadas como verrugas (*warts*) que se propagam por todo o corpo da mosca (EEKEN *et al.*, 2002; JUSTICE *et al.*, 1995). Além da relativa conservação evolutiva entre mamíferos e a *Drosophila*, as moscas das frutas são de fácil manuseio, possuem período de vida curto, alta reprodutividade e baixo custo de cultivo, fatores que tornam vantajosa sua utilização como modelo experimental (GRIFFITHS *et al.*, 2016; NEPOMUCENO, 2015; TAKAI *et al.*, 2020). A mosca é utilizada desde 1906 em estudos de genética, visto que seus genes possuem cerca de 60% de homologia com os genes de doenças humanas (TONI *et al.*, 2002).

Existe uma escassez de estudos que investiguem a carcinogenicidade do bromazepam tanto em drosófilas, como em outros animais. Por provocar um aumento na abertura de canais membranáceos de íons cloreto nos neurônios, potencializando a ação do neurotransmissor

inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), esse medicamento é utilizado para ansiedade, tensão e outras queixas somáticas ou psicológicas relacionadas à síndrome de ansiedade (LEXOTAN, 2019). Nesse sentido, é perceptível o quão frequente é sua indicação e a necessidade de conhecer melhor os efeitos dessa substância, para minimizar as chances de danos.

Os benzodiazepínicos atuam em uma ampla variedade de estruturas corporais, sendo que após seu metabolismo inicial, eles podem agir em três tipos de receptores específicos diferentes que promovem ligações de alta afinidade, são eles: ômega 1, localizados no cerebelo; ômega 2, majoritariamente na medula espinhal e núcleo estriado; e ômega 3, encontrado nos rins (GRALLERT *et al.*, 2003). Além disso, houve a descoberta de um novo sítio de ligação para os benzodiazepínicos conhecido como Receptor Periférico para Benzodiazepínicos (PBR), encontrado dentre outros locais, em células do sistema imune como macrófagos e neutrófilos e em células tumorais. Nesse contexto, a administração de benzodiazepínicos proporcionou uma ação depressora do sistema imune, com redução dos índices de espriamento e fagocitose, em ratos (SAKAI, 2009).

Apesar de não terem sido encontradas muitas informações acerca da carcinogênese do bromazepam em animais, alguns benzodiazepínicos são conhecidos por promoverem alterações celulares observadas em experimentos com outros animais. Dessa forma, torna-se relevante realizar uma comparação entre os resultados produzidos por esse estudo e os dados literários disponíveis acerca da carcinogênese de outros compostos químicos pertencentes a essa mesma classe farmacológica.

Segundo Kallay *et al.* (2019), o papel dos benzodiazepínicos na carcinogênese tem caráter ambíguo devido a sua ampla possibilidade de interações com receptores. A fim de entender a fisiologia dos receptores GABA_A em meduloblastoma, os autores verificaram que benzodia-

zepínicos interagem não só com os receptores de GABA, mas também podem se ligar a sítios alternativos. Um deles é o canal periférico de benzodiazepina TSPO, que proporciona aumento da função mitocondrial e proliferação celular. Por outro lado, sua interação com o receptor $\alpha 5$ -GABA_AR constitui um alvo terapêutico para a ligação de benzodiazepínicos, uma vez que estimula mecanismos apoptóticos derivados de um desequilíbrio iônico.

Experimento realizado por Parkinson *et al.* (2006) analisou a interferência de diazepam e oxazepam na expressão de enzimas do complexo citocromo P450. Para isso, as substâncias foram administradas em ratos e camundongos (nas concentrações de 25, 125, 2500, 5000, ou 10.000 partes por milhão), por 10 dias. Os resultados mostraram que as duas substâncias são indutoras de CYP2B em ratos e CYP2B e CYP4A em camundongos nas maiores doses, que previamente já haviam demonstrado a capacidade de gerar tumores no fígado de camundongos, órgão responsável pelo metabolismo do medicamento.

No estudo conduzido por Diwan *et al.* (1989) foi abordada a possibilidade de carcinogênese em camundongos induzida por clonazepam, por meio da análise do surgimento de tumores hepáticos. Para isso, a composição da dieta dos animais envolveu 0,068% ou 0,136% da substância estudada. A conclusão do estudo foi que, diferente do Oxazepam e do Diazepam, o Clonazepam não demonstrou a tendência de desenvolver os tumores no fígado dos camundongos.

Em concordância com esse experimento, Constante *et al.* (2017) testaram o efeito mutagênico e/ou recombinogênico do clonazepam, por meio do Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*. Os autores verificaram a ausência do efeito do agente isolado em todas as concentrações testadas nos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB). Constante *et al.* (2017) também testaram o efeito carcinogênico do clonazepam por meio do ETT em *D. melanogaster*. O fármaco, nas concentrações de 25, 50 e 100 mM, também não demonstrou efeito carcinogênico.

Além de verificarem a ausência de carcinogenicidade, Constante, Oliveira e Silva-Oliveira (2016) testaram o efeito anticarcinogênico do clonazepam por meio do ETT. Os resultados mostraram uma redução no número de tumores, estatisticamente significativa, em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle positivo, permitindo-se concluir que o agente foi capaz de reduzir a ocorrência de tumores induzidos pela doxorubicina em *D. melanogaster* (CONSTANTE; OLIVEIRA; SILVA-OLIVEIRA, 2016). Ainda em outro estudo com o clonazepam, Oliveira *et al.* (2019) avaliaram os efeitos modulatórios do fármaco contra a mutagenicidade induzida por doxorubicina, por meio do teste SMART, também em *D. melanogaster*. Concluíram que o agente foi capaz de reduzir significativamente a frequência total de manchas mutantes em todas as concentrações do cruzamento de ST e HB, possivelmente por suas capacidades antioxidantes e indução apoptótica através das vias de canais iônicos.

Outra pesquisa avaliou a toxicidade e carcinogenicidade do estazolam, outro benzodiazepínico, via dieta, em ratos Sprague-Dawley (0,5, 2 e 10 mg/kg/dia) e em camundongos B6C3F1 (0,8, 3 e 10 mg/kg/dia). Em ratos, não foram observadas alterações biologicamente significativas em relação à mortalidade, sinais clínicos, consumo de alimentos ou ocorrência de massas palpáveis. Os camundongos foram mais responsivos ao estazolam, porém, embora tenha sido verificado o aparecimento de hiperplasia nodular do fígado relacionada à dose, os tumores benignos e malignos espontâneos observados em todos os grupos não foram considerados relacionados ao medicamento. Com base nos resultados desses estudos, o estazolam não foi considerado carcinogênico quando administrado por dieta nas condições experimentais mencionadas.

Peng *et al.* (2020) conduziram uma meta-análise para analisar a associação entre o uso de drogas hipnóticas e o risco de câncer. Concluíram que o uso de hipnóticos de dose mais baixa e exposição mais curta aos hipnóticos não parece estar associado a um risco aumentado de câncer. Além disso, o uso de benzodiazepínicos de efeito ansiolítico parece ter menor risco do que os sedativos benzodiazepínicos. Uma alta heterogeneidade foi observada entre os estudos identificados, e os resultados foram inconsistentes em alguns subgrupos. Os autores sugerem a necessidade de realização de ensaios de controle randomizados para confirmar as descobertas no futuro.

Além dos estudos mencionados, que demonstram a ausência de carcinogenicidade de outros benzodiazepínicos, O'Donnell, Nicholson e Boland (2019) reforçam que evidências existentes atualmente não mostram associação entre o uso de benzodiazepínicos em pacientes com câncer, nem diminuição da sobrevida. Segundo os autores, esses achados são particularmente importantes quando se considera que pacientes com câncer geralmente apresentam sintomas angustiantes, como ansiedade ou dispneia, que podem ser tratados com benzodiazepínicos.

CONCLUSÃO

O Teste de Tumores Epiteliais em *D. melanogaster* permitiu verificar que o bromazepam não foi carcinogênico em nenhuma das concentrações testadas, uma vez que não houve diferença significativa entre as frequências tumorais (nas cinco concentrações testadas) e a frequência observada nos indivíduos tratados com o controle negativo. No entanto, ressalta-se a necessidade de novos estudos, com diferentes metodologias e diferentes organismos testes, para a maior compreensão da ação do bromazepam no organismo.

REFERÊNCIAS

ALLGAYER, N. Avaliação do potencial mutagênico e recombinogênico de fármacos através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*: Revisão. *Revinter*, [S.l.], v. 11, n. 02, p. 40-49, jun. 2018.

- ALMEIDA, G. M. **Dificuldades na padronização de metodologias in vitro (ensaio cometa e Teste do micronúcleo) no estudo da carcinogênese de leucemias e linfomas**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- 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**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 125-140, 2012.
- ALVIM, M. M. *et al.* Prevalência e fatores associados ao uso de benzodiazepínicos em idosos da comunidade. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol**, Rio de Janeiro, v.20, n. 4, p. 463-473, 2017.
- AZEVEDO, A. J. P. *et al.* Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos: uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. **Ciência Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 83-90, jan. 2016.
- BITTENCOURT H. N. S.; BRUNSTEIN C. G. **Fármacos antineoplásicos**. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica Racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BRAGA, D. L. *et al.* Ethanolic extracts from azadirachta indica leaves modulate transcriptional levels of hormone receptor variant in breast cancer cell lines. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 19, n. 7, 2018.
- BRASIL. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- BRASIL. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA). **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2020.
- BROMAZEPAM: comprimidos. **Responsável técnico Mauricio R. Marante**. Campinas: Sanofi Medley Farmacêutica Ltda., 2018. Disponível em: <https://www.qualidoc.com.br/file/general/Bula-1023535.Bromazepam6mg30ComprimidosMedleyGenerico.pdf>. Acesso em: 29 set. 2021.
- BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.
- COMPLEXO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS (COMHUPES). Benzodiazepínicos: características, indicações, vantagens e desvantagens. **Diretrizes clínicas**. abr. 2013. Disponível em: http://www2.ebserh.gov.br/documents/1975526/2520527/Diretriz_27_Benzodiazepinicos_caracteristicas_indicacoes_vantagens_e_desvantagens.pdf/8d736590-40fe-4d67-9b7e-32f8fd3aae69. Acesso em: 11 out. 2019.
- CONSTANTE, S.A.R. *et al.* Absence of mutagenicity of Clonazepam in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL, 12., 2017, Ribeirão Preto. **Anais [...]** Ribeirão Preto, 2017. p. 195.
- CONSTANTE, S. A. R. *et al.* Evaluation of the carcinogenic effect of Clonazepam, by testing for the detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. In: XII CONGRESSO da MutaGen-Brasil, 2017, Ribeirão Preto. In: CONGRESSO DA MUTAGEN-BRASIL, 12., 2017, Ribeirão Preto. **Anais [...]** Ribeirão Preto, 2017. p. 196.
- CONSTANTE, S.A.R.; OLIVEIRA, V.C.; SILVA-OLIVEIRA, R.G. Análise do efeito anticarcinogênico do clonazepam em *Drosophila melanogaster*. 2016. In: COMCISA: O LÚDICO NA SAÚDE: BRINCANDO COM COISA SÉRIA, 12., 2016, Patos de Minas. **Anais [...]** Patos de Minas: COMCISA, 2016. Disponível em: <https://anais.unipam.edu.br/index.php/comcisa/issue/view/18/COMCISA%20-%202016>. Acesso em: 10 jun. 2021.
- DIWAN B. A. *et al.* Lack of promoting effect of clonazepam on the development of N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular tumors in mice is correlated with its inability to inhibit cell-to-cell communication in mouse hepatocytes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 10, p. 1719-1724, 1989.
- EEKEN J. C. J. *et al.* Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environ. Mol. Mutag.**, New York, v. 40, p.277-282, 2002.
- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil medicina interna**. 23 ed. Saunders Elsevier, 2010.
- GOUVEIA, S. S; LIMA, A. A. Relação das espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **BJSCR**, Paraná, v. 20, n.3, p.174-179, 2017.
- GRALLERT, S. R. M. *et al.* Radioligantes para neuroreceptores benzodiazepínicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 39, n.3. p.246, jul./set. 2003.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- HOFF, P. *et al.* **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
- 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 Dev.**, [S.l.], v.9, p.534-46, 1995.
- KALLAY, L. *et al.* Modulating native GABAA receptors in medulloblastoma with positive allosteric benzodiazepine-derivatives induces cell death. **J. Neurooncol.**, v.142, p. 411-422, nov. 2019.
- KATZUNG, B. G.; TRAVOR, A. J. Farmacologia básica e clínica. 13. ed. AMGH, 2017.
- LEXOTAN: Bromazepam. Comprimidos. Responsável técnico Tatiana Tsiomis Díaz. Rio de Janeiro: Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A, 2019. Disponível em: https://img.drogasil.com.br/raiadrogasil_bula/Lexotan-Roche.pdf. Acesso em: 29 set. 2021.
- LIMA, P. M. A. P. *et al.* Effects of a Carbonated Soft Drink on Epithelial Tumor Incidence in *Drosophila melanogaster*. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 6, n. 3, p. 240-247, 2018.
- MORAIS, C. R. **Fipronil**: Avaliação da mutagenicidade e carcinogenicidade em *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) e do efeito no comportamento de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae). 2015. Dissertação de mestrado, Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Adv. Tech Biol Med.**, [S.l.], v.3, n.3, 2015.
- O'DONNELL, S. B.; NICHOLSON, M. K.; BOLAND, J. W. The Association between benzodiazepines and survival in patients with cancer: a systematic review. **J. Pain Symptom Manage**, Madison, v.57, n.5, p.999-1008, 2019.
- OKADA, M. *et al.* Benzodiazepines inhibit the acetylcholine receptor-operated potassium current (I_KACh) by different mechanisms in guinea-pig atrial myocytes. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 74, n. 7, p.879-884, 2012.
- OLIVEIRA, C. V. *et al.* Modulatory effects of clonazepam on the mutagenicity induced by doxorubicin in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE E GENÔMICA AMBIENTAL – MUTAGEN-BRASIL, 14., 2019, Bento Gonçalves. **Anais [...]** Bento Gonçalves, 2019. p. 301.

- 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 Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 50, p.2598-2604, 2012.
- PARKINSON, A. *et al.* On the mechanism of hepatocarcinogenesis of benzodiazepines: evidence that diazepam and oxazepam are CYP2B inducers in rats, and both CYP2B and CYP4A inducers in mice. **Drug Metab. Rev.**, New York, v. 38, p.253-259, 2006.
- PENG, T. R. *et al.* Hypnotics and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Medicina (Kaunas)**, v.56, n.10, 2020.
- RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.
- SAKAI, M. **Efeitos do diazepam sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich**: envolvimento do Receptor Periférico para Benzodiazepínico (PBR) ou Proteína Translocadora (TSPO). 2009. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SANTOS, B. D. A.; LAHLOU, B. N. J. B.; ORSOLIN, P. C. Avaliação do potencial anticarcinogênico do extrato aquoso de romã (*Punica granatum L.*) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Rev. Saúde. Com.**, v.14, n.1, p.1064-1072, 2018.
- SILVEIRA JÚNIOR, A. C. **Benzodiazepínicos**: o uso indevido e o abuso, uma proposta de intervenção no município de Monte Carmelo – Minas Gerais. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2015.
- TAKAI, A. *et al.* Investigating developmental and epileptic encephalopathy using *Drosophila melanogaster*. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 21, n. 17, p. 1-40, 2020.
- TONI, D. C. *et al.* Polimorfismos de pigmentação em *Drosophila*. **Naturalia**, Rio Claro, v. 27, p.231-243, 2002.
- VASCONCELOS, M. A. *et al.* Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.101, p.1-7, 2017.

Submetido em: 21/07/2021

Aceito em: 06/10/2021