



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DAS DROGAS ANTIMALÁRICAS
ARTEMISININA E ARTEMETER EM LINFÓCITOS HUMANOS**

PLÍNIO CERQUEIRA DOS SANTOS CARDOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

Belém-PA

Maio-2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DAS DROGAS ANTIMALÁRICAS
ARTEMISININA E ARTEMETER EM LINFÓCITOS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

Instituto de Ciência Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA

Belém-PA

Maio-2012

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Cardoso, Plínio Cerqueira dos Santos

Avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em linfócitos humanos / Plínio Cerqueira dos Santos Cardoso; orientador, Rommel Mário Rodriguez Burbano. – 2012.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Antimaláricos – Efeitos colaterais. 2. Plantas medicinais – Toxicologia. 3. Linfócitos. 4. Artemisia – Uso terapêutico. 5. Toxicologia genética. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.9362061



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DAS DROGAS ANTIMALÁRICAS
ARTEMISININA E ARTEMETER EM LINFÓCITOS HUMANOS**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientador

Profa. Dra. Adriana Costa Guimarães
Professora da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Prof. Dr. Nilson Praia Anselmo
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Membro

Profa. Dra. Raquel Alves dos Santos
Professora da Universidade de Franca
Membro

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

- Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Laboratório de Citogenética Humana (LCH).



FONTES FINANCIADORAS

- Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPQ)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará
 - Bolsa de doutorado



Aos meus pais, esposa, irmã,
amigos, orientador e co-orientador
e colaboradores.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a DEUS por tudo que está acontecendo na minha vida e por mais esta etapa que está sendo superada.

Gostaria ainda de agradecer ao meu pai Mário Andrade Cardoso e a minha mãe Vanda Cerqueira dos Santos Cardoso, que já não se encontra mais viva, porém permanece em meu coração até o último dia da minha existência. Serei eternamente grato por tudo o que vocês me ensinaram e pelo apoio incondicional dado a mim. Obrigado a minha esposa Danielle Santos da Cunha Cardoso por ser esta mulher maravilhosa, dedicada, companheira e que sempre está ao meu lado. Saiba que te amo muito e sempre estarei com você. Quero agradecer a minha irmã Verena Cerqueira dos Santos Cardoso, pela força, carinho e amor para com a minha pessoa.

Também gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Rommel Burbano pela oportunidade, confiança e principalmente pela amizade cultivada ao longo da minha vida e ao meu co-orientador Marcelo de Oliveira Bahia que sempre esteve ao meu lado durante as várias fases da minha vida. Vocês são muito importantes na minha vida e espero estar ao lado de vocês por muito tempo. Obrigado por todo estes anos de convivência.

Quero agradecer ao Sr. Ivan da Cunha e a Sra. Elza dos Santos pela forma como aceitaram em seu ambiente familiar. Muito obrigado pelo companheirismo, confiança e apoio incondicional dado a mim. Também gostaria de agradecer ao Sr. Calisto e família por todos estes anos de convivência e amizade fraterna. Gostaria também de agradecer às fontes financiadores (Fapespa e CNPq) que foram importantes para a realização deste estudo. Meus agradecimentos à Universidade Federal do Pará e a Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular por esta oportunidade a mim conferida.

Não podia deixar de agradecer aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana e pelos momentos maravilhosos que passei com vocês. Destes momentos de confraternização surgiu nosso maior legado que foi a GDP. Isto é patrimônio de todos nós e só foi possível graças a nossa

convivência. Não posso deixar de citar sobre a importância do nosso presidente de honra Carlos Rocha neste processo.

Quero prestar agradecimento especial à Raquel dos Santos por sua paciência e dedicação em me ensinar sobre os fundamentos da técnica do cometa. Outra pessoa muito importante nesta jornada foi a minha tia Tati com quem passei grande parte deste projeto trabalhando. Obrigado por tudo!

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O USO DAS PLANTAS NA MEDICINA MODERNA.....	1
1.2 ARTEMISININA E ARTEMETER.....	3
1.3 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS E GENOTOXIDADE.....	7
1.4 CULTURA DE LINFÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO.....	9
1.5 ENSAIOS EM GENOTOXIDADE E CITOTOXICIDADE.....	10
1.5.1 Teste do micronúcleo	10
1.5.2 Ensaio do cometa (versão alcalina)	11
1.5.3 Ensaio de citotoxicidade com laranja de acridina/brometo de etídio	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3.2 CULTURA DE LINFÓCITOS ISOLADOS.....	15
3.3 TRATAMENTOS.....	16
3.4 TESTE COMETA (VERSÃO ALCALINA).....	17
3.4.1 Preparação das lâminas	17
3.4.2 Eletroforese	17
3.4.3 Coloração	18
3.4.4 Análise das lâminas	18

3.5	TESTE DO MICRONÚCLEO.....	19
3.5.1	Critério para seleção de células.....	21
3.5.2	Análise dos micronúcleos.....	21
3.5.3	Análise do índice de divisão nuclear (IDN).....	22
3.6	TESTE DE AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA-BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE).....	22
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO ENSAIO COMETA.....	24
4.2	EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO TESTE DO MICRONÚCLEO.....	25
4.3	EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER NA VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS ANALISADO PELO ENSAIO DE DETECÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE).....	29
5	DISCUSSÃO.....	31
6	CONCLUSÃO.....	37
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

min.	– minuto (s)
rpm.	– rotações por minuto

LISTA DE SIGLAS

DMSO	– Dimetilsulfóxido
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	– Soro Bovino Fetal
ID	– Índice de dano ao DNA
IDN	– Índice de divisão nuclear
LNP	– Licnofolido
MN	– Micronúcleo
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ZER	– Zerumbona
CtB	– Citocalasina B

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – <i>Artemisia annua</i> L.....	4
Figura 2 – Estrutura química do artemeter.....	6
Figura 3 – Foto mostrando a produção de células sangüíneas a partir da medula óssea.....	9
Figura 4 – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b) a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico.....	11
Figura 5 – Esquema mostrando as sucessivas etapas que integram o ensaio cometa.....	12
Figura 6 – Foto mostrando células submetidas a marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio. Estas células apresentam diferenças morfológicas: (a) célula viável; (b), (c) e (d) células em apoptose (setas brancas); (e) célula em necrose.....	13
Figura 7– Foto mostrando os níveis de dano analisados pela técnica do cometa.....	19
Figura 8 – Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas (coradas com Giemsa) que se enquadram nos critérios de análise. Em (a) núcleos arredondados; (b) núcleos ovais; e (c) mostra o limite entre duas células adjacentes.....	21
Figura 9 – Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa) com um (a), dois (b) e seis (c) MNs. Todas as células obedecem aos critérios de análise para MN.....	22
Figura 10 - Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas (coradas com Giemsa). Em a: uma célula mononucleada; b: uma tetranucleada; e em c: uma célula multinucleada com 5 núcleos.....	22
Figura 11 - Efeito da artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio cometa. *p <0,05 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.....	24
Figura 12 - Efeito do artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio cometa. *p <0,05 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.....	25

Figura 13 - Efeito da artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. *p <0,05 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.....	26
Figura 14 - Efeito do artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. *p <0,05 (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.....	27
Figura 15 - Frequência de apoptose e necrose induzida por artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo (LA/BE). *p <0,05 (Kruskal-Wallis).....	29
Figura 16 - Frequência de apoptose e necrose induzida por artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos analisado por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo (LA/BE)...	30
Tabela 1– Exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais.....	3
Tabela 2 - Efeito do artemisinina (ARTMS) no IDN de células de linfócitos humanos analisadas pelo teste do micronúcleo.....	28
Tabela 3 - Efeito do artemeter (ARTM) no IDN de células de linfócitos humanos analisadas pelo teste do micronúcleo.....	28

RESUMO

A artemisinina é uma substância extraída da planta chinesa *Artemisia annua* L., sendo bastante utilizada na medicina natural como um terapêutico em várias patologias. Já o artemer é uma substância sintetizada a partir da artemisinina. Estas drogas se enquadram em um grupo especial de moléculas denominadas de lactonas sesquiterpênicas sendo amplamente administradas na terapêutica da malária. Embora sejam considerados eficientes anti-maláricos, muito pouco se sabe sobre os efeitos genotóxicos e citotóxicos destes fármacos. Portanto, no presente trabalho, avaliamos os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da artemisinina e do artemeter em cultura de linfócitos humanos por meio do ensaio cometa, do teste do micronúcleo e do ensaio de citotoxicidade para detecção de necrose e apoptose por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE), respectivamente. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de dano do DNA avaliado pelo ensaio do cometa, bem como na frequência de micronúcleos em ambas as substâncias testadas. Foi observado também, que apenas a artemisinina induziu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no número de células necróticas nos linfócitos em 48 h de tratamento. Desta forma, demonstrou-se em nosso trabalho, que estas duas drogas exercem efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em culturas de linfócitos humanos, nas condições avaliadas. Nossos dados apontam a necessidade de cautela no uso de tais medicamentos, uma vez que efeitos genotóxicos/mutagênicos podem aumentar o risco de carcinogênese.

Palavras-chave: ensaio cometa, artemisinina, artemeter, MN, linfócitos.

ABSTRACT

Artemisinin is a substance extracted from the Chinese plant *Artemisia annua L.*, and widely used in natural medicine for a treatment of various diseases. Artemether is a substance synthesized from artemisinin. These drugs belong to a special group of molecules called sesquiterpene lactones widely administered in the treatment of malaria. Although considered effective anti-malarial drugs, very little is known about the genotoxic and cytotoxic effects of these drugs. Therefore, in the present study, we evaluated the genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of artemisinin and artemether in cultured human lymphocytes using the comet assay, the micronucleus test and a cytotoxicity assay for detection of necrosis and apoptosis by fluorescent differential acridine orange/ethidium bromide (LA/BE), respectively. Our results showed a significant increase ($p < 0.05$) in the rate of DNA damage measured by comet assay and in the micronucleus frequency after treatment with both drugs. It was also observed that only artemisinin induced a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the number of lymphocytes with death by necrosis 48 h after treatment. Thus, it was shown in our work that these two drugs exert mutagenic, genotoxic and cytotoxic effects in cultured human lymphocytes under the conditions evaluated. Our data indicate the need for caution in the use of such drugs, since genotoxic/mutagenic effects may increase the risk of carcinogenesis.

Keywords: comet assay, artemisinin, artemether, MN, lymphocytes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O USO DE PLANTAS NA MEDICINA MODERNA

O uso de plantas medicinais como forma alternativa de tratamento no combate a uma série de enfermidades já vem sendo relatado ao longo dos últimos anos em diferentes populações (BERG & SILVA, 1988; BIRD, 1991; VERGER, 1995; GUARIM-NETO, 2006; KUNWAR *et al.*, 2006; KUNWAR *et al.*, 2010) e o conhecimento das mesmas representa, muitas das vezes, a única opção terapêutica para essas pessoas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Revene *et al.* (2008), por exemplo, assinalaram que o uso de fitoterápicos nos países em desenvolvimento se tornou a prática mais acessível e, em certas circunstâncias, o único tratamento disponível para os pacientes portadores de algum tipo de enfermidade.

De acordo com estudos conduzidos por Maciel *et al.* (2002), o uso de plantas no tratamento e na cura de doenças se caracteriza por ser uma prática muito antiga e, atualmente, em muitas regiões pobres dos países e até mesmo nas periferias dos grandes centros urbanos é possível observar plantas medicinais sendo comercializadas em feiras públicas ou sendo cultivadas nos jardins das residências. Esta nova mudança na mentalidade das pessoas com relação ao uso de produtos naturais se dá porque parte significativa da sociedade acha que estes bioprodutos são seguros e promovem saúde, ao contrário dos produtos sintéticos, frequentemente associados com efeitos colaterais indesejáveis (YUNES *et al.*, 2001; CHAN, 2003; MOREIRA *et al.*, 2006).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial já usufrui da medicina de produtos naturais para suprir necessidades básicas de saúde (OMS, 2000). Esse cenário aponta claramente que os produtos naturais são dotados de grande valor intrínseco decorrente da sua atividade biológica o que, de certa forma, vem despertando interesse das grandes companhias farmacêuticas em investir nesta área (CRAGG & NEWMAN, 2003; OLIVEIRA & BRAGA, 2003).

Este fenômeno vem se confirmando paulatinamente, uma vez que as grandes empresas farmacêuticas estão hoje concentradas nos Estados Unidos, permitindo com que este país exerça o controle de grande parcela do mercado mundial farmacêutico. Esta evidência ratifica o sucesso do emprego dos produtos naturais como nova alternativa de tratamento. Essas indústrias, além da síntese, vêm também trabalhando no isolamento de produtos naturais que possam servir como futuros agentes terapêuticos (BORRIS, 1996; PATWARDHAN & GAUTAM, 2005).

No Brasil, o uso de plantas para propósitos medicinais se configura prática muito antiga tendo se expandido significativamente com o decorrer dos anos. Isto só foi possível graças a tradição dos nossos povos indígenas, além da influência recebida dos povos europeus e africanos ao longo do processo de colonização que ocorreu neste país (GOMES *et al.*, 2008). Cabe ainda ressaltar que, além desta peculiaridade citada, o Brasil destaca-se hoje no cenário mundial por ser detentor de uma rica diversidade em sua fauna e flora o que o torna potência emergente no fornecimento de produtos naturais (PINTO *et al.*, 2002; MORAES *et al.*, 2003).

Esta mistura de tradições e culturas, associada com a rica diversidade de espécies vegetais, tem fornecido aos procedimentos médicos tradicionais novas abordagens terapêuticas com base na diversidade vegetal, além de novos métodos de tratamento. Isto mostra claramente o quanto o país é rico em termos de flora medicinal presente nas diferentes regiões brasileiras (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Sendo assim, torna-se cada vez mais imprescindível o investimento em pesquisas na área dos produtos *in natura*, uma vez que os mesmos representam para o governo brasileiro, assim como para outros países em desenvolvimento, um grande passo para a sua independência, além de uma grande economia de recursos, pois os gastos financeiros com compras de medicações são necessários para o funcionamento dos sistemas de saúde que são desenvolvidos em uma grande parcela destes países (MORAES *et al.*, 2003).

Hoje em dia, é possível encontrar uma série de medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais e que estão disponíveis no mercado para o tratamento e cura de diferentes tipos de doenças, como mostra a tabela 1. Entre os bioprodutos citados a seguir, daremos atenção especial aos compostos artemisinina e o artemeter que são o objeto do presente estudo.

Tabela 1: Exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais.

Fármaco	Uso Terapêutico	Fonte
Ciclosporina	Imunossupressor	<i>Tolypocladium inflatum</i>
Cromalyn	Anti-asmático	<i>Ammi visnaga</i>
Digoxina	Insuficiência cardíaca	<i>Digitalis purpurea</i>
Artemisinina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Artemeter	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Captopril	Antihipertensivo	<i>Bothrops jararaca</i>
Escopolamina	Doença de Parkinson	<i>Datura spp</i>
Estatinas	Tratamento das dislipemias	<i>Penicillium spp, aspergillus terrus</i>
Etoposídeo	Câncer (testículo e pulmão)	<i>Pophyllum spp</i>
Galantamina	Doença de Alzheimer	<i>Galanthus nivalis</i>
Irinotecan	Câncer (colorretal)	<i>Camptotheca acuminata</i>
Morfina	Analgésico	<i>Papaver samniferum</i>
Paclitaxel	Câncer (ovário)	<i>Taxus brevifolia</i>
Pilocarpina	Glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Quinina	Antimalárico	<i>Cichona spp</i>
Tacrolimus (FK506)	Imunossupressor	<i>Stroptomyces tsukuboensis</i>
Topotecan	Câncer (ovário)	<i>Camptotheca acuminata</i>
Toxina botulínica A	Analgésico, cosmético	<i>Clostridium botulinum</i>
Tubocurarina	Bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vimblastina	Câncer (mama)	<i>Cotharanthus roseus</i>
Vincristina	Câncer (leucemia)	<i>Cotharanthus roseus</i>
Ziconotida	Tratamento da dor crônica	<i>Canus spp</i>

Fonte: (CALIXTO, 2003).

1.2 ARTEMISININA E ARTEMETER

Qinghao (*blue-green herb*) é um termo chinês comumente usado para identificar uma espécie de planta de ocorrência muito comum na China denominada *Artemisia annua* L. ou *sweet wormwood* (RICHARD *et al.*, 2010). Desta planta extrai-se um composto natural denominado artemisinina ou *qinghaosu* (LIU *et al.*, 1979). *Artemisia annua* L. (Figura 1) é tida como sendo a única fonte natural disponível da artemisinina (KLAYMAN, 1985). Esta

apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_5$ (Figura 1) e foi classificada como uma lactona sesquiterpênica com um grupo peróxido em sua estrutura química (QINGHAOSU ANTIMALARIA COORDINATING GROUP, 1979; LINDEGARDH *et al.*, 2009). Além disso, o *qinghaosu* ocupa papel de destaque por ser um importante fornecedor de produtos para a indústria de perfumes (SIMON *et al.*, 1990).

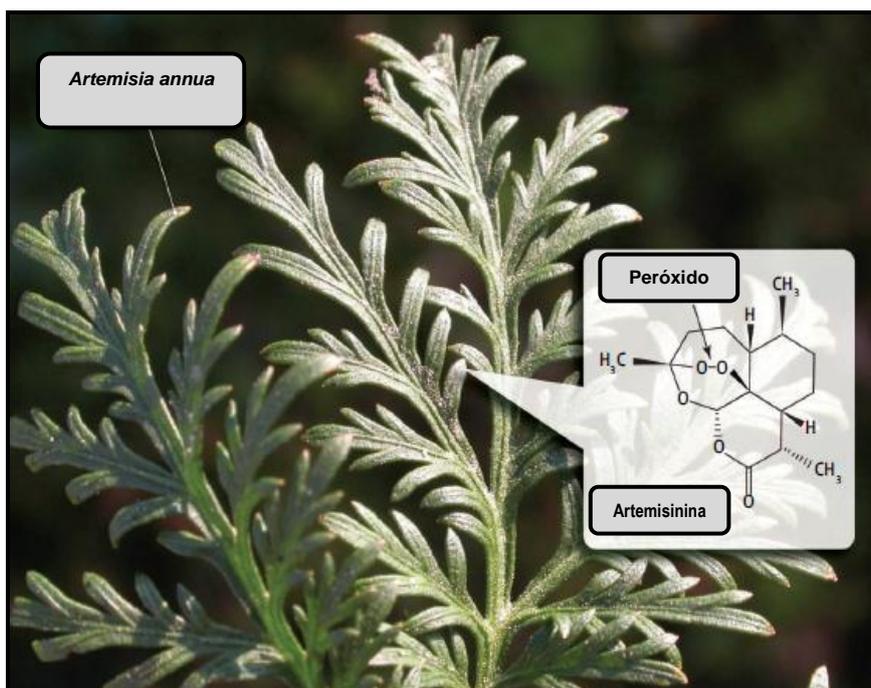


Figura 1 – *Artemisia annua* L. (Fonte: adaptado de MILHOUS & WEINA, 2010).

Há pelo menos dois mil anos, esta planta vem sendo continuamente empregada pelos chineses no tratamento de uma série de enfermidades (RICHARD *et al.*, 2010). Os primeiros registros acerca das propriedades medicinais do *qinghao* foram descobertos em um sítio arqueológico chamado Mawangdui que pertenceu a Dinastia Han (segunda dinastia imperial da China). Os arquivos encontrados mostravam a importância desta planta no tratamento das hemorróidas (QINGHAOSU ANTIMALARIA COORDINATING GROUP, 1979; KLAYMAN, 1985). Em sua obra, Zhang Ji descrevia como era possível tratar de uma enfermidade, cujos sintomas se assemelhavam aos da malária, utilizando uma poção quente contendo partes do *qinghao*. Este autor já recomendava o emprego do mesmo para o tratamento de febres cujos

sintomas mais característicos eram a sudorese e a icterícia (WILCOX *et al.*, 2004).

Em seu trabalho, Hong Ge descrevia um método alternativo de extração dos princípios ativos do *qinghao* sob baixas temperaturas e com efeitos bastante animadores no combate de febres intermitentes (KLAYMAN, 1985). Outros textos chineses de matéria médica já citavam o uso do *qinghao* como importante elemento terapêutico a ser administrado para o tratamento de quadros febris (QINGHAOSU ANTIMALARIA COORDINATING GROUP, 1979; HIEN & WHITE, 1993). O uso do *qinghao* no combate de furúnculos, piolhos e ferimentos é prática terapêutica comumente descrita (HSU, 2006) e, até os dias atuais, esta planta ainda permanece sendo usada como produto homeopático na Medicina Tradicional Chinesa (WEINA, 2008).

Os primeiros estudos acerca das propriedades medicinais do *qinghao* surgiram de esforços empreendidos pelo governo chinês no intuito de descobrir tratamentos alternativos capazes de combater à malária, uma vez que esta era responsável pelo alto índice de mortes entre os soldados envolvidos na Guerra do Vietnã. Em 1967, o programa governamental intitulado “Projeto 523” passou a ser executado com o intuito de se conseguir respostas para este problema de saúde pública e envolveu um grande grupo de estudiosos chineses (WEINA, 2008).

Os estudos só passaram a ter resultado no ano de 1971 quando foi desenvolvido um método de extração dos princípios ativos a partir do extrato do *qinghao* com o uso do éter dietílico e sob baixas condições de temperatura. Este procedimento era muito similar ao que foi descrito por Hong Ge, só que o mesmo usava água no lugar do éter (HSU, 2006). Pesquisas subsequentes demonstraram que este novo extrato possuía uma incrível atividade antimalárica quando eram administrados nos ratos infectados com o *Plasmodium berghei* (HIEN & WHITE, 1993). Outra importante evidência detectada era que estes animais não apresentavam sinais significativos de toxicidade mesmo sendo expostos por longos períodos de tempo

(QINGHAOSU ANTIMALARIA COORDINATING GROUP, 1979). Os resultados eram animadores e foram publicados em março de 1972 (HSU, 2006).

O composto ativo do extrato do *qinghao* foi isolado no mesmo ano da publicação sendo batizado, três anos depois, com o nome de *qinghaosu*. Este passou a ser conhecido nos países ocidentais com o nome de artemisinina (HIEN & WHITE, 1993). Em 1973, outros derivados da artemisinina, como o artemeter e o artesunato, foram sintetizados. Estes apresentam maior solubilidade e demonstraram ser mais efetivos que o composto artemisinina (HAYNES & VONWILLER, 1994).

O artemeter (Figura 2) é um produto terapêutico bastante recomendado pela OMS para casos de pessoas portadoras de malária (PRICE, 2000), uma vez que estudos clínicos com estes pacientes mostram que este composto, quando administrado, é bem tolerado pelo organismo no transcorrer do tratamento e com poucos sinais de efeitos colaterais (HIEN *et al.*, 1992). Segundo Arreesrisom *et al.* (2007), o artemeter atua no Plasmodium por meio de processos oxidativos, produzindo radicais livres na presença do Fe^{2+} , o qual é liberado pelo parasita no processo de degradação do grupamento heme. Efferth *et al.* (2002) reportaram que além do seu efeito como antimalárico, o artemeter também tem demonstrado uma intensa ação citotóxica contra linhagens de células cancerígenas provenientes de diferentes tipos tumorais, tanto na condição *in vivo*, quanto *in vitro*. Michaelis *et al.* (2009) demonstraram uma efetiva ação antineoplásica do artemeter contra células de neuroblastoma.

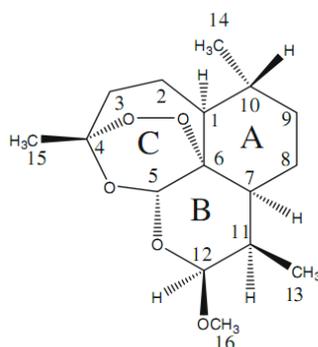


Figura 2 - Estrutura química do artemeter (Fonte: adaptado de YANG *et al.*, 2009).

Existem ainda trabalhos na literatura científica que abordam sobre a ação antineoplásica dos outros derivados da artemisinina. Li *et al.* (2009), por exemplo, demonstraram que o artesunato exerce uma atividade anticancerígena *in vitro*. Tais autores demonstraram que esta droga tem a capacidade de bloquear o ciclo de células SP2/0 (mieloma de ratos) na transição G₀/G₁ do ciclo celular e induzir apoptose nestas células, porém o mecanismo preciso deste efeito ainda é desconhecido. Outros estudos mostraram que esta mesma droga apresenta uma satisfatória ação antineoplásica em estudos com linhagens celulares tumorais provenientes do cólon, do pulmão, do fígado, de leucemias e do pâncreas (EFFERT, 2001; KELTER, 2007). Por fim, Li & Zhou (2005) demonstraram que a dihidroartemisinina inibia a expressão do fator endotelial de crescimento vascular em linhagens celulares tumorais do ovário chamadas K562.

No Brasil, o uso da artemisinina e seus derivados se restringe principalmente ao tratamento de malária grave em áreas de multirresistência do *Plasmodium falciparum*. Sua atividade antimalárica é rápida e a maioria dos pacientes apresenta melhora clínica dentro de 1-3 dias após o tratamento. Entretanto, a monoterapia não é recomendada, devendo-se associar sempre um outro antimalárico tal como a mefloquina, doxiciclina, tetraciclina ou clindamicina (FUNASA, 2001).

1.3 LACTONAS SESQUITERPÊNICAS E GENOTOXICIDADE

É reconhecidamente comprovado que populações humanas podem adquirir danos genéticos por conta de exposição acidental, ocupacional ou ambiental a agentes genotóxicos químicos, físicos ou mesmo biológicos. Estes agentes podem interferir no adequado desenvolvimento da célula podendo implicar na perda do controle de sua divisão, determinando, assim, o aparecimento do câncer (NATARAJAN, 1993). Estes agentes químicos e físicos capazes de induzir a formação de aberrações cromossômicas são chamados de agentes clastogênicos, os quais podem ter seu potencial genotóxico detectado por vários testes, tais como: a análise de aberrações

cromossômicas em células metafásicas, o teste de troca entre cromátides irmãs, o teste do micronúcleo (MN), do ensaio cometa, entre outros (AL-SABATI *et al.*, 1992; GUIMARÃES *et al.*, 2003; MOVAJAGH *et al.*, 2005).

Segundo He *et al.* (2010), os compostos sesquiterpênicos têm atraído grande interesse científico, uma vez que apresentam atividades biológicas relevantes atuando como substâncias dotadas de propriedades antifúngicas, citotóxicas e genotóxicas. Vasconcellos *et al.* (2007) sugeriram fortes evidências do efeito genotóxico das lactonas sesquiterpênicas, uma vez que verificaram que o composto 15-deoxigoiazensolida induz mutações em *Sacharomyces cerevisiae*. Já Burim *et al.* (2001) ao testarem o potencial clastogênico da lactona sesquiterpênica centraterina em linfócitos humanos e em camundongos, observaram que, nas culturas temporárias de linfócitos humanos, esta droga induziu um aumento significativo tanto no total de aberrações cromossômicas quanto na frequência de trocas entre cromátides-irmãs. Este aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas também foi constatado para as concentrações testadas em camundongos.

Al-Zubairi *et al.* (2010) ao estudarem o efeito *in vitro* da lactona sesquiterpênica zerumbona (ZER), fármaco utilizado como antiinflamatório na medicina tradicional, observaram um aumento significativo na frequência de MN em culturas temporárias de linfócitos. No entanto, no mesmo estudo, os autores demonstraram que a zerumbona não exerceu efeito na frequência de aberrações cromossômicas, quando comparado ao controle não tratado. Canalle *et al.* (2001) ao avaliar os efeitos genotóxicos do licnofolido (LNP), uma lactona sesquiterpênica com atividades antitumoral, tripanocida e antimicrobiana, em linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos Swiss, os autores verificaram que o LNP induz um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em células expostas na fase G2 do ciclo celular em todas as culturas tratadas. Apenas a concentração mais elevada (26,67 mg/kg) mostrou um aumento significativo no número total de aberrações cromossômicas no tratamento *in vivo*.

Embora haja alguns trabalhos na literatura a respeito dos efeitos genotóxicos das lactonas sesquiterpênicas, não há relatos na literatura de estudos que avaliem os efeitos genotóxicos da artemisinina e do artemeter em cultura temporária de linfócitos.

1.4 CULTURA DE LINFÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO

Os linfócitos são células importantes do nosso sistema imune sendo responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas imuno-adaptativas em humanos. Como pode ser visto na figura 3, eles são produzidos na medula óssea e estão presentes em grande quantidade na corrente sangüínea, na linfa (fluido incolor presente nos vasos linfáticos, que conectam os linfonodos do organismo uns com os outros e com a corrente sangüínea) e nos órgãos linfóides (ALBERT *et al.*, 2004).



Figura 3 - Esquema mostrando a produção de células sangüíneas a partir da medula óssea. Fonte: (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/corpo-humano-medula-ossea/corpo-humano-medula-ossea-3.php>).

Por serem muito abundantes na circulação sanguínea, os linfócitos semeados em cultura tornaram-se um modelo *in vitro* bastante promissor para diversos estudos, como por exemplo, os de genotoxicidade, citotoxicidade, entre outros; além de oferecerem inúmeras facilidades metodológicas, uma vez que são células de fácil obtenção (punção venosa) e podem ser obtidos praticamente livres de contaminação. Outra grande vantagem dos linfócitos é a sua facilidade de desenvolvimento em cultura por longos períodos (WNUK *et al.*, 2009). Todas as vantagens aqui citadas justificam a ampla utilização das culturas celulares de linfócitos em estudos citogenéticos, tanto de ordem mutagênica (teste de aberrações cromossômicas, por exemplo), quanto de ordem genotóxica (ensaio cometa, por exemplo), o que ressalta a utilidade destes modelos em estudos de genotoxicidade, como o aqui proposto.

1.5 ENSAIOS EM GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE

1.5.1 Teste do micronúcleo

Segundo Fenech (2000) e Chung *et al.* (2002) o MN constitui-se de um pequeno corpo nuclear resultante de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros (Figura 4) que se atrasam em relação aos demais durante o processo anafásico; revelando assim a ação de agentes aneugênicos (alterações cromossômicas numéricas) e clastogênicos (alterações cromossômicas estruturais). Representa, portanto, um marcador simples, que pode ser examinado em preparações citológicas de rotina, sendo a técnica considerada bastante valiosa na avaliação de danos citogenéticos de populações ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos e carcinogênicos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; LINDBERG *et al.*, 2008).

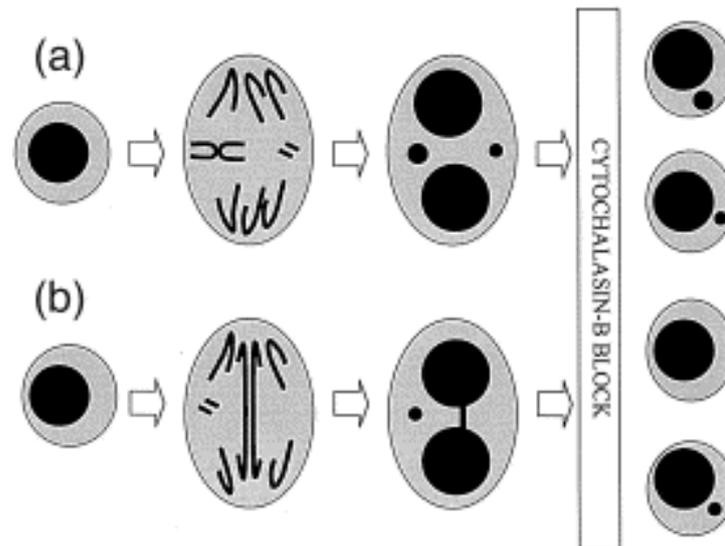


Figura 4 - Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b) a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico (adaptado de FENECH, 2000).

1.5.2 Ensaio do cometa (versão alcalina)

Esta técnica foi desenvolvida por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, modificada por Anderson *et al.* (1994). Corresponde a um ensaio de grande sensibilidade para a detecção de vários tipos de danos no ácido desoxirribonucéico (DNA), como quebra de fitas duplas ou simples, danos oxidativos e ligações cruzadas, induzidos por compostos genotóxicos e mutagênicos. Partindo-se do pressuposto de que o DNA encontra-se fortemente compactado dentro do núcleo, formando alças de 5-200 Kpb, as quais se encontram aderidas a uma rede protéica ou matriz nuclear (COOK & BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; RAZIN *et al.*, 1995; ERIKSSON *et al.*, 2002); se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares (incluindo as histonas) extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, sendo maior e mais pesado que o restante dos componentes ocupará um espaço no gel quando submetidos a um campo elétrico (Figura 5), o qual era anteriormente preenchido pela célula e será retido em uma estrutura residual semelhante a um núcleo denominada nucleóide (COOK & BRAZELL, 1976). Desta forma, o nucleóide é por definição, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à

matriz nuclear residual do tamanho do núcleo da célula. Portanto, caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, uma vez que as alças de DNA se desenovelam, tornando-se mais frouxas e formando um halo (COOK & BRAZELL, 1976; COOK *et al.*, 1978; VOGELSTEIN *et al.*, 1980).

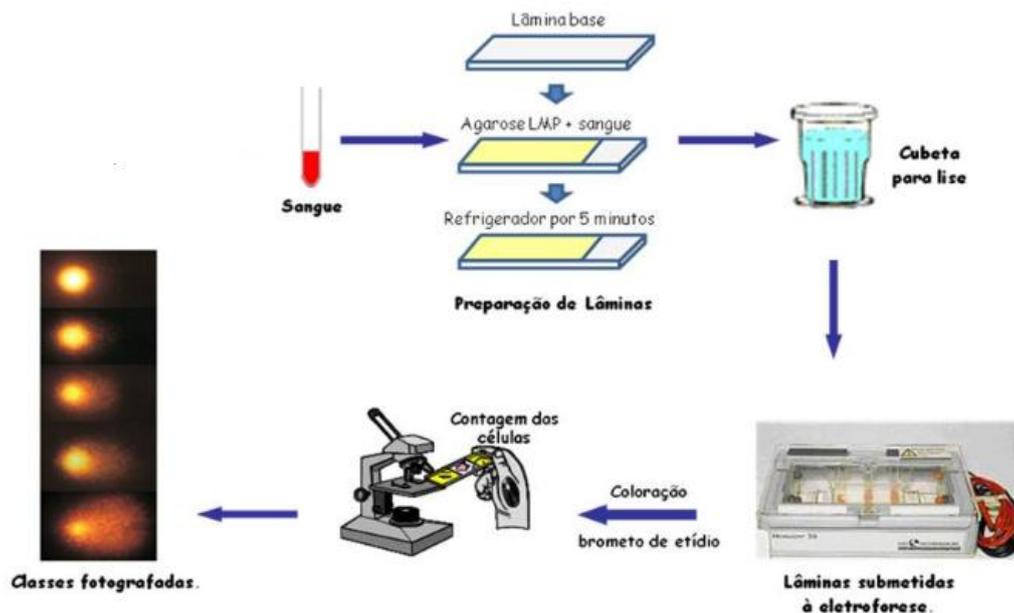


Figura 5 - Esquema mostrando as sucessivas etapas que integram o ensaio cometa (adaptado de ROCHA, 2009).

1.5.3 Ensaio de citotoxicidade para detecção de necrose e apoptose por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE).

Este ensaio consiste na identificação de características morfológicas de morte por apoptose ou necrose com base na fluorescência celular promovida pelos corantes laranja de acridina e brometo de etídio. A laranja de acridina é um corante que apresenta a capacidade de se intercalar na molécula de DNA emitindo uma fluorescência de cor verde. Semelhantemente a ela, o brometo de etídio também possui esta propriedade, porém, a fluorescência emitida neste caso corresponde à cor alaranjada, marcação esta que irá caracterizar células inviáveis. Em contrapartida, as células viáveis com membrana intacta apresentarão um padrão de cor verde uniforme em seu

núcleo. No estágio apoptótico inicial, as células serão caracterizadas por apresentarem sua cromatina condensada com um núcleo verde fluorescente. Já no estágio tardio, apenas algumas áreas da cromatina serão coradas em laranja. Este padrão de marcação distingue, portanto, o núcleo apoptótico do necrótico já que as células necróticas apresentam núcleo com coloração laranja uniforme (CURY-BOAVENTURA *et al.*, 2006) (Figura 6).

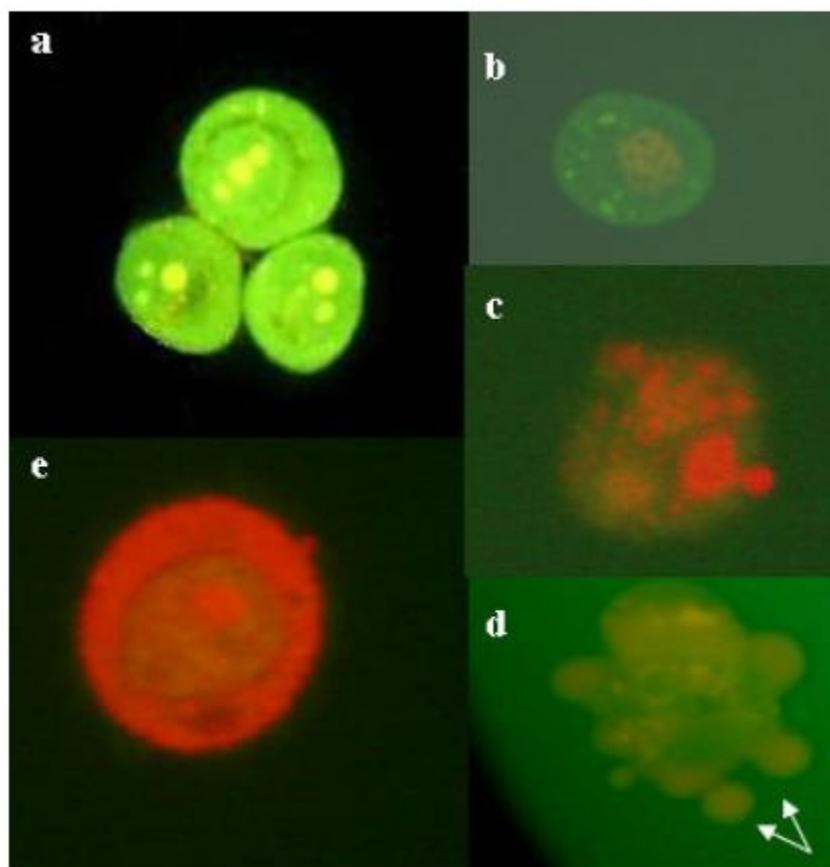


Figura 6 - Foto mostrando células submetidas a marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio. Estas células apresentam diferenças morfológicas: (a) célula viável; (b), (c) e (d) células em apoptose (setas brancas); (e) célula em necrose (adaptado de CAMPOS DA PAZ, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em cultura de células linfocitárias humanas provenientes de sangue periférico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice de dano ao DNA demonstrado pelas células após o tratamento com as diferentes concentrações de artemisinina e artemeter utilizando o ensaio do cometa;
- Avaliar a frequência de MNs em cultura de linfócitos periféricos humanos tratados com diferentes concentrações de artemisinina e artemeter utilizando a técnica do MN convencional;
- Avaliar a citotoxicidade por meio da técnica de marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina-brometo de etídio em cultura de células linfocitárias humanas provenientes de sangue periférico humano após o tratamento com diferentes concentrações das drogas artemisinina e artemeter.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de sangue periférico foram coletadas de 3 (três) indivíduos, sendo duas mulheres e um homem (24, 28 e 32 anos respectivamente), os quais obedeciam aos padrões exigidos para a realização de testes genotóxicos (Exs: não fumantes, pessoas que não consomem bebidas alcoólicas, indivíduos que não estejam consumindo medicamentos). Os voluntários foram entrevistados e forneceram consentimento escrito de participação no estudo. O sangue foi coletado com o auxílio de seringas descartáveis de 20 mL, devidamente heparinizadas para evitar a coagulação, sendo em seguida submetido ao processo de isolamento de linfócitos para a preparação da cultura, a qual foi realizada de acordo com o descrito por Fenech (2000), com algumas modificações feitas em nosso laboratório.

3.2 CULTURA DE LINFÓCITOS ISOLADOS

O sangue periférico foi coletado e, em seguida, diluído na proporção de 1:1 em solução salina estéril 0,85 %. A amostra foi homogeneizada por inversão e submetida a uma nova diluição em Ficoll Histopaque[®]1077 (específico para o isolamento de linfócitos T) na proporção de 3:1 (1 parte de Ficoll Histopaque[®]1077: 3 partes de sangue diluído), sendo primeiramente acrescentado o Ficoll e posteriormente o sangue, tomando bastante cuidado para que não ocorresse a mistura. Após este processo, os tubos com a amostra foram centrifugados a 1500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos (min) para a separação dos linfócitos de outros elementos sangüíneos.

O aspecto obtido após centrifugação foi a formação de quatro camadas, com o plasma na porção superior seguido de uma fina camada mais esbranquiçada de linfócitos, outra um pouco mais clara contendo Histopaque e por último, na porção inferior, uma camada de glóbulos vermelhos. O conteúdo (plasma + linfócitos) foi coletado e transferido cuidadosamente para outro tubo com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Em seguida, o material foi

homogeneizado com a mesma pipeta Pasteur e então diluído em solução de Hanks (1X) estéril na proporção de 3:1 (3 partes de Hanks: 1 parte da mistura de plasma + linfócitos). O material foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min sendo o sobrenadante coletado e descartado deixando-se 1 mL de conteúdo, o qual foi homogeneizado e completado com mais 4 mL de solução de Hanks, sendo novamente submetido a centrifugação a 1500 rpm por 5 min.

Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células foram ressuspensas em 0,5 mL de meio de cultura RPMI 1640 estéril (Gibco), suplementado com 20 % de soro bovino fetal (Gibco) e 4 % de Fitohemaglutinina A. A viabilidade e a concentração celular foram quantificadas pelo método de exclusão utilizando *azul de tripan* em uma diluição de 1:1 (10 μ L da suspensão de células + 10 μ L de *azul de tripan* 4%), e a contagem das células realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que fornece a quantidade de células para cada 1 mL da suspensão obtida. Ao final de todas estas etapas, foram cultivadas 1×10^6 /mL de células em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20 % FBS e 4 % de Fitohemaglutinina A, uma substância mitogênica que faz com que as células retomem o seu potencial mitótico. A cultura foi incubada em estufa com 5 % de CO₂ a uma temperatura de 37°C.

3.3 TRATAMENTOS

A artemisinina (CAS no. 63968-64-9) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) 100 %, sendo em seguida acrescentada às culturas para se obter concentrações finais de 12,5; 25 e 50 μ g/mL, estas concentrações foram determinadas de acordo com o trabalho de Wenisch *et al.* (1997). O artemeter (CAS no. 71963-77-4) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), foi diluído em DMSO 100 %, sendo em seguida acrescentado às culturas para se obter concentrações finais de 7,46; 14,92 e 29,84 μ g/mL, tais concentrações foram determinadas de acordo com testes prévios de viabilidade celular realizados pelo nosso grupo de pesquisa (ALCÂNTARA *et al.*, 2011).

3.4 TESTE COMETA (versão alcalina)

3.4.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose (ponto de fusão normal - 1,5 %). Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose (baixo ponto de fusão - 0,8 %), na qual a amostra foi diluída. Após 3 h de tratamento (23 h de cultura), foram coletados 450 μ L de amostra de cada grupo (controle positivo, controle negativo e as concentrações de cada droga testada) e em seguida feita uma centrifugação a 1000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando 30 μ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 15 μ L foram acrescentados em 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,8 %), sendo em seguida homogeneizado. Subseqüentemente, 100 μ L deste conteúdo foram aplicados rapidamente sobre cada lâmina contendo agarose e, em seguida, cada lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4 °C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, as lamínulas foram removidas cuidadosamente, mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) , 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 e 10 % DMSO; pH: 10) e mantidas a 4 °C protegidas da luz.

3.4.2 Eletroforese

Após a remoção das lâminas da solução de lise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH \geq 13) a 4 °C recém-preparada, a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas. As lâminas foram mantidas em repouso por 20 min antes da eletroforese a fim de permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi realizada a uma tensão (d.d.p: diferença de potencial) de 34

V/cm em corrente de 300 mA por um período de 25 min. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese, sendo, em seguida, transferidas para um novo mergulho em H₂O destilada gelada por 5 min.

3.4.3 Coloração

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% por 3 min e posteriormente coradas com 50 µL de solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL). Em seguida foram cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises.

3.4.4 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, contendo três filtros (DAPI/FITC/TRITC). O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa “*Applied Spectral Imaging*”. A análise foi realizada segundo o padrão de escores (Figura 7), em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que irá indicar o grau de lesão sofrido pela célula (MALUF & ERDTMANN, 2000).

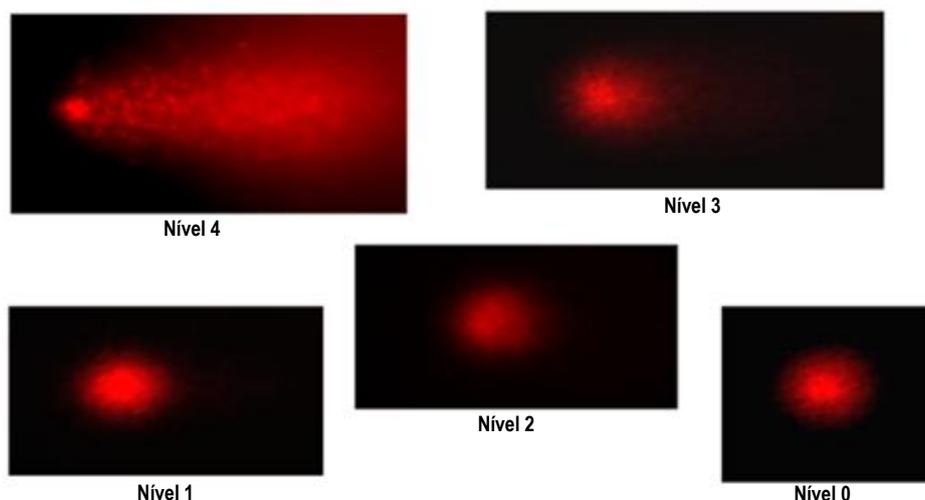


Figura 7 - Foto mostrando os níveis de dano analisados pela técnica do cometa.
Fonte: Pessoal.

- 0 = sem danos (< 5 %)
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40 %)
- 3 = alto nível de danos (40 - 95 %)
- 4 = dano total ($\geq 95\%$)

O índice de dano ao DNA (ID) foi calculado multiplicando-se o número de células em cada nível pelo escore ao qual ela se enquadra (0, 1, 2, 3 ou 4), somando esses valores, e por fim, o resultado obtido deve ser dividido por 100, que corresponde ao total de células analisadas.

3.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

Após 20 h em cultura, os linfócitos foram tratados com as diferentes concentrações de artemisinina (12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e do artemeter (7,46; 14,92 e 29,84 $\mu\text{g/mL}$). Cabe destacar que além do tratamento com a droga foram feitos um controle negativo somente com meio de cultura e um controle positivo com 0,02 $\mu\text{g/mL}$ de doxorubicina, uma droga reconhecidamente mutagênica (BAUMGARTNER *et al.*, 2004). Passadas 24 h do tratamento (44 h de incubação após o início da cultura), foi adicionado à cultura 3 $\mu\text{g/mL}$ de

citocalasina-B (CtB), substância que bloqueia a citocinese, por inibir a polimerização da proteína actina, responsável pela formação do anel de microfilamentos que induz a contração do citoplasma e a formação de duas células filhas; sendo de crucial importância para a obtenção de células binucleadas. Após 24 h com CtB (72 h de incubação após o início da cultura), as células foram transferidas para tubos de centrifuga e centrifugadas a 800 rpm por 5 min.

O sobrenadante foi descartado deixando 0,5 mL para leve homogeneização. Em seguida, foram adicionados vagarosamente pela parede do tubo 5 mL de solução hipotônica gelada (KCl 0,075 M) e o material novamente homogeneizado e levado para centrifugação a 800 rpm por 5 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado deixando-se 0,5 ml para homogeneização. Logo em seguida, foram adicionados 5 mL de fixador 5:1 (5 partes de metanol: 1 parte de ácido acético) recém preparado e 3 gotas de formaldeído, o qual irá auxiliar na preservação do citoplasma; logo então o conteúdo foi novamente homogeneizado com cuidado. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado mais uma vez a 800 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado deixando-se 0,5 mL para a ressuspensão. Após esta etapa, foram adicionados em leve agitação 5 mL de fixador 3:1 recém preparado (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético). O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado a 800 rpm por 5 min. Por fim, o sobrenadante foi descartado deixando-se aproximadamente 400 µL de suspensão no tubo para a preparação das lâminas. Para cada lâmina foram utilizadas de 3 a 4 gotas, dependendo da quantidade de material. As lâminas foram secas a temperatura ambiente e coradas com Giemsa 3 % por 4 min. Por fim, a análise de diversos parâmetros como o MN convencional e o índice de divisão nuclear (IDN) foi realizada em microscópio óptico de luz modelo L2000A BIOVAL em aumento de 1000 X.

3.5.1 Critérios para a seleção das células (FENECH, 2000)

Para a seleção das células a serem analisadas foram utilizados os critérios observados na figura 8. Foram contadas 1000 células binucleadas com membrana intacta; os núcleos também devem estar intactos, com tamanhos aproximadamente iguais, mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático e as células devem estar claramente distinguíveis das células adjacentes.

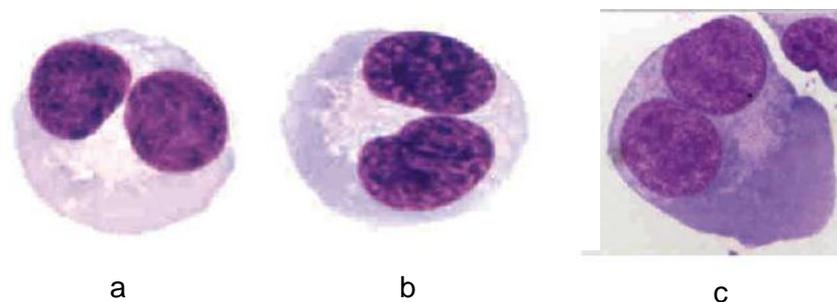


Figura 8 - Fotomicrografias ilustrando diversos aspectos de células binucleadas (coradas com Giemsa) que se enquadram nos critérios de análise. Em (a) núcleos arredondados; (b) núcleos ovais; e (c) mostra o limite entre duas células adjacentes (adaptado de FENECH, 2000).

3.5.2 Análise dos Micronúcleos

A análise foi realizada em 1000 células binucleadas para cada um dos diferentes grupos avaliados (controles negativo e positivo, e as três concentrações de artemeter e artemisinina), com os MNs obedecendo aos seguintes critérios: apresentar morfologia idêntica a dos núcleos principais; possuir diâmetro entre 1/16 até no máximo 1/3 dos núcleos principais; apresentar mesma coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente com maior intensidade; não apresentar refringências; não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais; e por fim, não se sobrepor aos núcleos principais, como mostra a figura 9 (FENECH, 2000).

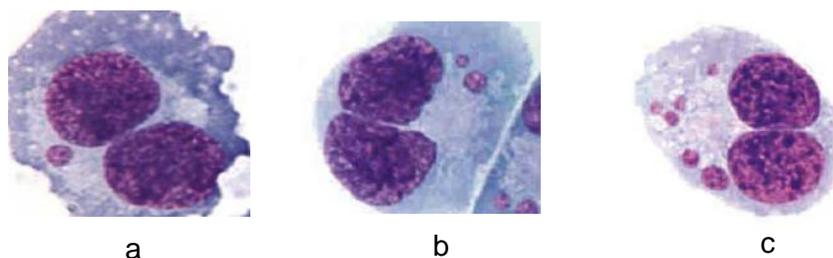


Figura 9 - Fotomicrografias ilustrando células binucleadas micronucleadas (coradas com Giemsa) com um (a), dois (b) e seis (c) MNs. Todas as células obedecem aos critérios de análise para MN (adaptado de FENECH, 2000).

3.5.3 Análise do índice de divisão nuclear (IDN)

O índice de divisão nuclear foi analisado em 500 células a partir da seguinte fórmula: $IDN = [M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4)] / N$, em que M1 à M4 = número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente e N = número total de células, a figura 10 mostra como essas células foram visualizadas (FENECH, 2000).

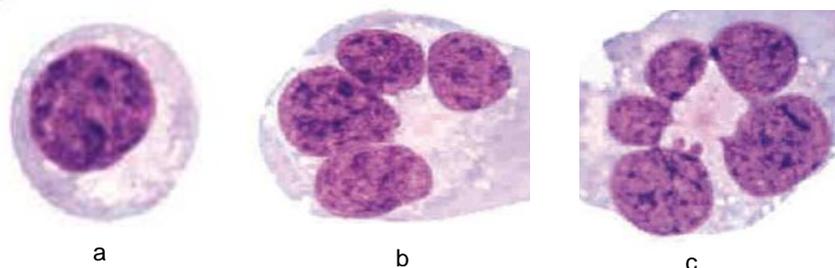


Figura 10 - Fotomicrografias ilustrando células multinucleadas (coradas com Giemsa). Em a: uma célula mononucleada; b: uma tetranucleada; e em c: uma célula multinucleada com 5 núcleos (adaptado de FENECH, 2000)

3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA-BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE)

Para a avaliação de apoptose e necrose de cultura de linfócitos, foram semeadas aproximadamente 1×10^6 de células em placas de cultura de 12 poços (Corning) contendo 1 ml de meio completo. Após 20h, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de artemisinina e artemeter. Depois de 24 e 48 hs, uma alíquota de 1 ml de suspensão celular foi centrifugada e o *pellet* ressuspendido. Após este processo, 1 μ l de solução

aquosa de laranja de acridina/brometo de etidio (100 µg/ml) foi adicionado, sendo posteriormente realizada a análise das células em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT (MONTENEGRO *et al.*, 2007). Um total de 300 células foi analisado para cada grupo de tratamento.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados que se enquadraram nas premissas de normalidade, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Porém, para os dados que não se enquadraram na premissa de normalidade foi utilizado um teste não-paramétrico, denominado Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado foi de 5%. O programa utilizado para realizar as análises foi o BioEstat versão 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO ENSAIO COMETA

Após três horas de tratamento das culturas com a artemisinina, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de dano ao DNA apenas na cultura exposta a maior concentração da droga em relação ao controle negativo. O índice de dano ao DNA do controle negativo também diferiu significativamente ($p < 0,05$) do índice das células tratadas com a doxorrubicina (Figura 11).

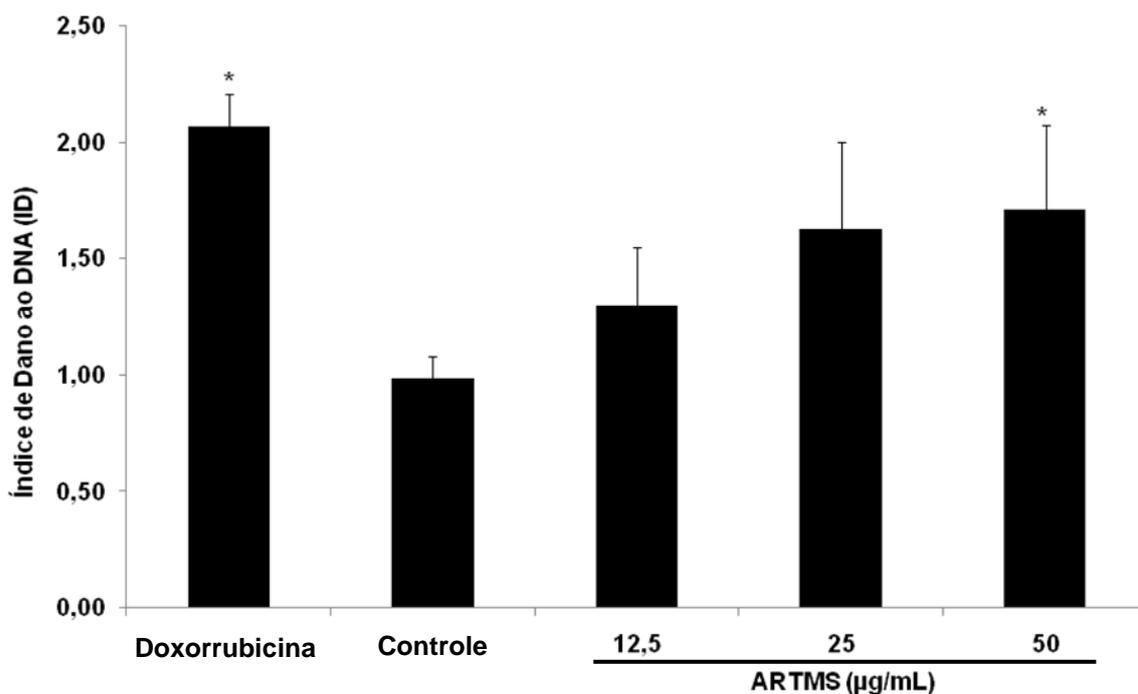


Figura 11: Efeito da artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio cometa. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Com relação ao artemeter, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no índice de dano ao DNA das células em todas as concentrações estudadas em relação ao controle negativo. Este aumento foi dependente da concentração da droga. O índice de dano ao DNA do controle negativo também diferiu significativamente ($p < 0,05$) do índice das células tratadas com a doxorrubicina (Figura 12).

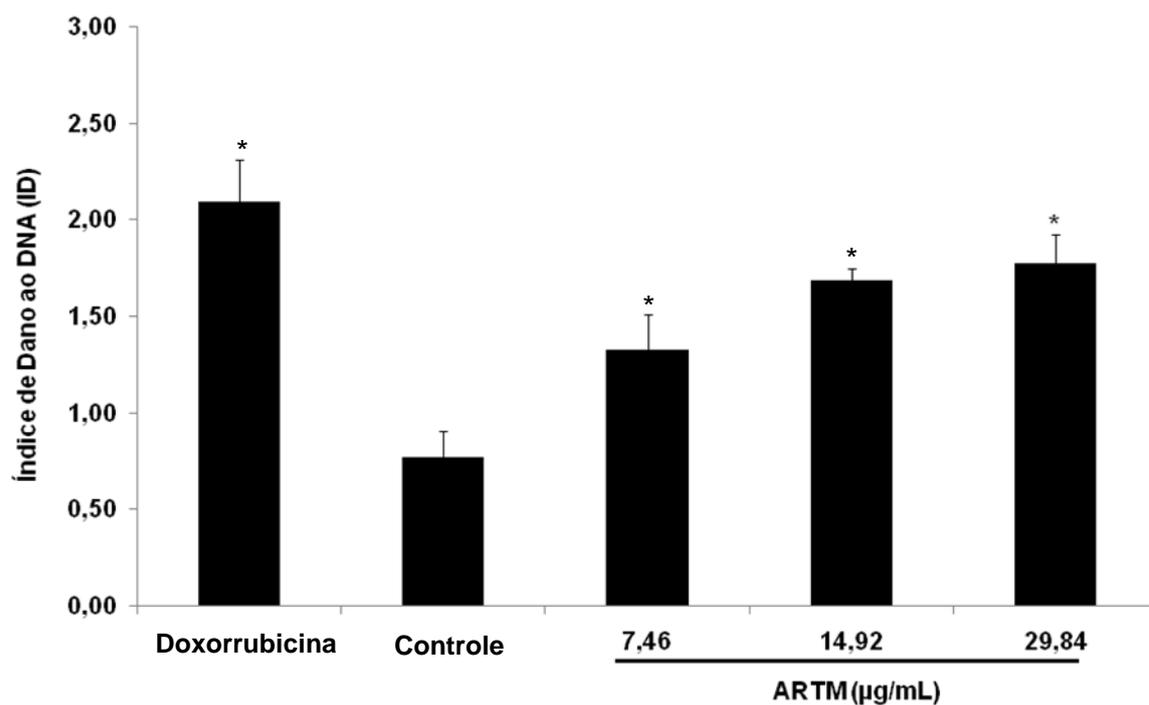


Figura 12: Efeito do artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo ensaio cometa. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

4.2 EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS ANALISADO PELO TESTE DO MICRONÚCLEO

Em relação ao teste do micronúcleo observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de MN nas culturas expostas as duas maiores concentrações da droga artemisinina. O controle negativo também diferiu significativamente do positivo (doxorubicina) (Figura 13).

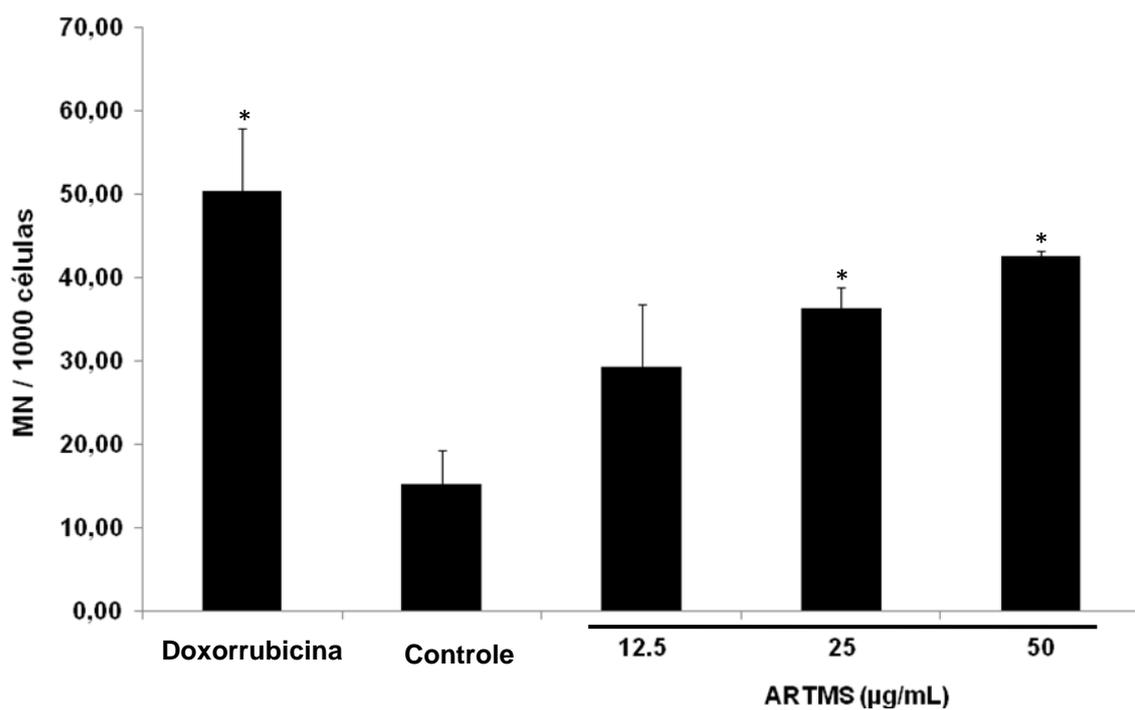


Figura 13: Efeito da artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Com relação ao artemeter também houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de MN nas culturas expostas as duas maiores concentrações testadas. O controle negativo também diferiu significativamente do positivo (doxorubicina) (Figura 14).

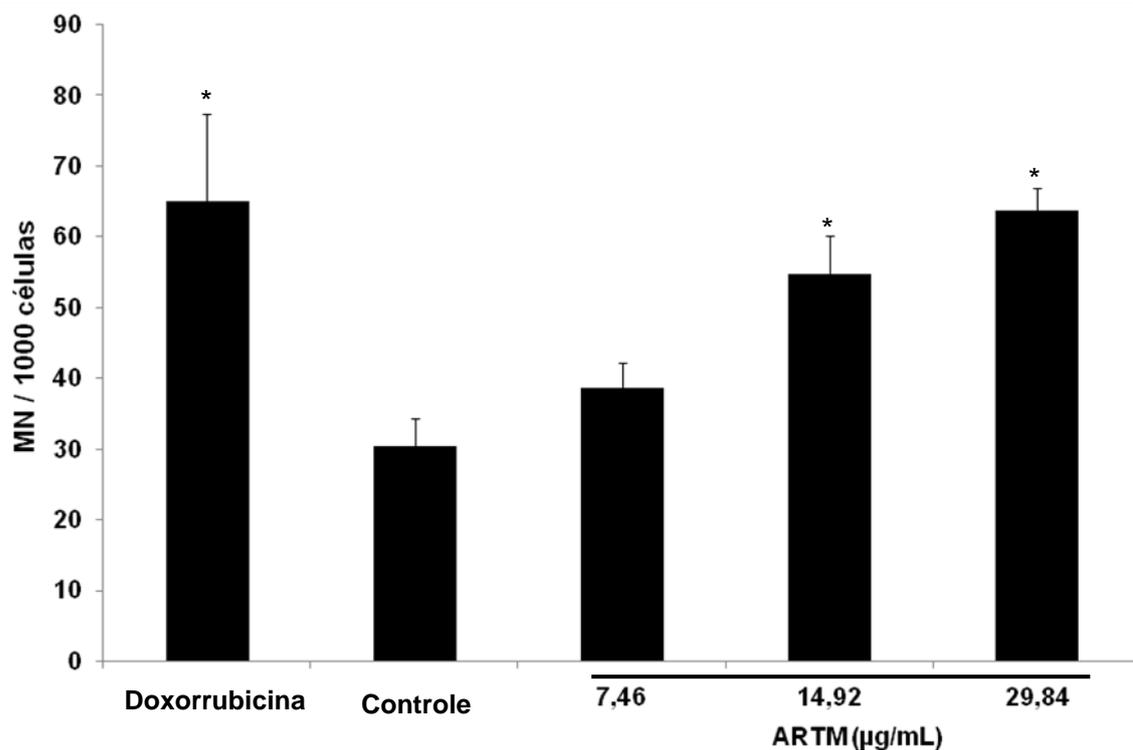


Figura 14: Efeito do artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos analisado pelo teste do micronúcleo. * $p < 0,05$ (ANOVA/pós-teste Tukey) em relação ao controle.

Com relação aos outros parâmetros analisados pelo teste do MN, observamos que não houve diferença estatística no índice de divisão nuclear (IDN) em nenhuma das drogas em estudo (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Efeito do artemisinina (ARTMS) no IDN de células de linfócitos humanos analisadas pelo teste do micronúcleo.

Índice de Divisão Nuclear (IDN)					
Indivíduos	ARTMS (µg/ml)				
	Controle	Dox 0,02 µg/ml	12,5	25	50
I 1	1,39	1,41	1,17	1,18	1,13
I 2	1,48	1,50	1,41	1,45	1,49
I 3	1,59	1,51	1,44	1,45	1,49
Média	1,49	1,47	1,34	1,36	1,37
Desvpad	0,10	0,06	0,15	0,16	0,21

Tabela 3: Efeito do artemeter (ARTM) no IDN de células de linfócitos humanos analisadas pelo teste do micronúcleo.

Índice de Divisão Nuclear (IDN)					
Indivíduos	ARTM (µg/ml)				
	Controle	Dox 0,02 µg/ml	7,46	14,92	29,84
I 1	1,46	1,33	1,54	1,67	1,57
I 2	1,72	1,35	1,60	1,67	1,63
I 3	1,65	1,46	1,55	1,61	1,67
Média	1,61	1,38	1,56	1,65	1,62
Desvpad	0,13	0,07	0,03	0,03	0,05

4.3 EFEITO DA ARTEMISININA E DO ARTEMETER NA VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS ANALISADOS PELO ENSAIO DE DETECÇÃO DE NECROSE E APOPTOSE POR MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE).

Quando analisada a viabilidade celular após o tratamento com a artemisinina no que diz respeito à apoptose, observou-se que não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle negativo tanto em 24 quanto em 48 h de tratamento; esta diferença somente foi encontrada entre os controles positivo e negativo na exposição por 48 h de tratamento. Em contrapartida, com relação à necrose demonstrou-se diferença significativa em todas as concentrações estudadas com relação ao controle negativo somente em 48 h de tratamento, e ainda entre este último e o controle positivo. Em 24 h, houve diferença estatisticamente significativa somente entre os controles negativo e positivo (Figura 15).

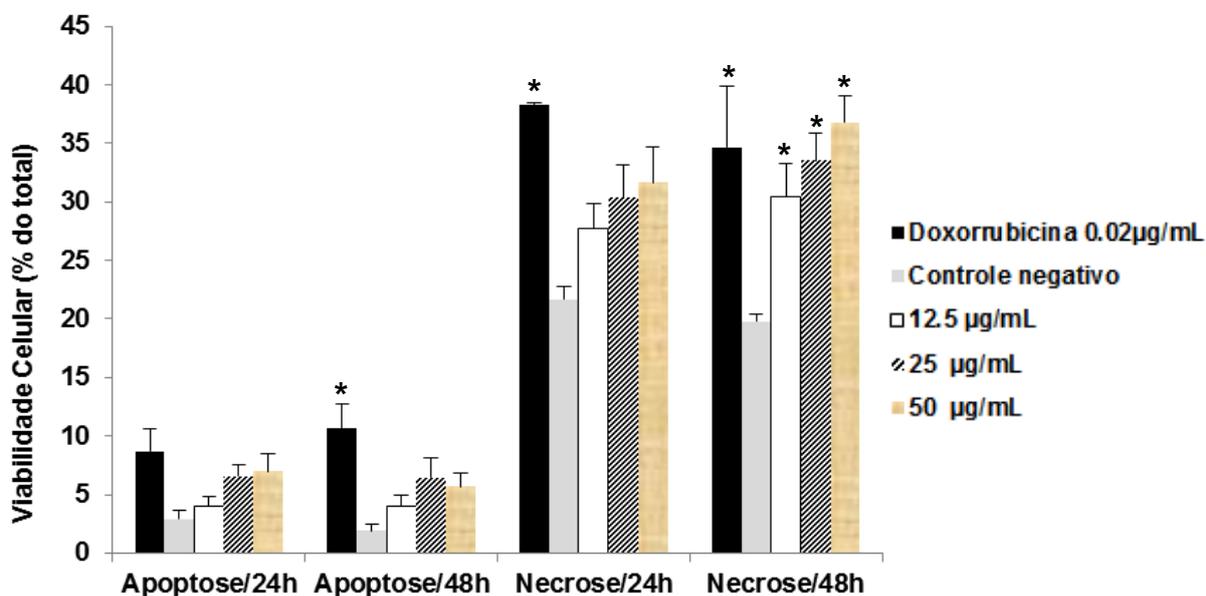


Figura 15: Frequência de apoptose e necrose induzida por artemisinina (ARTMS) em cultura de linfócitos humanos analisado por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE). *p < 0,05 (Kruskal-Wallis) em relação ao controle negativo.

Já com relação ao artemeter, verificou-se para a apoptose, que não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle negativo tanto em 24 quanto em 48 h de tratamento. Resultado semelhante foi encontrado com relação a necrose, em que houve diferença significativa apenas entre os controles positivo e negativo em 24 h de tratamento (Figura 16).

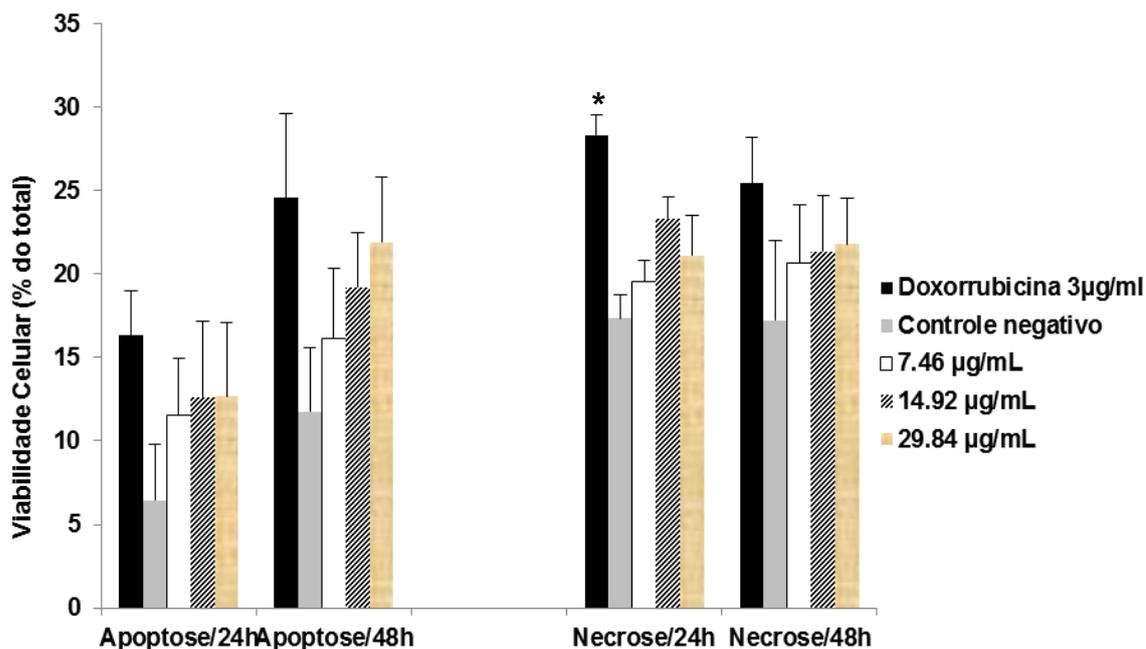


Figura 16: Frequência de apoptose e necrose induzida por artemeter (ARTM) em cultura de linfócitos humanos por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE). *p < 0,05 (Kruskal-Wallis) em relação ao controle negativo.

5 DISCUSSÃO

As lactonas sesquiterpênicas se enquadram em um grupo especial de moléculas que despertam, por parte da comunidade científica, grande interesse por suas reconhecidas propriedades biológicas como agentes antifúngicos e citotóxicos (HE *et al.*, 2010). Entretanto, alguns trabalhos na literatura demonstram que as lactonas apresentam, além das atividades biológicas já citadas, uma ação genotóxica bastante evidente. Isto pode ser comprovado através do estudo realizado por Vasconcellos *et al.* (2007) onde estes pesquisadores sugeriram fortes evidências do efeito genotóxico destes compostos, uma vez que os mesmos verificaram que o composto 15-deoxigoiazensolida induz mutações em *Sacharomyces cerevisiae*. Outro exemplo diz respeito à partenina, uma lactona antimalárica que induz a formação de micronúcleos e de outras aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos (RAMOS *et al.*, 2002).

O presente trabalho objetivou avaliar *in vitro* os possíveis efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos de uma lactona sesquiterpênica em especial chamada artemisinina, além do seu composto derivado denominado artemeter, em linfócitos de sangue periférico. Foram empregados o teste do micronúcleo em células binucleadas e o ensaio cometa para a detecção de mutagenicidade e genotoxicidade, respectivamente. Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o teste de detecção de necrose e apoptose por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE).

Em relação ao teste do micronúcleo, os resultados obtidos para a artemisinina e o artemeter demonstraram que houve um aumento na frequência deste parâmetro nas duas últimas concentrações testadas, sendo este efeito dependente da concentração, tanto para a artemisinina quanto para o artemeter (Figuras 13 e 14). Não há registros na literatura de estudos que tenham avaliado os efeitos mutagênicos da artemisinina e do artemeter empregando o teste do micronúcleo em culturas temporárias de linfócitos humanos. Contudo, este efeito foi demonstrado por Mota *et al.* (2011) ao

analisarem o potencial mutagênico do artesunato (outro derivado da artemisinina) nestas culturas. Em seu trabalho, células linfocitárias foram expostas a diferentes concentrações de artesunato o que contribuiu para o aumento na frequência de micronúcleo (este efeito era dependente da concentração).

O teste do micronúcleo em células binucleadas é uma poderosa técnica para a avaliação do potencial mutagênico de diversos agentes. Entretanto, parâmetros alternativos de análise (como por exemplo, aberrações cromossômicas e troca entre cromátides-irmãs) têm sido utilizados como importantes ferramentas para a detecção do potencial de ação de vários outros compostos sesquiterpênicos. Burim *et al.* (2001), por exemplo, ao testarem o potencial clastogênico da lactona sesquiterpênica centraterina em linfócitos humanos e em camundongos, observaram que, nas culturas temporárias de linfócitos humanos, esta droga induziu um aumento significativo tanto no total de aberrações cromossômicas quanto na frequência de trocas entre cromátides-irmãs. Este aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas também foi constatado para as concentrações testadas em camundongos. Já Al-Zubairi *et al.* (2010), ao estudarem o efeito *in vitro* da zerumbona (ZER), fármaco utilizado como antiinflamatório na medicina tradicional, observaram um aumento significativo na frequência de MN em culturas temporárias de linfócitos.

Em outro estudo, Canalle *et al.* (2001) avaliaram os efeitos mutagênicos do licnofolido (LNP), uma outra lactona sesquiterpênica com atividades antitumoral, tripanocida e antimicrobiana, em linfócitos humanos e células de medula óssea de camundongos Swiss. Os autores verificaram que o LNP induz um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em células expostas na fase G2 do ciclo celular em todas as culturas tratadas. Apenas a concentração mais elevada (26.67 mg/kg) mostrou um aumento significativo no número total de aberrações cromossômicas no tratamento *in vivo*.

Muitos outros trabalhos, empregando estas mesmas ferramentas supracitadas, já foram também realizados com drogas anti-maláricas que não se enquadravam no grupo das lactonas sesquiterpênicas. Chatterjee *et al.* (1998), por exemplo, realizaram estudos *in vivo* com células de medula óssea de camundongos com o objetivo de comparar o efeito genotóxico de três drogas anti-maláricas (cloroquina, primaquina e amodiaquina). Tais autores empregaram a técnica de troca entre cromátides-irmãs e a análise de aberrações cromossômicas como parâmetros para avaliar o potencial de ação destas três drogas. Os resultados obtidos através deste estudo mostraram que estes anti-maláricos exercem potente ação mutagênica nas células citadas. Clarke *et al.* (2001), também encontraram efeitos genotóxicos no que diz respeito ao dihidroclorato de quinacrina, porém ao invés de linfócitos humanos, seus estudos foram realizados em eritrócitos de camundongos *in vivo*.

Quando os linfócitos em cultura foram tratados com o artemeter e analisados pelo ensaio do cometa, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) e dependente da concentração no índice de dano ao DNA destas células em todas as concentrações estudadas (Figura 12), ou seja, um claro efeito genotóxico da droga foi observado em nossas condições experimentais. Para a artemisinina, o aumento no índice de dano ao DNA só foi significativo na última concentração testada ($p < 0,05$) (Figura 11). Não há trabalhos na literatura que analisam, através do ensaio cometa, os efeitos da artemisinina e do artemeter em linfócitos humanos. Entretanto, há registros sobre os efeitos do artemeter e do artesunato em uma linhagem celular de câncer gástrico PG 100 (ALCÂNTARA *et al.*, 2011) e em cultura de linfócitos humanos (MOTA *et al.*, 2011), respectivamente. Em ambos os casos, constatou-se um aumento significativo no índice de dano ao DNA ocasionado pela exposição destes tipos celulares as suas respectivas drogas.

Os resultados apresentados aqui indicam que a capacidade da artemisinina e do artemeter em produzir quebras no DNA parece não estar relacionado com a necessidade de metabolização das drogas. O presente estudo evidencia esta afirmativa, uma vez que o aumento na frequência de micronúcleos e no índice de dano ao DNA foi observado em todas as

condições testadas mesmo sem a necessidade de ativação metabólica. Este padrão nos resultados confirma o que Burim *et al.* (2001) já tinham demonstrado ao estudar o efeito clastogênico de outra lactona sesquiterpênica (centraterina) tanto na condição *in vivo* quanto *in vitro*.

Conforme já exposto, existem alguns trabalhos na literatura que têm demonstrado acerca da capacidade das artemisininas e seus derivados em danificar o DNA, porém ainda não há relatos de interação direta entre estas moléculas e o material genético. Sendo assim, é possível que o DNA não seja o alvo principal da ação direta destes fármacos, uma vez que a maioria dos estudos têm demonstrado que as lactonas atuam principalmente na inibição de enzimas responsáveis na manutenção da integridade celular e, conseqüentemente, do organismo (BURIM *et al.*, 2001). Desta forma, o efeito mutagênico e genotóxico detectado no presente trabalho pode ser explicado de outra forma. É de conhecimento que os derivados de artemisininas, como o artesunato, tem a propriedade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, radicais hidroxila e ânions radicais superóxidos (LI *et al.*, 2009). É possível que o efeito mutagênico e genotóxico das artemisininas e seus derivados, observados no presente estudo, esteja diretamente ligado a um aumento nos níveis de ROS, uma vez que estes elementos, em altas concentrações, podem gerar danos ao material genético (LI *et al.*, 2009).

Neste trabalho, não podemos observar qualquer diminuição significativa no índice de divisão nuclear (IDN) das células. Quer dizer, modificações na cinética do ciclo celular (efeitos citostáticos) induzidos pela artemisinina e seus derivados não foram detectadas em nossas condições experimentais. Contudo, efeitos citostáticos induzidos pelo artesunato já foram relatados em outros estudos. Veerasubramanian *et al.* (2006), por exemplo, demonstraram que esta droga apresenta a capacidade de reduzir a proliferação de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina. Zhou e Feng (2005) observaram que o artesunato bloqueia o ciclo celular durante as fases G0/G1 em células musculares lisas da aorta de ratos. Em ambos os trabalhos, metodologias mais acuradas, tais como, citometria de fluxo e de fluxometria foram empregadas na detecção de possíveis modificações na cinética do ciclo celular. Apesar de, em

nossas condições experimentais, o IDN não ter sofrido alterações, existem estudos que mostram variações significativas deste parâmetro induzidas por outras lactonas sesquiterpênicas (Al-ZUBARI *et al.*, 2010; BURIM *et al.*, 2001). Provavelmente, o IDN não é um parâmetro sensível para a detecção de efeitos citostáticos nas condições avaliadas pelo nosso estudo.

Com relação aos experimentos de detecção de necrose e apoptose por marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio (LA/BE) observou-se uma diferença significativa na indução de necrose em todas as concentrações estudadas com relação ao controle negativo somente em 48 h de tratamento (Figura 15). Outros trabalhos na literatura corroboram com os nossos achados. Alcântara *et al.* (2011) observaram que o artemeter provocou uma indução no número de células necróticas em uma linhagem de adenocarcinoma gástrico (PG 100). O mesmo efeito foi detectado por Mota *et al.* (2011) ao submeter linfócitos humanos a diferentes concentrações do artesunato. Finalmente, Raghavamenon *et al.* (2011) demonstraram que a dihidroartemisinina induzia morte celular por necrose em neurônios hipotalâmicos de ratos utilizando marcação fluorescente diferencial com laranja de acridina/brometo de etídio.

Como já citado anteriormente, a artemisinina e seus derivados tem a capacidade de induzir estresse oxidativo (LI *et al.*, 2009). Este estresse é ocasionado por radicais livres que são formados a partir da geração de energia das mitocôndrias e geralmente derivam do O_2 , neste caso, também são conhecidos como espécies reativas de oxigênio. Estas moléculas quando em excesso, podem agir nas células, atuando sobre moléculas biológicas, com efeitos cumulativos que podem estar relacionados a diversos processos celulares fisiológicos e patológicos, como envelhecimento, câncer, além de morte celular, inclusive por necrose (GAVA & ZANONI, 2005; RODRIGUES, 2010).

Os efeitos que os radicais livres causam nas células se concentram em basicamente em três frentes: peroxidação lipídica das membranas; oxidação de proteínas e lesões no DNA. A peroxidação lipídica das membranas é ocasionada pelo ataque espécies reativas de oxigênio as ligações duplas dos ácidos graxos dos lipídios, gerando peróxidos que são instáveis e reativos, resultando em lesões extensas nas membranas, inclusive em organelas como os lisossomos. Lesões nas membranas lisossomais fazem com que esta organela perca a capacidade de enclausurar seu conteúdo interno. Desta forma, as enzimas lisossomais saem de seu compartimento original promovendo a digestão enzimática e a desnaturação de proteínas intracelulares, o que caracteriza o processo de necrose. Este extravasamento enzimático pode dar início a uma inflamação no tecido circundante (ROBINS & CONTRAN, 2010).

Embora não tenhamos encontrado morte celular por apoptose, existem estudos na literatura onde os autores verificaram que a artemisinina e seus derivados são capazes de induzir este tipo de morte celular. Xiao *et al.* (2012), por exemplo, demonstraram que a artemisinina induz apoptose em uma linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano (ASTC-a-1). Mota *et al.* (2011) também observaram que o artesunato induz morte celular por apoptose em cultura de linfócitos humanos.

Os resultados obtidos por este trabalho mostraram que a artemisinina e o artemeter apresentaram um claro efeito mutagênico e genotóxico nas condições testadas. Apesar disso, efeitos citotóxicos só foram observados após exposição dos linfócitos a artemisinina. Estes achados alertam a respeito do risco a que indivíduos submetidos ao tratamento utilizando tais drogas possam apresentar como, por exemplo, um aumento nos eventos de carcinogênese nestes pacientes.

6 CONCLUSÕES

- ❖ O artemeter e a artemisinina induziram a um aumento no índice de dano ao DNA de linfócitos humanos;
- ❖ O artemeter e a artemisinina aumentaram a frequência de MN em linfócitos humanos;
- ❖ O artemeter e a artemisinina não apresentaram efeito no índice de divisão nuclear de linfócitos humanos;
- ❖ Apenas a artemisinina induziu necrose em linfócitos humanos exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALCÂNTARA, D.D. *et al.* In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). **Journal of Applied Toxicology**, 2011 Sep 23. doi: 10.1002/jat.1734.
- AL-ZUBAIRI, A. S.; ABDUL, A. B.; SYAM, M. M. Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, 24: 707-712, 2010.
- AL-SABATI, K. *et al.* A Survey of Lymphocyte Chromosomal Damage in Slovenian Workers Exposed to Occupational Clastogens. **Mutation Research**, 280 (3): 215-223. 1992.
- ANDERSON, D. *et al.* The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. **Mutation Research**, 307: 261-271, 1994.
- ARREESRISOM, P. *et al.* Suppressive effects of the anti-oxidant n-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. **Parasitology International**, 56: 221-226. 2007.
- AYRES, M. *et al.* **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém Pará, 2007.
- BAUMGARTNER, A. *et al.* Parallel evaluation of doxorubicin-induced genetic damage in human lymphocytes and sperm using the comet assay and spectral karyotyping, **Mutagenesis**, 19: 313-318, 2004.
- BERG, M.E van den & SILVA, M. H. L. Contribuição à flora medicinal de Mato Grosso do Sul. **Acta Amazonica**, 18 (1-2): 9-22, 1988.
- BIRD, C. Medicines from the rainforest. **New Scientist**, 17: 34-39, 1991.
- BORRIS, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, 51: 29-38. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília, 2001. 104 p.
- BURIM, R. V. *et al.* Genotoxic Action of the Sesquiterpene Lactone Centratherin on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, 21: 383-393, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. n. 3. São Paulo: **Ciência e cultura**, 2003.

CAMPOS DA PAZ, M. Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre células HSG e OSCC. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia – Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

CANALLE, R. *et al.* Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. **Cancer Detection and Prevention Journal**, 25 (1): 93-101, 2001.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, 52: 1361-1371, 2003.

CHATTERJEE, T. *et al.* Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. **Mutagenesis**, 13 (6): 619-624, 1998.

CLARKE, J. J. *et al.* Re-evaluation of the mutagenic potential of quinacrine dihydrochloride dehydrate. **Mutation Research**, 494: 41-53, 2001.

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. A Combination of the Micronucleus Assay and a FISH Technique for Evaluation of the Genotoxicity of 1, 2, 4 - benzenetriol. **Mutation Research**, 516: 49-56, 2002.

COOK, P. R. & BRAZELL, I. A. Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. **Nature**, 263 (5579): 679-682, 1976.

COOK, P. *et al.* Changes induced by ultraviolet light in the superhelical DNA of lymphocytes from subjects with xeroderma pigmentosum and normal controls. **Journal of Cell Science**, 29: 117-27, 1978.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Natural products as source of new drugs over the periods 1981 - 2002. **Journal of Natural Products**, 66, 1022-1037, 2003.

CURY-BOAVENTURA, M. F. *et al.* Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes and neutrophils. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, 78 (13), 115-23, fev. 2006.

EFFERTH, T. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. **International Journal of Oncology**, 18:767-773, 2001.

EFFERTH, T.; OLBRICH, A.; BAUER, R. mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemether. **Biochemical Pharmacology**, 64: 617-623, 2002.

ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTRÖM, G. Matrix association of early- and late-replicating chromatin studied by single-cell electrophoresis. **Biochim Biophys Acta**, 1590 (1-3): 103-108, 2002.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455: 81-95. 2000.

GAVA, A. A. & ZANONI, J. N. Envelhecimento Celular. **Arquivo de Ciência e Saúde Unipar**, Umuarama, 9:1, 2005.

GOMES, H. H. S.; DANTAS, I. C.; CATÃO, M. H. C. V. Plantas medicinais: sua utilização nos terreiros de umbanda e candoblé na zona leste de cidade de Campina Grande-Pb. **Revista de Biologia e Farmácia**, 3 (1): 110-129, 2008.

GUARIM-NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação**, 17: 71-89, 2006.

GUIMARÃES, A. P. A. *et al.* Chromosomal Aberration Induced by 5-azacytidine Combined With VP-16 (etoposide) In CHO-K1 and XRS-5 Cell Lines. **Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis**, 23 (51): 171-186, 2003.

HAYNES, R. K. e VONWILLER, S. C. Extraction of artemisinin and artemisinic acid: preparation of artemether and new analogues. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 88: S23-S26, 1994.

HE, X. F. *et al.* Sesquiterpenes and Dimeric Sesquiterpenoids from *Sarcandra glabra*. **Journal of Natural Products**, 73: 45-50, 2010.

HIEN, T. T. *et al.* An open randomized comparison of intravenous and intramuscular artesunate in severe falciparum malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86: 584-585, 1992.

HIEN, T. T. & WHITE, N. J. Qinghaosu. **Lancet**, 341: 603-608, 1993.

HSU, E. Reflections on the 'discovery' of the antimalarial quinghao. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 61 (6): 666-670, 2006.

KELTER G. Role of transferring receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. **PLoS ONE**, 2 (8): e798, 2007.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, 228: 1049 -1055, 1985.

KUNWAR, R. M. *et al.* Ethnomedicine in Himalaya: a case study from Dolpa, Humla, Jumla and Mustang districts of Nepal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2: 2-27, 2006.

KUNWAR, R. M.; SHRESTHA, K. P. e BUSSMANN, R. W. Traditional herbal medicine in far-west Nepal: a pharmacological appraisal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 13: 6-35, 2010.

LI J. & ZHOU H.J. Dihydroartemisinin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in K562 cells. **Yao Xue Xue Bao**, 40:1041-1045, 2005.

LI, S. *et al.* Effect of artesunate on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SP2/0 myeloma cells through affecting NF κ B p65. **International Journal of Hematology**, DOI 10.1007/s12185-009-0409-z. 2009.

LINDBERG, H. K. *et al.* Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. **Mutagenesis**, 23 (5): 371-376, 2008.

LINDEGARDH, N. *et al.* Quantification of Artemisinin in Human Plasma Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 768-773, 2009.

LIU, J. M. *et al.* Structure and Reaction of Arteannuin. **Acta Chimica Sinica**, 37: 129-143, 1979.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. e VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, 25 (3): 429-438, 2002.

MALUF, S. W. & ERDTMANN, B. Follow-up Study of the Genetic Damage in Lymphocytes of Pharmacists and Nurses Handling Antineoplastic Drugs Evaluated by Cytokinesis-block Micronuclei Analysis and Single Cell Gel Electrophoresis Assay. **Mutation Research**, 471: 21-27, 2000.

MICHAELIS, M. *et al.* Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. **Biochemical pharmacology**, 10: 1-7, 2009.

MILHOUS, W. K. & WEINA, P. J. Plant science. The botanical solution for malaria. **Science**, 327 (5963): 279-80, 2010.

MONTENEGRO, R. C. *et al.* Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, 21(5): 795-800, ago. 2007.

MORAES, M. O. *et al.* Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. **Arquivos brasileiros de fitomedicina científica**, 1: 30-38, 2003.

MOREIRA, A. C. *et al.* Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, law and statistics. **World Patent Information**, 28: 34-42, 2006.

MOTA, T. C. *et al.* In vitro evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 52 (7): 590-4, 2011.

MOVAJAGH, A. *et al.* Association of Glutathione S-transferase and Chromosomal Aberrations as a Means to Determine Occupational Exposure. **International Congress Series**, 1276: 197-198, 2005.

NATARAJAN, A. T. Techniques for biomonitoring of human populations for genetic effects. **Revista Brasileira de Genética**, 16 (3): 841-847, 1993.

OLIVEIRA, A. B. & BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, 1: 49-58, 2003.

OLIVEIRA, A. K. *et al.* Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal Biology**, 71(1): 283-289, 2011.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Situación regulamentaria de los medicamentos. **Resenã Mundial**, 2000. p. 62.

PATWARDHAN, B. & GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, 1: 495-502, 2005.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 25 (1): 45-61, 2002.

PRICE, R.N. Artemisinin Drugs: Novel Antimalarial Agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 9: 1815-1827, 2000.

QUINGHAOSU ANTIMALARIA COORDINATING RESEARCH GROUP. Antimalarial studies on qinghaosu. **Chinese Medicine Journal**, 92: 811-816, 1979.

RABELLO-GAY, M. N. *et al.* Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, 1991, 246 p.

RAGHAVAMENON, A. C. *et al.* Dihydroartemisinin induces caspase-8-dependent apoptosis in murine GT1-7 hypothalamic neurons. **Toxicology Mechanisms and Methods**, 21(5): 367-373, 2011.

RAMOS, A. *et al.* Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. **Mutation Research**, 514 (1 - 2): 19-27, 2002.

RAZIN, S. V.; GROMOVA, I. I.; IAROVAIA, O. V. Specificity and Functional Significance of DNA Interaction with the Nuclear Matrix: new approaches to clarify the old questions. **International Review of Cytology**, 162 (B): 405-448, 1995.

REVENE, Z.; BUSSMANN, R. W.; SHARON, D. From Sierra to Coast: Tracing the supply of medicinal plants in Northern Peru - A plant collector's tale. **Ethnobotany Research e Applications**, 6: 15-22, 2008.

RICHARD, J. M.; CHARLES, J. W.; LISA, J. W. Artemisinin antimalarials: preserving the "Magic Bullet". **Drug development research**, 71: 12-19, 2010.

ROBINS & CONTAM (2010). Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro, 10ª edição: Elsevier.

ROCHA, C.A.M. Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio em duas espécies de peixes neotropicais. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

RODRIGUES, T. (2010). Bioenergética Mitocondrial, Radicais Livres e Morte Celular. Disponível em: http://ppgquimica.ufabc.edu.br/index.php?option=com_content&view=article&id=78:bioenergetica-mitocondrial-radicaais-livres-e-morte-celular&catid=7:pesquisa&Itemid=23. Acessado em: 05 de Janeiro de 2012.

SIMON, J, E. *et al.* *Artemisia annua* L: a promising aromatic and medicinal. In: _____. **Advances in new Crops**: Proceeding of the First National Symposium New Crops: Research, Development, Economics, Portland: Timber Press, Incorporated. 522-526, 1990.

SINGH, M. P. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, 175: 184-191, 1988.

VASCONCELLOS, M. C. *et al.* Genotoxicity of 15-Deoxygoyazensolide in Bacteria and Yeast. **Mutation Research**, 631 (1): 16-25, 2007.

VEERASUBRAMANIAN, P.; GOSI, P.; LIMSOMWONG, C; WALSH, D. S. Artesunate and a Major Metabolite, Dihydroartemisinin, Diminish Mitogen-induced Lymphocyte Proliferation and Activation. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 37(5): 838 – 847, 2006.

VERGER, P. E. **Ewê: o uso das plantas medicinais na sociedade lorubá**. São Paulo: Companhia das Letras, 1995. 762 p.

VOGELSTEIN, B.; PARDOLL, D. M.; COFFEY, D. S. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. **Cell**, 22 (1): 79-85, 1980.

WEINA, P. J. Artemisinins from folklore to modern medicine--transforming an herbal extract to life-saving drugs. **Parassitologia**, 50 (1-2): 25-29, 2008.

WENISCH, C. *et al.* The Effect of Artemisinin on Granulocyte Function Assessed by Flow Cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 39 (1): 99-101, 1997.

WILCOX, M. *et al.* *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial. Wilcox, M.; Bodeker, G.; Rasoanaivo, P. (Eds.) In:____. **Traditional herbal medicines for modern times**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004. p. 43-60.

WNUK, M. *et al.* Evaluation of the Cyto- and Genotoxic Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in Human Lymphocytes *In Vitro*. **Mutation Research**, 679: 18-23, 2009.

XIAO, F. *et al.* Amplification activation loop between caspase-8 and -9 dominates artemisinin-induced apoptosis of ASTC-a-1 cells. **Apoptosis**. 2012 Mar 21. [Epub ahead of print]

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 24: 147-152, 2001.

YANG, B. O. *et al.* Artemether/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: Characterization, phase-solubility and inclusion mode. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, 17: 6311 - 6317, 2009.

ZHOU, Z. & FENG, Y. Artesunate reduces proliferation, interferes DNA replication and cell cycle and enhances apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, 25(2): 135 - 136. 2005.